



UNIVERSITE DE LIMOGES
ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé
Faculté des Sciences et Techniques
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse N° -----

Thèse
pour obtenir le titre de
Docteur de l'Université de Limoges
Mention : « Chimie Appliquée »

par

Marc-Elias BAKLEH

Méthodologie de synthèse pour l'élaboration de photosensibilisateurs sélectifs à visée anti-cancéreuse

Directeurs de thèse:

Pierre KRAUSZ, Professeur

Gérard DELERIS, Professeur

Rapporteurs

Mme Brigitte JAMART, *Professeur* Université de Nancy

M. Patrick ROLLIN, *Professeur* Université d'Orléans

Examineurs

M. Gérard PLE, *Professeur Emérite* Université de Rouen

M. Gérard DELERIS, *Professeur* Université de Bordeaux 2

Mme Karine GIONNET, *Chargée de Recherches* Université de Bordeaux 1

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

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

A ma maman Hélène et mon papa Marwan qui m'ont soutenu, supporté et encouragé durant toutes ces années, je leur dédicace ce travail et les remercie du fond du cœur pour m'avoir permis d'aller aussi loin dans mes études.

A ma sœur Myriam et à mon frère Maxime, pour leur bienveillance, leur patience et leur amour inconditionnel.

A mes amis, à mes amies pour leur présence et leur fidélité.

Écoutez la chanson bien douce
Qui ne pleure que pour vous plaire.
Elle est discrète, elle est légère :
Un frisson d'eau sur de la mousse !

La voix vous fut connue (et chère ?),
Mais à présent elle est voilée
Comme une veuve désolée,
Pourtant comme elle encore fière,

Et dans les longs plis de son voile
Qui palpite aux brises d'automne,
Cache et montre au cœur qui s'étonne
La vérité comme une étoile.

Elle dit, la voix reconnue,
Que la bonté c'est notre vie,
Que de la haine et de l'envie
Rien ne reste, la mort venue.

Elle parle aussi de la gloire
D'être simple sans plus attendre,
Et de noces d'or et du tendre
Bonheur d'une paix sans victoire.

Accueillez la voix qui persiste
Dans son naïf épithalame.
Allez, rien n'est meilleur à l'âme
Que de faire une âme moins triste !

Elle est en peine et de passage,
L'âme qui souffre sans colère,
Et comme sa morale est claire !...
Écoutez la chanson bien sage.

Paul Verlaine, Sagesse

- Remerciements -

Je remercie Monsieur le Professeur Pierre KRAUSZ, directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles à l'Université de Limoges, pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser ce travail au sein de son équipe, mais également pour ses précieux conseils et encouragements. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le groupe de Chimie Bio-Organique de l'Université de Bordeaux 2, dirigé par Monsieur le Professeur Gérard DELERIS que je remercie également.

Je tiens vivement à remercier les Professeurs Brigitte JAMART et Patrick ROLLIN pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce jury et enfin Monsieur le Professeur Gérard PLE pour l'honneur qu'il me fait de juger ce travail.

Je voudrais adresser mes profonds remerciements à Madame Karine ESTIEU-GIONNET et à Monsieur Vincent SOL qui m'ont encadré toutes ces années, pour les conseils et encouragements qu'ils n'ont cessé de me prodiguer. Je garderai un souvenir nostalgique de nos longues conversations.

Enfin je remercie de tout cœur les chercheurs et personnels du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles et du groupe de Chimie Bio-Organique pour leur aide constante et l'amitié qu'ils m'ont toujours témoignée.

- SOMMAIRE -

LISTE DES ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION GENERALE	5
CHAPITRE I	
Les porphyrines, la photothérapie dynamique et la néo-angiogenèse tumorale.	
ETAT DE LA QUESTION	
I- LES PORPHYRINES	9
1) Généralités	9
2) Caractérisation	13
A- Spectroscopie UV-visible	13
B- Résonance magnétique nucléaire (RMN)	15
i- RMN du proton	15
ii- RMN du carbone 13	17
C- Spectrométrie de masse	18
3) Principe général de synthèse	20
A- A partir de quatre noyaux pyrroles	21
i- Condensation du pyrrole avec des aldéhydes	21
ii- Autocondensation de pyrroles α -substitués	25
B- A partir d'intermédiaires dipyrroliques	26
C- A partir d'intermédiaires tri- ou tétrapyrroliques	30
D- Hémisynthèse à partir de pigments naturels	31
i- D'origine animale	31
ii- D'origine végétale	32
4) Applications chimiques	33
A- Oxydations photo-induites	33
B- Catalyses biomimétiques d'oxydations	36
i- Epoxydations	37
ii- Hydroxylations	38
iii- Clivages oxydatifs	39
C- Vers la photodécomposition de l'eau	40
II- LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE DES CANCERS	41
1) Rappel historique	42
2) Principe et mécanisme	43
3) Les agents photosensibilisateurs	45
III- LA NEO-ANGIOGENESE TUMORALE	57
1) Définition et enjeux	57
2) Mécanismes biochimiques impliqués	58
A- Les récepteurs des cellules endothéliales	58
B- Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)	60
3) Le cycloVEGI	62
BUT DU TRAVAIL	64

CHAPITRE II	
Synthèse de <i>méso</i>-tritolylporphyrines présentant le peptide cycloVEGI	69
I- OBJET DU TRAVAIL ET STRATEGIES DE SYNTHESSES	71
1) Rappel	71
2) Analyses rétrosynthétiques des molécules ciblées	72
II- ELABORATION DES PRECURSEURS	76
1) Synthèse en phase solide du peptide vecteur	76
A- Principe de la synthèse en phase solide	76
B- Synthèse et cyclisation sur résine	78
C- Purification et caractérisation	84
2) Synthèse du bras espaceur amino-azidé	85
A- Stratégie de synthèse	85
B- Préparation et caractérisations	86
3) Synthèse des <i>méso</i> -porphyrines photosensibilisatrices	89
A- Synthèses de <i>méso</i> -tritolylporphyrines mono-fonctionnalisées	89
B- Propargylation de la porphyrine mono-phénolique	90
C- Métallation par le zinc de la porphyrine propargylée	91
III- ELABORATION DES MOLECULES CIBLEES	92
1) Couplage peptidique de l'espaceur sur le vecteur	92
2) Greffage de l'espaceur sur les porphyrines	94
A- Par formation de liaison peptidique	94
B- Par couplage de <i>Click-Chemistry</i>	98
3) Couplage des précurseurs finaux	104
A- Par formation de liaison peptidique	105
B- Par réaction de <i>Click-Chemistry</i>	108
IV- CONCLUSION	109
CHAPITRE III	
Synthèse d'acides aminés photosensibilisateurs par désymétrisation de la Protoporphyrine IX	111
I- ENJEUX	113
II- STRATEGIE DE SYNTHESE	114
III- SYNTHESE DE LA <i>nor</i>-PROTOPORPHYRINAMINE IX	117
1) Chloration avec le chlorure de thionyle	118
2) Greffage sur résine de Wang	118
3) Synthèse d'un azoture d'acyle sur support	119
4) Conversion en carbamate par réarrangement de Curtius	120
5) Libération du support	122
IV- SYNTHESE D'ACIDES AMINES HOMOLOGUES par activation micro-ondes	124
1) Stratégie de synthèse	124
2) Greffage sur résine de Wang	125
3) Couplage de bras espaceur diamminés	127
4) Protection des dérivés aminés supportés	127
5) Libération du support	128
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	131
BIBLIOGRAPHIE	133
PARTIE EXPERIMENTALE	141
Annexes	179

- Liste des abréviations -

ADN : acide désoxyribonucléique

ALA : acide 5-aminolévulinique

AMM : autorisation de mise sur le marché

Boc : *tert*-butyloxycarbonyle

BPD-MA : dérivé monoacide de la benzoporphyrine

CAM : membrane chorio-allantoïdienne

CCM : chromatographie sur couche mince

CIS : conversion inter-système

cycloVEGI : peptide cyclique inhibiteur de la croissance endothéliale vasculaire

DCM : dichlorométhane

DIEA : diisopropyl-éthylamine

DMAc : diméthylacétamide

DMAP : 4, 4-diméthylaminopyridine

DMF : diméthylformamide

DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge

EDC : chlorhydrate de N,N'-diméthylaminopropyl-éthylcarbodiimide

EP : éther de pétrole

ESI : ionisation par electrospray

Fmoc : 9-Fluorène méthylène oxycarbonyle

HBTU : hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium

HOBt : 1-hydroxybenzotriazole

Hp : hématorporphyrine

HpD : hématorporphyrine dérivé

HRMS : spectrométrie de masse haute résolution

IR : infra-rouge

KDR : Kinase Domain Receptor

MALDI : Désorption-ionisation laser assistées par matrice

MO : micro-ondes

MsCl : chlorure de méthane sulfonyle

***m*-THPC** : *meta*-hydroxyphénylchlorine
NHS : N-hydroxysuccinimide
NMP : N-méthylpyrrolidone
Npe6 : *N*-aspartylchlorine e6
Pbf : 2,2,4,6,7-pentaméthyl-5-sulfonyldihydrobenzofurane
PDT : photothérapie dynamique
PpIX : protoporphyrine IX
PyBOP : hexafluorophosphate de benzotriazolyl-oxo-tris(pyrrolidino)phosphonium
PyBrOP : hexafluorophosphate de tris pyrrolidino-bromophosphonium
R_f : rapport frontal
RMN : résonance magnétique nucléaire
RTK : Receptor with Tyrosine Kinase activity
TFA : acide trifluoroacétique
THF : tétrahydrofurane
TIS : triisopropylsilane
TMS : tétraméthylsilane
TOF : temps de vol
Trt : trityle
TsCl : chlorure de *para*-toluène sulfonyle
TPP : tétraphénylporphyrine
TPPS : tétraphénylporphyrine sulfonée
UV : ultra-violet
VEGF : facteur de croissance endothéliale vasculaire

- INTRODUCTION GENERALE -

Les porphyrines sont des macrocycles aromatiques tétrapyrroliques naturels, susceptibles de former des complexes stables avec de nombreux métaux. Associées à des protéines, on les trouve dans les milieux vivants où elles participent aux réactions d'oxydoréductions biologiques. C'est le cas des chlorophylles qui, en jouant des rôles essentiels dans la photosynthèse, sont à l'origine du dioxygène terrestre, ou des hèmes, qui permettent aux hémoprotéines de transporter (hémoglobine), de stocker (myoglobine) et d'utiliser (cytochromes de la chaîne respiratoire) le dioxygène. En outre, les hémoprotéines remplissent d'autres fonctions vitales telles que le catabolisme (cytochromes P-450) au cours duquel elles sont susceptibles de catalyser un grand nombre de réactions, avec une grande efficacité et une haute spécificité. La chimie biomimétique cherche à mettre à profit les connaissances acquises sur les mécanismes réactionnels impliqués dans de tels systèmes enzymatiques pour concevoir des catalyseurs utilisables en chimie lourde ou en chimie fine. S'inscrivant dans une telle démarche, l'intérêt porté à la conception et au développement de modèles métalloporphyriniques n'a cessé de croître ces dernières années. Ainsi, l'activité oxydante des cytochromes P-450 a pu être reproduite, conduisant à la préparation de catalyseurs régiosélectifs, et même stéréospécifiques, pour l'oxydation d'hydrocarbures, ou encore d'agents de photodécomposition de l'eau. La photothérapie dynamique (PDT) représente un autre champ d'application des porphyrines : en effet, cette méthode se base sur l'utilisation de photosensibilisateurs qui deviennent phototoxiques en cas d'expositions lumineuses. L'emploi de cette technique dans le traitement des cancers est en plein essor. Pour cette finalité, deux générations de porphyrines constituent l'arsenal thérapeutique actuel. Les agents de première génération sont des mélanges complexes de porphyrines naturelles, obtenus à partir de sang: il s'agit de l'hématoporphyrine dérivée (HpD), et du Photofrin II[®] qui est disponible en France depuis 1996. Les photosensibilisateurs introduits par la suite sont synthétiques: la commercialisation des agents possédant une structure parfaitement définie marque d'importantes avancées en terme de fiabilité du traitement. Parmi les molécules de la seconde génération, on peut citer le Foscan[®], qui est actuellement utilisé pour traiter les cancers de l'œsophage, du larynx et des poumons. Le manque de photosensibilisateurs à la fois fiables, puissants et capables de se concentrer sélectivement au niveau des zones tumorales reste un problème. La recherche actuelle s'oriente vers le développement de molécules tétrapyrroliques hybrides, composées par

l'association du macrocycle à des structures assurant le transport et/ou la reconnaissance cellulaire. Dans ce domaine, notre groupe a montré que des motifs glucidiques, certains peptides et les chaînes polyaminées se révèlent être d'excellents agents de vectorisation. Les progrès dans la compréhension des mécanismes biomoléculaires spécifiquement impliqués au cours du développement tumoral permettent de définir les cibles thérapeutiques afin d'atteindre plus sélectivement et efficacement les cellules cancéreuses. En particulier, l'irrigation sanguine qui s'établit entre l'organisme et la tumeur attire l'attention de nombreuses équipes. Un nouveau capillaire sanguin prend naissance à partir d'un vaisseau préexistant au cours d'un processus biologique appelé *néoangiogenèse*. Chez l'adulte sain, la mise en place d'un nouveau réseau vasculaire est un phénomène physiologique très localisé et peu fréquent. En revanche, la *néovascularisation* s'observe constamment au niveau des zones cancéreuses : indispensable pour la survie, la croissance et la dissémination des tumeurs, elle résulte de l'asservissement pathologique de la *néoangiogenèse* par et pour les cellules malignes. Véritable « signature cancéreuse » le processus *néoangiogénique* est donc la cible biologique que nous allons viser au cours de notre travail. Celui-ci s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de l'Université de Limoges, qui est compétent dans le développement de porphyrines et le Groupe de Chimie Bio-Organique (CBO) de l'Université Bordeaux II, expert dans l'élaboration de peptides anti-angiogéniques.

En premier lieu, nous présentons quelques rappels bibliographiques indispensables. Nous proposons ensuite les synthèses et les caractérisations de deux photosensibilisateurs hybrides, obtenues par greffages de *méso*-porphyrines sur un peptide cyclique de 17 acides aminés qui possède une forte affinité pour les sites *néoangiogéniques*. Afin de faciliter la préparation d'oligomères porphyriniques photosensibilisateurs, et surtout pour introduire des synthons directement intégrables dans les séquences de synthèses peptidiques en phase solide, nous avons ensuite développé des dérivés porphyriniques par dé-symétrisations de la protoporphyrine IX qui est naturelle et abondante. C'est dans un troisième temps que nous décrivons nos stratégies de synthèses et les résultats obtenus.

- CHAPITRE I -

ETAT DE LA QUESTION

*Les porphyrines,
la photothérapie dynamique des cancers
et la néo-angiogenèse tumorale.*

I- LES PORPHYRINES

1) Généralités

Les porphyrines et leurs dérivés

Les porphyrines sont des macrocycles aromatiques à 18 électrons π conjugués, constitués de quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthines (Figure I-1). Cette forte conjugaison est à l'origine de la grande stabilité et de la forte coloration de ces composés. En fonction du pH du milieu, ces hétérocycliques se comportent comme des diacides ou des dibases. Leur structure plane, avec quatre azotes donneurs dirigés vers l'intérieur du macrocycle, leur confère un très fort effet chélate : elles peuvent former des complexes avec pratiquement tous les métaux.¹ Il se forme alors (figure I-1) une « porphyrine métallée » (b) à partir d'une « porphyrine base libre » (a).

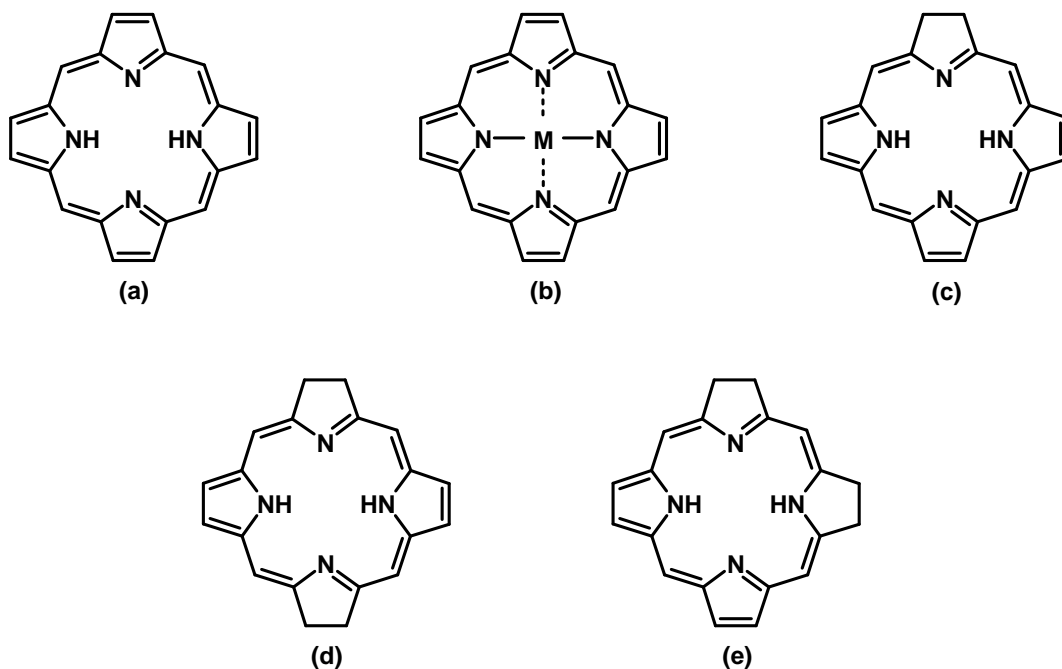


Figure I-1 : Les différentes classes de macrocycles. (a) porphyrine base libre ; (b) porphyrine métallée ; (c) chlorine ; (d) bactérochlorine ; (e) isobactérochlorine.

La réduction d'une double liaison pyrrolique conduit à la formation de chlorines (c) ainsi constituées par trois noyaux pyrroliques et une unité pyrrolidine. Lorsque deux doubles liaisons

¹ Sanders J.K.M., *The Porphyrins Handbook*, vol.III (Inorganic, organometallic and coordination chemistry), Kadish, K.M.,Smith K.M.,Guilard R. (Eds), 1999.

sont réduites, on parle alors de bactériochlorines (d) ou d'isobactériochlorines (e). Conformément à la règle de Hückel, ces réductions n'altèrent pas l'aromaticité de ces macrocycles, qui conservent ainsi d'intenses colorations.

Nomenclature

C'est dans les années 1930 que Fischer a proposé le premier système de nomenclature des porphyrines (figure I-2b).² Les carbones en positions β -pyrroliques sont numérotés de 1 à 8, tandis que les ponts méthines sont symbolisés par les lettres α , β , γ et δ . Si plusieurs substituants sont présents sur les positions β -pyrroliques d'une porphyrine, leurs agencements relatifs sont à l'origine de différentes structures. Fischer les a nommé « isomères types » et les a numéroté en chiffres romains I, II, III, etc... Lorsque, par exemple, la porphyrine possède trois substituants différents, les 15 combinaisons possibles définissent 15 isomères types (I-XV). En particulier, l'isomère type IX, est le motif de substitution des porphyrines naturelles. La complexité des porphyrines synthétiques augmentant, une nouvelle nomenclature systématique (figure I-2c) a été adoptée en 1987.

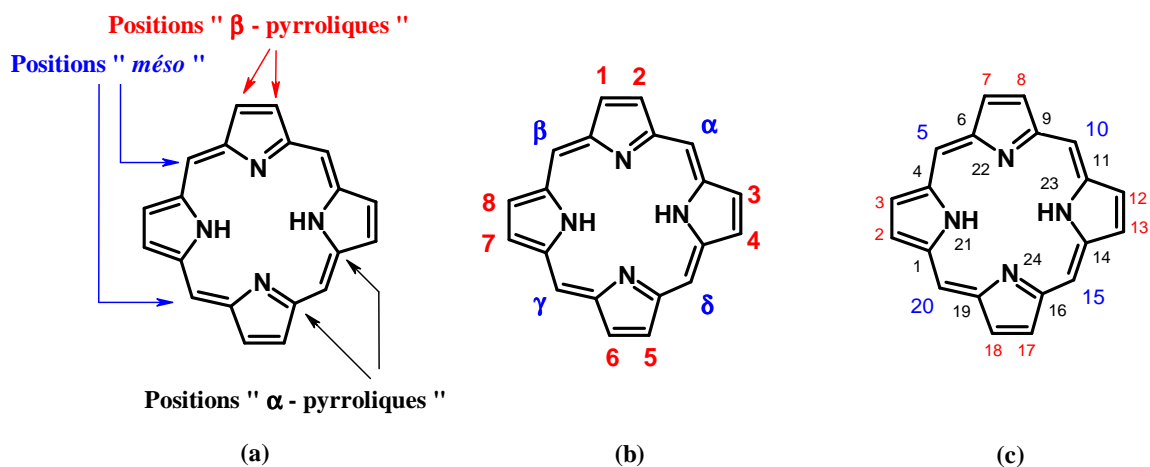


Figure I-2 : (a) nomenclature triviale ; (b) nomenclature de Fischer ; (c) nomenclature systématique officielle.

Dans ce cas, tous les carbones ainsi que les azotes du macrocycle sont numérotés.³ Les carbones *méso* portent alors les numéros 5, 10, 15, 20, les positions α et β des cycles pyrroliques sont notées respectivement 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18. Les numéros 21, 22, 23, 24 ont été attribués aux quatre atomes d'azote.

² H. Fischer, H. Orth ; *Die Chemie des Pyrrols*, vol. I-III, 1934-1940.

³ H. B. F. Dixon, A. Cornish-Bowden, C. Liebecq, K. L. Loening, G. P. Moss, J. Reedijk, S. F. Velick, P. Venetianer, J. F. G. Vliegthart ; *Pure Appl. Chem.*, 1987, 59, 779-832.

Conformations

Le macrocycle tétrapyrrolique est une structure plane qui possède quelques degrés de liberté : cette flexibilité est à l'origine de distorsions par rapport au plan, observées lors de métallations ou après protonation.⁴ Outre la composition du milieu, la présence et la taille de substituants en positions *méso*- peut être une cause « intrinsèque » des déformations du cycle porphyrinique par rapport au plan. Les substituants en positions *méso*- adoptent la conformation la plus stable par rapport au macrocycle. Par exemple, les phényles s'orientent dans le plan perpendiculaire à celui de la porphine, de sorte à limiter les interactions stériques avec les hydrogènes β -pyrroliques.

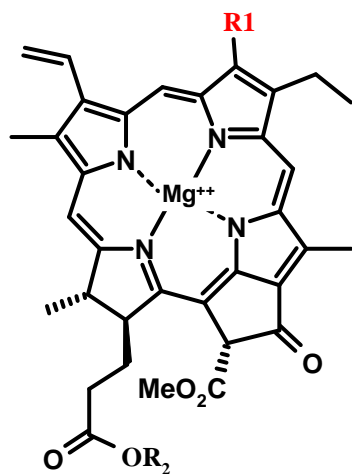
Propriétés remarquables

Les propriétés oxydo-réductrices ou photochimiques de ces complexes macrocycliques sont mises en œuvre dans tous les systèmes vivants. La figure I-3 présente quelques exemples choisis parmi les plus représentatifs. On les trouve dans les chlorophylles a et b (A) (complexes de $Mg^{(II)}$) jouant des rôles essentiels dans la photosynthèse ou dans les hèmes (B) (macrocycle porphyrinique métallé par un cation $Fe^{(II)}$ ou $Fe^{(III)}$) des hémoprotéines.⁵ Grâce à leur site hémique, ces protéines assurent chaque fonction vitale telles le métabolisme et le catabolisme d'une extrême variété de substrats (cytochromes P450 du foie).⁶ Les hémoprotéines sont indispensables à chaque étape de la respiration, depuis la fixation et le transport du dioxygène (hémoglobine et myoglobine), jusqu'à son utilisation par les cellules, grâce aux cytochromes de la chaîne respiratoire. C'est une modélisation du centre actif de la succinyl-déshydrogénase (« complexe II » de la chaîne respiratoire) qui est présentée figure I-3 (C) afin d'illustrer la structure de l'hème au sein des hémoprotéines.

⁴ W. Jentzen, M. C. Simpson, J. D. Hobbs, X. Song, T. Ema, N. Y. Nelson, C. J. Medforth, K. M. Smith, M. Veyrat, M. Mazzanti, R. Ramasseul, J.-C. Marchon, T. Takeuchi, W. A. Goddard, J. A. Shelmutt ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 11085-11097.

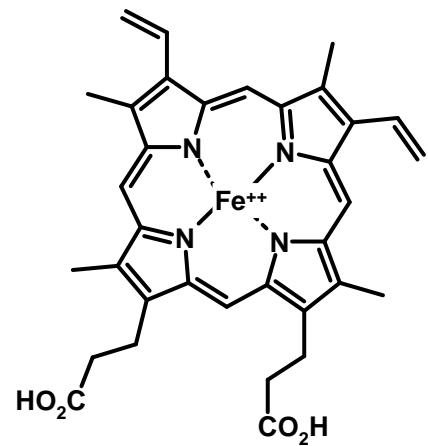
⁵ M. Perutz ; *Pour la science*, **1979**, 16, 71-85.

⁶ L. R. Milgrom ; *The Colors of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford Univ. Press, UK, **1997**, 249-260.

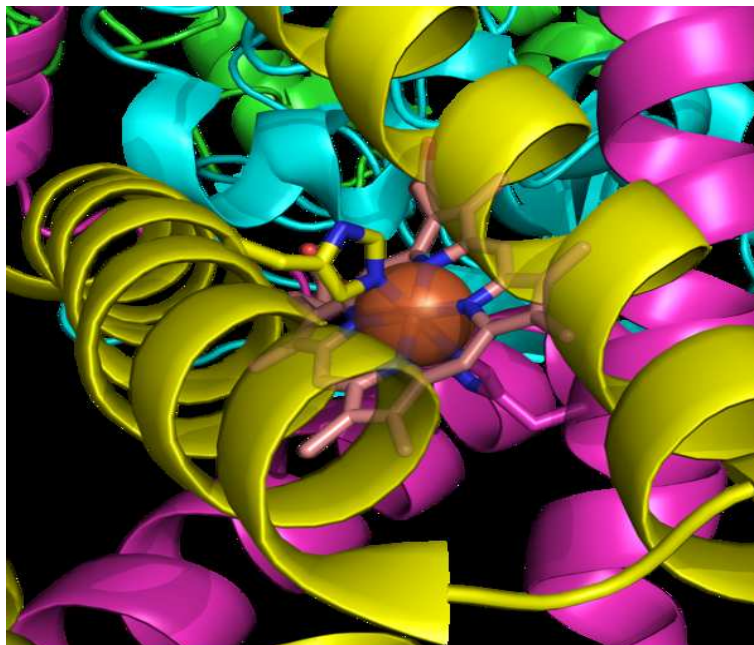
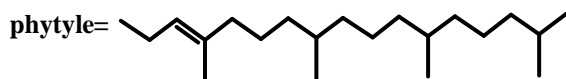


(A)

Chlorophylle a: R1=Me; R2=phytyle
 Chlorophylle b: R1=CHO; R2=phytyle



(B)



(C)

Figure I-3 : Exemples de macrocycles tétrapyrroliques naturels impliqués dans la production, le transport et l'usage du dioxygène.
 (A) Chlorophylles ; (B) Hème présent dans l'hémoglobine ;
 (C) Modélisation du site actif de la Succinyl-déshydrogénase contenant l'hème.

2) Caractérisation des porphyrines

A- Spectroscopie UV-Visible

Afin d'évoquer leur très forte coloration, les macrocycles tétrapyrroliques ont été nommés « porphyrines », du grec « *porphura* » (pourpre). L'intense coloration des porphyrines provient de leur système fortement conjugué à 18 électrons π : 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 ($\epsilon > 100000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret et de quatre autres bandes situées entre 480 et 700 nm (visible) d'intensité dix à cent fois plus faible, appelées bandes Q. L'intense bande de Soret est caractéristique de la conjugaison du macrocycle, mais la région du spectre située dans le visible est la plus utile, car elle est plus sensible aux variations de structures. En effet, les quatre bandes Q (figure I-4) qui sont numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités relatives varier notablement en fonction de la nature, du nombre et de l'agencement des substituants.⁷ On distingue essentiellement quatre spectres types, appelés *étio*, *rhodo*, *oxorhodo* et *phyllo*.⁸

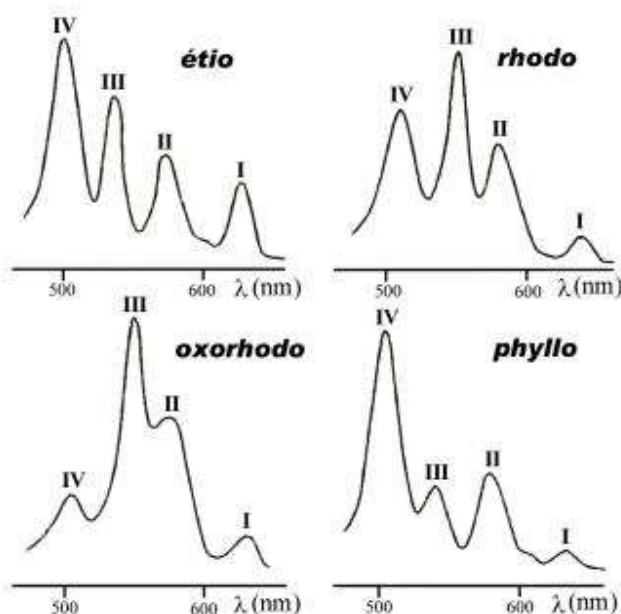


Figure I-4 : Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres d'absorption de porphyrines bases libres.⁸

⁷ M. Gouterman, *J. Mol. Spectrosc.*, **1961**, 6, 138-163.

⁸ K. M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, **1975**, p 910, Elsevier Amsterdam.

Dans les années 1930, l'équipe de Fischer⁹ a mis en évidence une série de corrélations empiriques entre la structure et le type de spectre présentés par une porphyrine β -substituée. Bien qu'il existe des contre-exemples, on observe, en principe, le type *étio* pour les porphyrines de structures analogues à l'étioporphyrine I, c'est à dire β -substituées par au moins 6 groupements, ce qui est le cas, par exemple, de la *mésoporphyrine IX*. La plupart des *méso*-arylporphyrines sont également de ce type *étio*. Cependant, les *méso*-porphyrines substituées par des groupements saturés (chaînes alkyles) seront généralement de type *phyllo*. Pour les composés tels que la bactériochlorophylle, les groupements insaturés (carbonyles...) sur les positions β rendent ces structures comparables à celle de la rhodoporphyrine XV qui est le composé parent du type *rhodo*... Une porphyrine, qui porterait ces mêmes substituants mais différemment agencés, c'est-à-dire portés par deux pyrroles opposés, présentera un spectre de type *oxorhodo*.

La protonation en milieu acide ou de métallation des porphyrines bases libres conduit à une symétrie accrue du macrocycle. On observe alors la fusion des quatre bandes IV à I en deux bandes Q (figure I-5) tandis que la bande de Soret reste pratiquement inchangée.

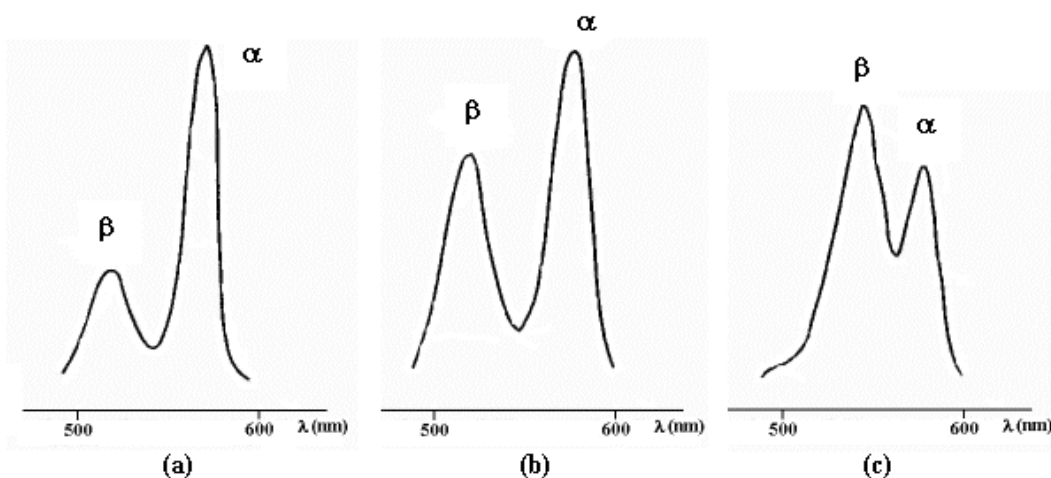


Figure I-5 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par:
Ni^(II) (a), Pd^(II) (b), Zn^(II) (c).

Dans le cas des métalloporphyrines, les intensités relatives des deux bandes Q nommées α et β (en partant des grandes longueurs d'onde) sont généralement beaucoup moins sensibles à la substitution que dans le cas des bases libres. Elles peuvent cependant traduire la plus ou moins bonne stabilité du complexe porphyrine-métal. Ainsi, lorsque l'absorption de la bande α est plus

⁹ H.Fischer, H. Orth; *Die Chemie des Pyrrols*, 1934-1940, vol. I-III, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig..

élevée que celle de β , le métal est généralement impliqué dans un complexe plan stable avec la porphyrine (c'est le cas par exemple avec Ni(II), Pd(II) ou encore Sn(IV)). Dans le cas contraire, la plus faible absorption de la bande α s'observe pour les complexes porphyriniques dans lequel le ligand métallique peut être facilement remplacé par deux protons, ce qui est le cas avec Zn(II) ou Cd(II).

B- Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Depuis les premiers travaux de Becker et coll.¹⁰ en 1959, l'étude par RMN des porphyrines a fait l'objet de nombreuses publications. Comme tous les composés aromatiques, les porphyrines possèdent un important courant de cycle qui affecte l'ensemble des protons du macrocycle.¹¹

i- Spectroscopie RMN du proton

La résonance magnétique nucléaire du proton appliquée à l'étude des 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-6).

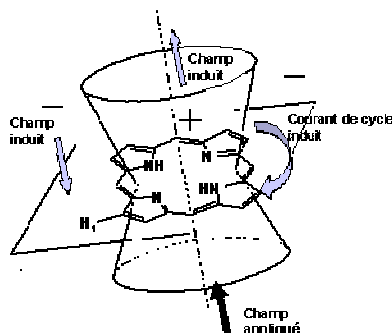


Figure I-6 : Cône d'anisotropie magnétique de la porphyrine.¹¹

Ainsi, les protons situés à l'intérieur de ce cône sont blindés alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont déblindés. Le spectre RMN est alors étendu sur une large zone de plus de 15 ppm.¹²

¹⁰ E. D. Becker, R. B. Bradley ; *J. Chem. Phys.*, **1959**, 31, 1413-1414.

¹¹ T.R. Janson, J.J. Katz *The Porphyrins Handbook*, vol. IV, Ed. D. Dolphin,academic Press,**1979**

¹² J. M. Craig ; *The Porphyrins Handbook*, vol. V, Ed. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guillard, **1999**.

Le spectre RMN ^1H de la porphine (figure I-7), porphyrine la plus simple, non substituée, est constitué de 3 singulets à -3,76, 9,74 et 10,50 ppm.¹³ Ces signaux sont attribués respectivement aux protons liés aux atomes d'azote, aux protons des positions β -pyrroliques et aux protons *méso* (H méthine). 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.

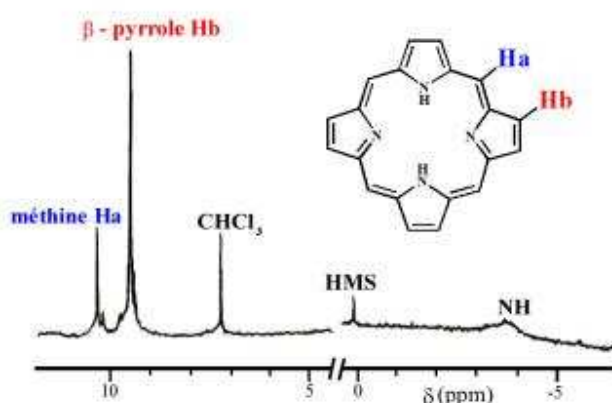


Figure I-7 : Spectre RMN ^1H de la porphine dans CDCl_3 .¹³

Pour les porphyrines de structures plus complexes, les variations de déplacements chimiques sont plus difficiles à interpréter et résultent de changements du courant de cycle induits par les effets électroniques, stériques ou encore anisotropiques des substituants. D'une manière générale la substitution en position *méso*- produit une diminution du courant de cycle. Néanmoins, on retrouve toujours les spectres caractéristiques des porphyrines quelle que soit la nature des substituants, présentant les signaux NH pyrroliques internes entre -2,7 et -4,0 ppm, les signaux H- β pyrroliques vers 9 ppm et les signaux méthines vers 10 ppm, dans le cas où ces positions ne sont pas substituées. 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.

L'insertion d'un métal de transition ou d'un lanthanide au sein d'un macrocycle porphyrinique modifie sensiblement le spectre proton de la molécule. La perturbation des signaux observée s'étend bien au-delà du centre macrocyclique, car la disparition des signaux NH pyrroliques

¹³ T. R. Janson, J. J. Katz, *The Porphyrins*, vol. IV, Eds D. Dolphin, Accademic Press, 1979.

s'accompagne de variations des déplacements chimiques des protons périphériques (β -pyrroliques et *méso*). Du fait que l'intensité des variations induites croît en fonction du paramagnétisme du métal inséré, la RMN du proton permet de suivre les transferts de spins dans les métalloporphyrines de Fer (ou de Nickel).¹⁴ La spectroscopie RMN ^1H est une méthode particulièrement utile pour détecter et caractériser les complexes formés par le Fer sous différents états de coordination et d'oxydation avec les porphyrines¹⁵ et les hémoprotéines.¹⁶ C'est par RMN du proton qu'il est possible de suivre les différentes espèces porphyrinato-Fer permettant l'activation du dioxygène ou le transfert d'atome d'oxygène par la métalloporphyrine.¹⁷

ii- 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.¹⁸

¹⁴ F. A. Walker, Proton NMR and EPR Spectroscopy of Paramagnetic Metalloporphyrins, in *The Porphyrin Handbook* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, p. 81.

¹⁵ G. N. La Mar, J. D. Satterlee, J. S. De Ropp, Nuclear Magnetic Resonance of Hemoproteins, in *The Porphyrin Handbook* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, p. 185.

¹⁶ a) G. N. La Mar, J. D. Satterlee, J. S. De Ropp, Nuclear Magnetic Resonance of Hemoproteins, in *The Porphyrin Handbook* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, p. 185.

b) L. Banci, I. Bertini, C. Luchinat, P. Turano, Solution Structures of Hemoproteins, in *The Porphyrin Handbook* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, p. 323.

¹⁷ E. Pacholska-Dudziak, L. Latos-Grazynski, Eur. J. Inorg. Chem., **2007**, 2594-2608.

¹⁸ R. J. Abraham, G. E. Hawkes, M. F. Hudson, K. M. Smith ; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1975**, 3, 204-211

C- Spectrométrie de masse

Les porphyrines se caractérisent entre autres par une très faible volatilité, c'est pourquoi les techniques classiques d'ionisation ne sont généralement pas adaptées. Il est nécessaire d'utiliser les méthodes de désorptions directes comme la Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice connu sous l'abréviation MALDI. La méthode MALDI-TOF (*Matrix-Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Fly*) permet le passage en phase gazeuse de molécules ionisées intactes de haut poids moléculaire (figure I-8).

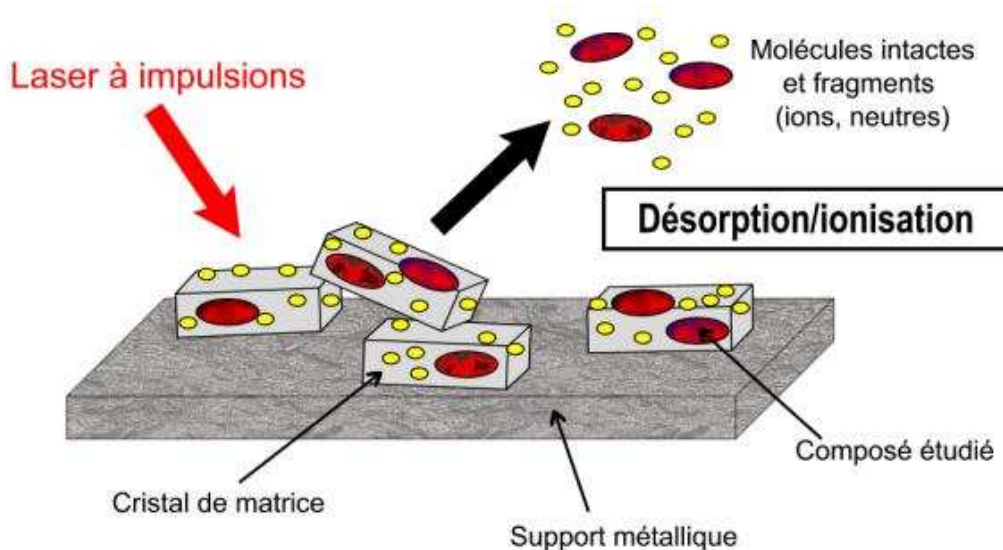


Figure I-8 : Principe de la technique MALDI.¹⁹

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

¹⁹ F. Rusconi, J. M. Schmitter ; *Analisis Magazine*, 1998, 26, 13-17.

La nature de la matrice est importante. Elle doit être soluble dans les mêmes solvants que la substance étudiée de façon à obtenir un dépôt homogène. En outre, elle doit présenter une forte absorption à la longueur d'onde du laser. Si l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) est une matrice couramment utilisée pour l'étude des macrocycles tétrapyrroliques, il existe néanmoins une gamme assez étendue de composés aux propriétés physico-chimiques variées pouvant être utilisés comme matrice en fonction des caractéristiques des porphyrines étudiées²⁰. Les ions secondaires formés sont accélérés puis analysés grâce à un système à temps de vol.

Le mode ESI (*Electro-Spray Ionisation*) est, lui aussi, utilisable pour de telles structures et permet d'obtenir l'ion moléculaire. L'ionisation par électro-vaporisation consiste à introduire l'échantillon une solution dans un capillaire soumis à un haut potentiel électrique. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés dans un ensemble d'échantillonneurs vers l'analyseur où règne un vide poussé. Par cette technique, les pics moléculaires sont également observés.

²⁰ M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp ; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 78, 53-68.

3) Principe général de synthèse des porphyrines.

Certaines porphyrines sont accessibles à partir de pigments animaux ou végétaux. Cependant au cours des 70 dernières années, de nombreuses porphyrines ont été préparées par synthèses totales. Quelle que soit la stratégie suivie, le noyau porphyrinique est formé par la mise en jeu de deux types de réactions : dans un premier temps, des substitutions électrophiles sont réalisées sur les positions 2 et 5 d'unités pyrroliques, formant un macrocycle qui est alors oxydé pour conduire au produit attendu. En fonction de la nature, du nombre et de la position des substituants à introduire sur le macrocycle, différentes stratégies ont été développées. Trois approches majeures sont utilisées pour la construction de macrocycles tétrapyrroliques (figure I-9).

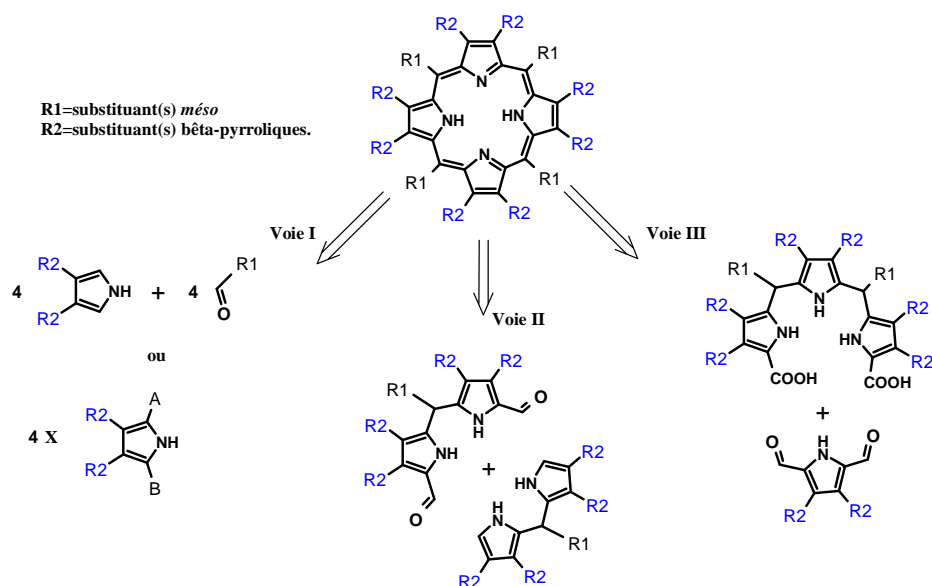


Figure I-9 : Les trois stratégies majeures suivies pour la synthèse totale des porphyrines.

De nombreuses méthodes de synthèse reposent sur la condensation de quatre pyrroles (voie I). Une alternative intéressante consiste à former le macrocycle à partir de deux intermédiaires dipyrrométhanés, selon la stratégie dite « 2+2 » (voie II). Cette stratégie a été développée afin de contrôler l'agencement des substituants portés par le produit final, et c'est également dans ce but qu'un pyrrole est condensé sur un tripyrrane selon l'approche « 3+1 » (voie III). Chaque approche implique des méthodes qui ont leurs avantages et leurs limitations : la détermination de conditions préparatives optimales reste un enjeu d'actualité. Nous proposons de faire un tour d'horizon des grandes méthodes de synthèse qui ont marqué l'essor synthétique des porphyrines.

A- Synthèse de porphyrines à partir de quatre pyrroles

Les premières porphyrines synthétiques ont été obtenues par la condensation de quatre pyrroles. Deux approches ont été développées selon cette stratégie. La première que nous allons étudier a permis de mettre au point la condensation de quatre pyrroles en présence d'aldéhydes qui apportent les quatre carbones nécessaires à la construction des ponts méthines. Cette approche s'est avérée particulièrement adaptée pour la préparation des *méso*-porphyrines. La seconde approche que nous détaillerons se base sur l'auto-condensation de pyrroles α -substitués et permet d'accéder aux porphyrines β -substituées.

i- Condensations du pyrrole avec des aldéhydes aromatiques

La première *méso*-porphyrine a été obtenue en 1935 par Rothemund²¹ avec un rendement de l'ordre de 5%.²² Il a formé la *méso*-tétraphénylporphyrine en tube scellé, en chauffant à 220°C pendant 48 heures un mélange de pyrrole et de benzaldéhyde dans la pyridine (figure I-10). Dans de telles conditions, seuls les aldéhydes aromatiques les plus résistants au chauffage ont pu former des *méso*-tétraarylporphyrines symétriques, avec des rendements toujours aussi faibles.

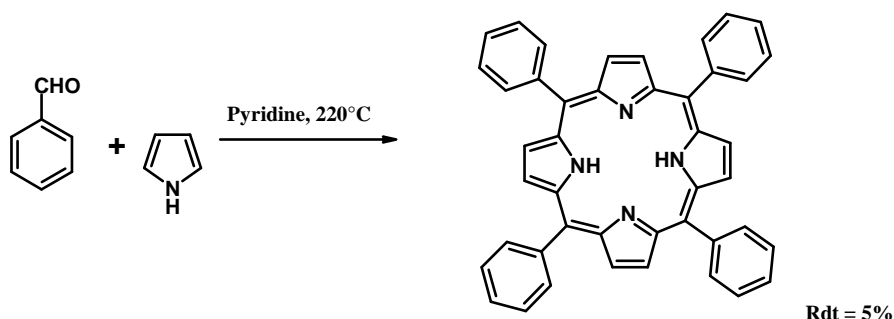


Figure I-10 : Méthode de Rothemund appliquée à la synthèse de la *méso*-tétraphénylporphyrine.

En 1967, Adler et Longo²³ ont significativement amélioré la méthode précédente par la mise en oeuvre de conditions plus douces. En effet, c'est à l'air libre et dans l'acide propanoïque à reflux (130°C) qu'ils ont réalisé la condensation du pyrrole sur le benzaldéhyde. Ils ont ainsi obtenu la *méso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement supérieur à 20%. Applicable pour un large

²¹ P. J. Rothemund ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, *61*, 2912-2915.

²² P. J. Rothemund, A. R. Menotti ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, *63*, 267-270.

²³ A. D. Adler, F. R. Longo, J. D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff ; *J. Org. Chem.*, **1967**, *32*, 476.

éventail d'aldéhydes, et sur de grandes quantités (à l'échelle de la dizaine de grammes de produit), cette méthode a largement été suivie pour la préparation de nombreuses *méso*-tétraarylporphyrines symétriques.

Des *méso*-arylporphyrines non symétriques ont été synthétisées à partir de 1975 par Little.²⁴ Il a adapté la méthode de Adler-Longo pour former un mélange de *méso*-porphyrines substituées par un, deux, trois et quatre groupements aromatiques identiques, en condensant le pyrrole sur un mélange de deux aldéhydes aromatiques au reflux de l'acide propanoïque (figure I-11). Selon cette méthode, dite des « aldéhydes mixtes », la formation préférentielle d'une *méso*-porphyrine non symétrique est orientée, contrôlée statistiquement par le rapport stoechiométrique des réactifs engagés.

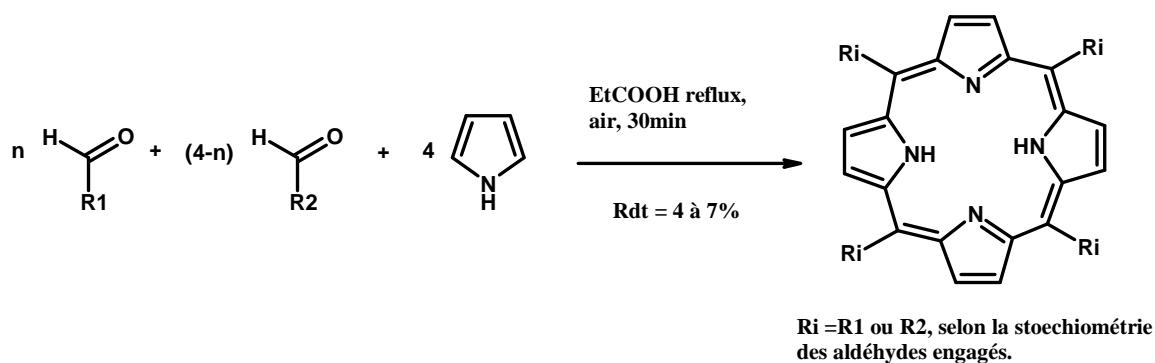


Figure I-11 : Méthode des aldéhydes mixtes.²⁴

Les rendements modestes obtenus par cette méthode (de 4 à 7%) s'expliquent par sa faible sélectivité (formation concomitante des autres *méso*-porphyrines substituées) et, surtout, par les réactions de polymérisation du pyrrole qui ont lieu au cours de toutes ces synthèses. Largement appliquée, l'approche de Little reste une méthode de choix pour la préparation des *méso*-porphyrines monofonctionnelles. En effet ces dernières cristallisent dans l'acide propanoïque, ce qui permet de les isoler simplement par filtration du mélange en fin de réaction.

En 1985, Gonzalves et *coll.*²⁵ ont suggéré que l'origine des faibles rendements observés est à chercher dans les difficultés à oxyder les porphyrinogènes, reconnus comme intermédiaires lors de la synthèse de Rothemund, et que les hautes températures utilisées sont superflues. Ils ont

²⁴ R. G. Little, J. A. Anton, P. A. Loach, J. A. Ibers ; *J. Heterocycl. Chem.*, **1975**, 12, 343-349.

²⁵ A. M. A. R. Gonzalves, M. M. Pereira ; *J. Heterocycl. Chem.*, **1985**, 22, 931-933.

proposé une voie de synthèse séparant les étapes de cyclisation et d'aromatisation du macrocycle : un porphyrinogène est obtenu à l'issue d'une première étape, puis il est oxydé en porphyrine. S'inspirant de cette méthode qui autorise l'emploi d'aldéhydes thermiquement instables tels que les benzaldéhydes substitués par des sucres, ou les aldéhydes portés par des hétérocycles, Lindsey²⁶⁻²⁷ a préparé un large éventail de *méso*-tétraarylporphyrines symétriques. A température ambiante, dans du dichlorométhane anhydre, la condensation de l'aldéhyde sur le pyrrole est induite par une quantité catalytique d'acide de Lewis (tel l'éthérate de trifluorure de bore, ou le TFA). Le porphyrinogène obtenu est ensuite oxydé en porphyrine, avec par exemple la 2,3-dichloro-5,6-dicyano-quinone. Il a ainsi préparé la tétraphénylporphyrine (figure I-12) avec un rendement de 46%. Dans ce cas, la méthode de Lindsey a donné de bien meilleurs résultats que ceux obtenus avec les méthodes précédemment décrites.

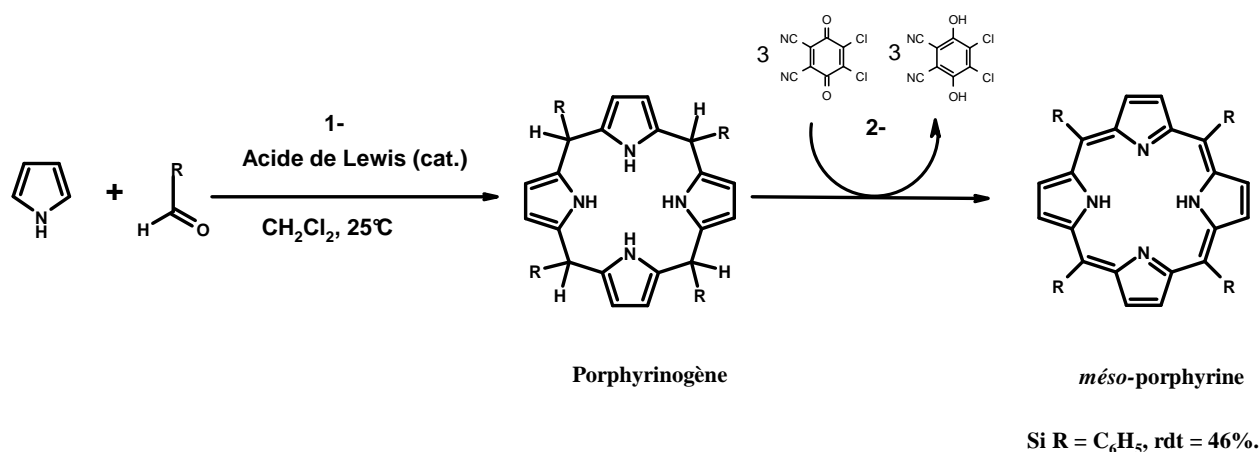


Figure I-12 : Synthèse de la tétraphénylporphyrine selon la méthode de Lindsey.²⁷

1- Synthèse du porphyrinogène 2- Oxydation en porphyrine

Cependant, les rendements peuvent varier avec une grande amplitude, selon les conditions réactionnelles et l'aldéhyde utilisés. Il s'est avéré que les meilleurs résultats sont obtenus en milieu dilué (10^{-2} M) et que l'encombrement stérique des benzaldéhydes *ortho*-substitués rend difficile leur condensation sur le pyrrole. Par la suite, cette méthode a été adaptée à la synthèse

²⁶ J. S. Lindsey, H. C. Hsu, I. C. Schreiman ; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969-4970.

²⁷ J. S. Lindsey, *The Porphyrins Handbook*, vol. I (Synthesis and Organic Chemistry), K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guillard (Eds.) **1999**.

des *méso*-tétraarylporphyrines non symétriques par Lindsey²⁸ et Momenteau²⁹, qui ont augmenté la dilution des réactifs (10^{-3} M) ainsi que la durée de réaction. L'extrême sensibilité du processus vis-à-vis de l'encombrement de l'aldéhyde et la forte dilution des réactifs introduits restent les facteurs limitants de cette méthode.

La synthèse des porphyrines à grande échelle nécessitant l'utilisation de solvants et de catalyseurs toxiques pour l'environnement, une méthode alternative a récemment été développée au sein du LCSN. Selon cette approche, les *méso*-tétraarylporphyrines sont obtenues sans solvant, grâce à l'utilisation de charbon actif (prétraité à l'acide nitrique) utilisé comme promoteur acide.³⁰ Cette méthode écologique est transposable à grande échelle car elle est simple à mettre en œuvre, rapide, efficace et économique.

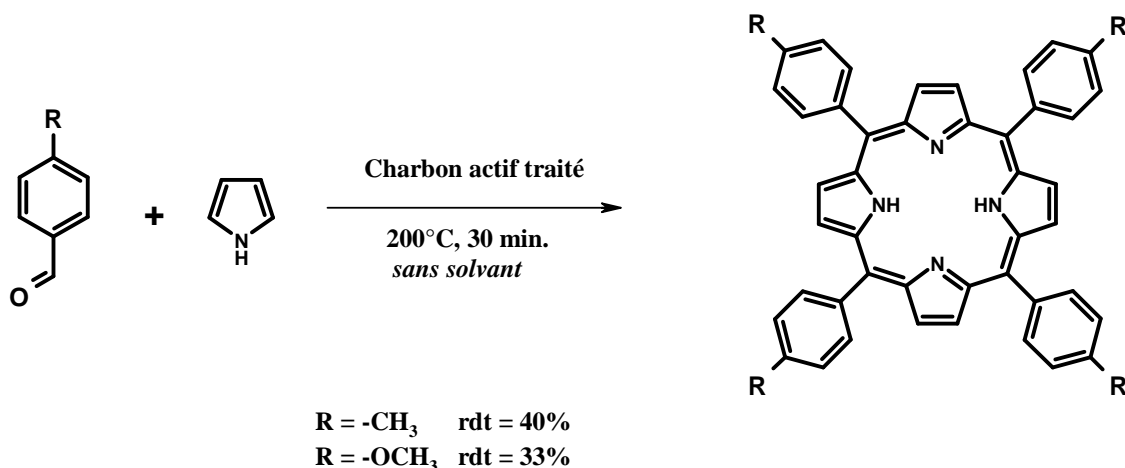


Figure I-13 : Synthèse sans solvant, catalysée par le charbon actif traité, de tétra-arylporphyrines symétriques.³⁰

Les *méso*-porphyrines symétriques comme la tétratolyl- et la tétra-anisylporphyrine (figure I-13) sont ainsi obtenues avec d'excellents rendements (respectivement 40% et 33%). Des porphyrines mono- substituées, portant notamment des substituants glycosylés, ont également été obtenues.

Quelle que soit l'approche suivie, la préparation des *méso*-porphyrines non symétriques à partir de pyrrole conduit invariablement à la formation d'un mélange de porphyrines, nécessitant un fastidieux travail de purification.

²⁸ J.S. Lindsey, S. Prathapan, T.E. Johnson, R.W. Wagner, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 8941-8968.

²⁹ D. Oulmi, P. Maillard, J.-L. Guerquin-Kern, C. Huel, M. Momenteau, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 1554-1560.

³⁰ Y. Vignaud, R. Granet, P. Krausz, *J. Porphyrins phtalocyanins*, 10(7), **2006**, 937-941.

ii- Auto-condensations de pyrroles α -substitués

Cette approche vise plus particulièrement l'obtention de porphyrines β -substituées par autocondensation de pyrroles, mono- ou disubstitués en position α . De tels précurseurs aromatiques (figure I-14) sont aisément préparés selon la méthode de Knorr. Siedel et Winkler³¹ ont synthétisé de cette façon plusieurs porphyrines β -substituées en chauffant, à sec ou en solution, des pyrroles de type **A**. Par ailleurs, la condensation de pyrrole de type **B** suivie d'une oxydation par l'air permet d'obtenir des porphyrines symétriques avec de bons rendements.

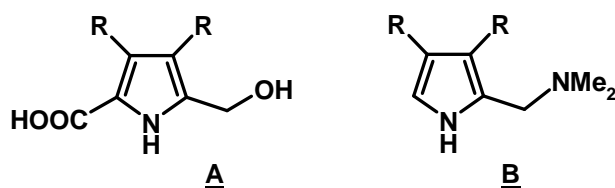


Figure I-14 : Pyrroles substitués précurseurs de porphyrines β -substituées.

En 1996, Smith et coll.³² ont présenté une nouvelle méthode permettant d'obtenir, à partir d'unités monopyrroliques, des octa-alkylporphyrines symétriques isomériquement pures portant deux types de substituants différents (figure I-15).

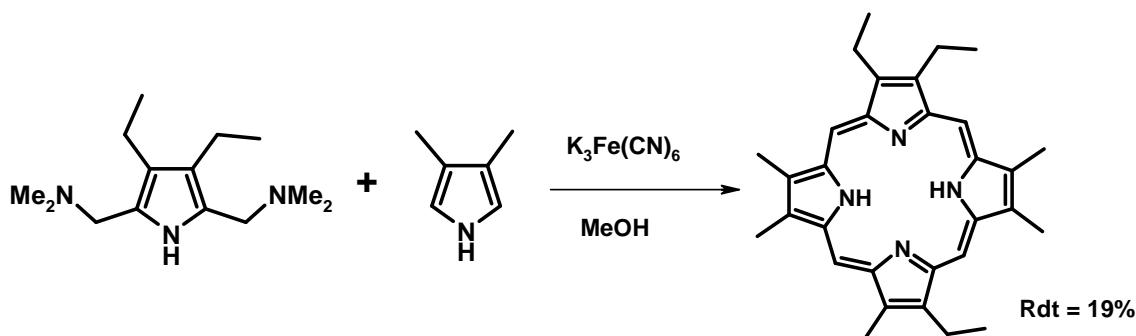


Figure I-15 : Synthèse de la tétraéthyl-tétraméthylporphyrine.

Ils ont ainsi obtenu un rendement de 19% en effectuant la réaction en présence de K₃Fe(CN)₆ dans le but d'éviter la redistribution des sous-unités pyrroliques qui, en milieu acide, conduit à un mélange complexe de porphyrines.

³¹ W. Siedel, F. Winkler ; *Liebigs Ann. Chem.*, **1943**, 54, 162-201.

³² L. T. Nguyen, M. O. Senge, K. M. Smith ; *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 998-1003.

B- Synthèse de porphyrines à partir d'intermédiaires dipyrroliques selon l'approche « 2 + 2 »

A la fin des années 1920, l'équipe de Fischer a mis au point une approche originale pour la synthèse totale de la protohème naturelle et de ses dérivés.³³⁻³⁴ Leur méthode consiste à provoquer l'autocondensation de 5-bromo-5'-méthylpyrrométhènes (figure I-16) en milieu acide par chauffage à plus de 200°C.

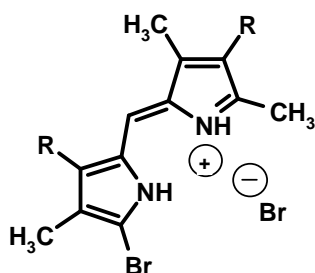


Figure I-16 : Dipyrrométhènes utilisés par Fischer.³³

Ces synthèses ont illustré le développement d'une stratégie judicieuse qui consiste à former le macrocycle tétrapyrrolique avec deux synthons « dipyrroliques ». Cependant, les conditions requises pour la condensation des méthyl-pyrrométhènes ont été une limitation évidente au développement de cette stratégie. Assez fragiles, les dipyrrométhanes n'ont pas été considérés comme des réactifs fiables, jusqu'en 1960. En synthétisant des porphyrines β -substituées, Woodward et Mac Donald³⁵ ont présenté une construction de macrocycle porphyrinique efficace qui est réalisée dans des conditions douces, utilisant une quantité catalytique d'acide pour induire la condensation d'un dipyrrométhane sur un 5,5'-bis-formylpyrrométhane (figure I-17). Woodward a rapidement illustré l'intérêt de cette méthode par la synthèse totale de la chlorophylle a.³⁶ Rapidement généralisée sous les noms de méthode « Mac Donald » ou « 2+2 », elle a été appliquée à la synthèse de *méso*-porphyrines *trans* disubstituées.

³³ H. Fischer, H. Friedrich, W. Lamatsch, K. Morgenroth ; *Techn. Hochschule, Munchen. Ann.*, **1928**, 466, 147-178.

³⁴ H. Fischer, R. Zeile, *Ann. Chem.*, **1929**, 98, 468

³⁵ a) G.P. Arsenault, E. Bullock, S.F. MacDonald ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4384-4389.

b) R. B. Woodward ; *Angew. Chem.*, **1960**, 72, 651-662.

³⁶ R. B. Woodward ; *Pure Appl. Chem.*, **1961**, 2, 383-404.

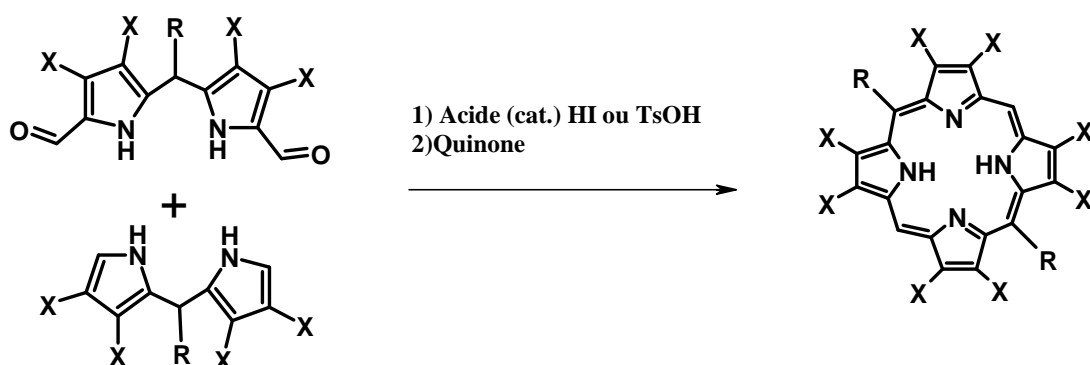


Figure I-17 : Procédure générale de la méthodologie de MacDonald.

Ainsi, trois adaptations de cette stratégie ont été mises au point (figure I-18). La première consiste à engager deux unités dipyrrométhanés avec deux aldéhydes pour obtenir après condensation (i) des porphyrines porteuses de huit substituants β -pyrroliques avec deux ou quatre *méso*-substituant ou (ii) des *méso*-porphyrines à deux ou quatre substituants.³⁷⁻³⁸ Ces condensations sont réalisées dans l'acide propanoïque à reflux, ou bien dans le dichlorométhane, par catalyse avec un acide de Lewis suivie de l'oxydation du porphyrinogène formé.

Lee et Lindsey³⁹ ont publié une méthode simple et efficace pour la préparation des dipyrrométhanés précurseurs (figure I-18). Sous atmosphère inerte, l'aldéhyde est condensé sur un excès de pyrrole (100 éq.) en absence de solvant. Selon cette méthode, les réactions sont catalysées par le TFA (0,1 éq.). Après 15 minutes à température ambiante, si les dipyrrométhanés formés n'ont pas cristallisé, ils sont purifiés par chromatographie.

La seconde variante est une autocondensation de deux unités 5-arylcbinoldipyrrométhanés réalisée au reflux de l'acide propanoïque.⁴⁰ Enfin, la troisième variante est une condensation d'un dipyrrométhane sur un 5,5'-bis-arylcbinol-dipyrrométhane.⁴¹

³⁷ J.L. Sessler, M.R. Johnson, S.E. Creager, J.C. Fettinger, J.A. Ibers, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 9310, **1990**.

³⁸ J.S. Lindsey, *The Porphyrin Handbook*, K.M. Smith, R. Guilard (Eds), Academic Press Burlington, MA, **1999**.

³⁹ C.-H. Lee, J. S. Lindsey, *Tetrahedron*, 50, 11427, **1994**.

⁴⁰ D.M. Wallace, K. Smith, *Tetrahedron Lett.*, 31, 7265, **1990**.

⁴¹ T. Ema, Y. Kurroda, H. Ogoshi, *Tetrahedron Lett.*, 32, 4529, **1991**.

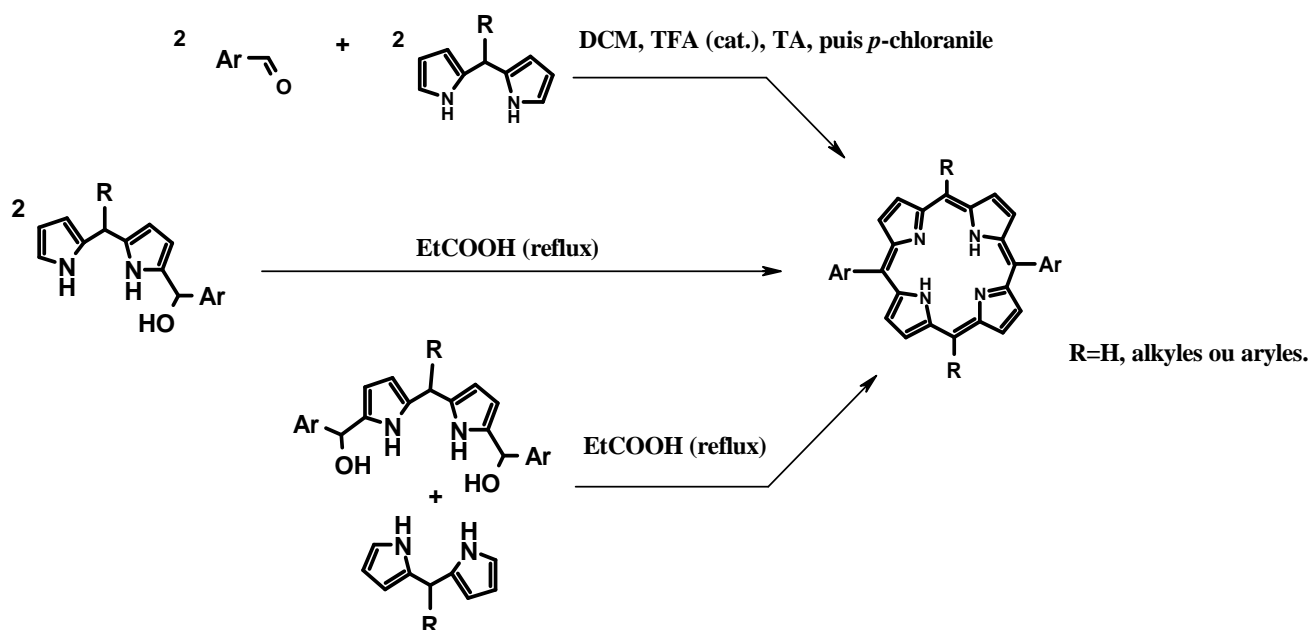
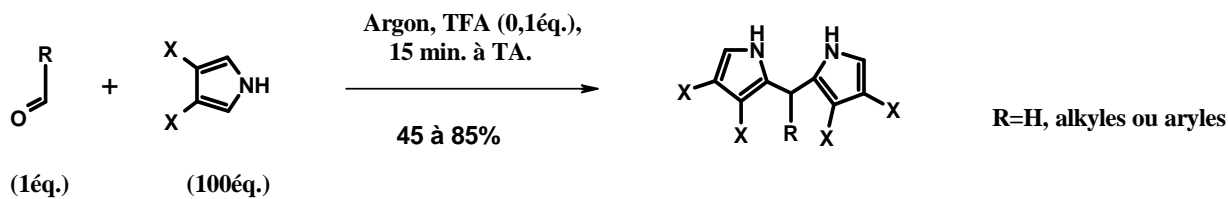


Figure I-18 : Méthode de Lindsey³⁸ pour la synthèse de dipyrométhanés précurseurs, et trois variantes de « 2+2 » appliquées à la synthèse d'une *méso*-porphyrine tétrasubstituée *trans*.

Cependant, les rendements obtenus se sont avérés modestes et le produit attendu doit invariablement être isolé d'un mélange de porphyrines isomères, difficilement séparables. La formation des isomères *cis* s'explique par un processus indésirable appelé « *scrambling* », présenté figure I-19.

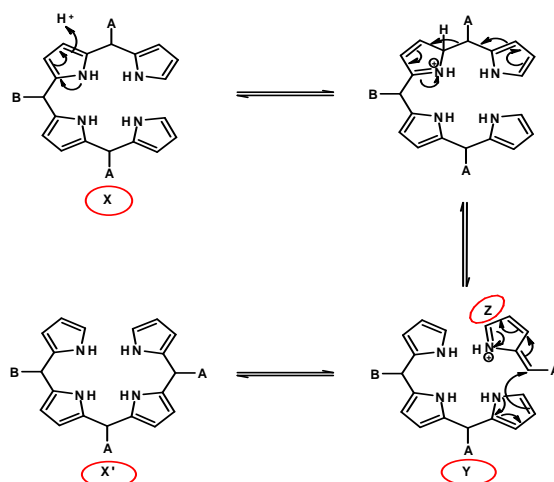


Figure I-19 : Processus du scrambling

Selon Lindsey, le tétrapyrane formé (X) subit une acidolyse. Les fragments pyrroliques (Y) et azafulvène (Z) générés se recombinent, conduisant à la formation de *cis*-porphyrines non souhaitées *via* le tétrapyrane tronqué (X'). Dans un premier temps, il a démontré qu'il était possible d'obtenir spécifiquement une *trans*-porphyrine en utilisant des dipyrrométhanés encombrés comme le mésityldipyrrométhane (figure I-20-a).⁴²

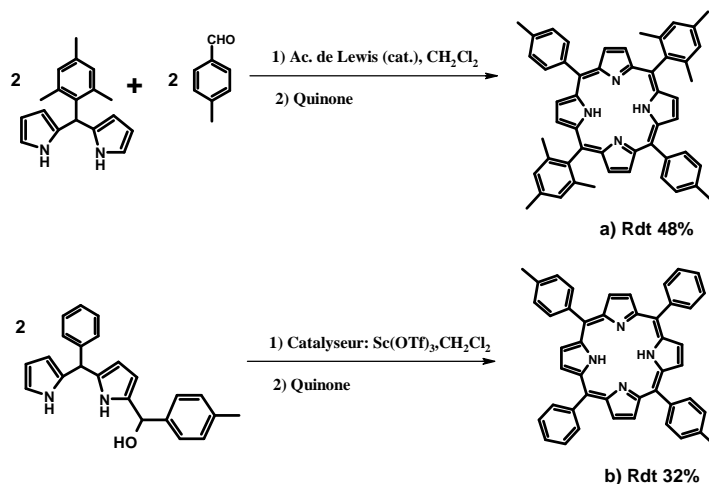


Figure I-20 : Adaptation de la méthode " 2+2 " à la synthèse d'une mésoporphyrine disubstituée *trans*

a) encombrée b) non encombrée

Par la suite il a découvert que l'utilisation de certains catalyseurs acides tels que InCl_3 , $\text{Sc}(\text{OTf})_3$, $\text{Yb}(\text{OTf})_3$, ou $\text{Dy}(\text{OTf})_3$ (figure I-20-b) réduit fortement la survenue des réactions indésirables.⁴³

⁴² B. J. Littler, Y. Ciringh, J. S. Lindsey *J. Org. Chem.*, **1999**, 64 (8), 2864-2872.

⁴³ G. R. Geier, J.B. Callinan, P. D. Rao and J. S. Lindsey ; *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**; 5, 810–823

C- Synthèse de porphyrines à partir d'intermédiaires tri- ou tétrapyrroliques

Trente six ans après l'inauguration de l'approche « 2+2 », la synthèse du macrocycle porphyrinique a été développée selon la stratégie « 3+1 ».⁴⁴ Celle-ci a permis de préparer des porphyrines β -substituées mono-fonctionnalisées ou di-fonctionnalisées sur le même pyrrole par condensation d'un tripyrrane sur un diformyl-pyrrole, avec des rendements de l'ordre de 35% (figure I-21).

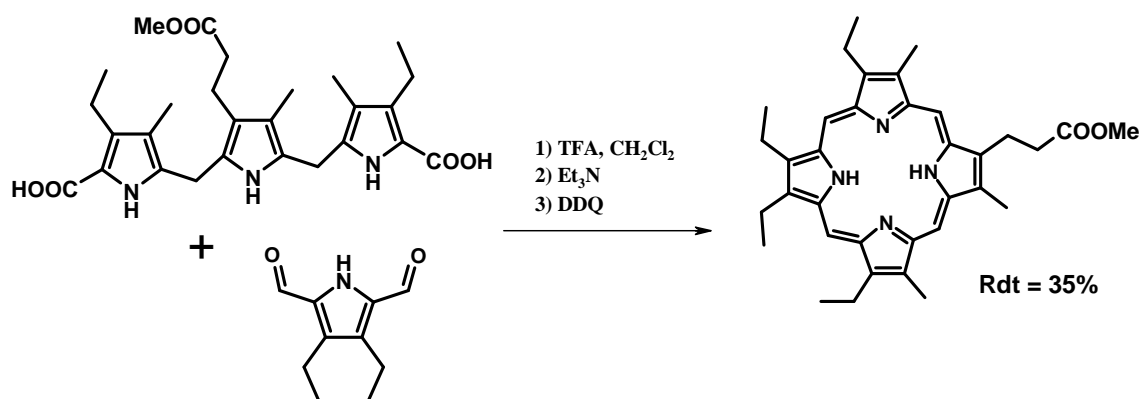


Figure I-21 : Exemple de synthèse par la méthode " 3+1 "

Pour former le macrocycle tétrapyrrolique des porphyrines, la dernière possibilité stratégique consiste à cycliser des intermédiaires tétrapyrroliques linéaires. Cette approche est développée pour la synthèse de porphyrines β -substituées qui ne possèdent pas de symétrie⁴⁵. Nous ne ferons que citer à titre d'exemple la synthèse de l'isocoproporphyrine^{45b}. A la manière dont sont construites les séquences peptidiques ou nucléotidiques, l'intermédiaire est élaboré au cours d'une synthèse multi-étapes. Il est ensuite cyclisé, puis oxydé pour donner la porphyrine attendue.

⁴⁴ J. L. Sessler, J. W. Genge, A. Urbach, P. Sansom ; *Synlett*, **1996**, 2, 187-188.

⁴⁵ a) K.M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, K.M. Smith (Ed.), Elsevier, Amsterdam, **1975**, 29-58.

b) P.S. Clezy, *Aust. J.Chem.*, **1991**, 44, 1163.

D- Quelques hémisynthèses à partir de pigments naturels.

i- Pigments d'origine animale

Nous présenterons ici quelques exemples de macrocycles tétrapyrroliques issus de la dégradation de chromophores naturels. La chloroprotoporphyrine de fer(III), plus connue sous le nom de protohémine est le dérivé porphyrinique le plus abondant chez les animaux supérieurs (figure I-22). On l'obtient à partir du sang selon l'une des deux méthodes décrites ci-dessous.

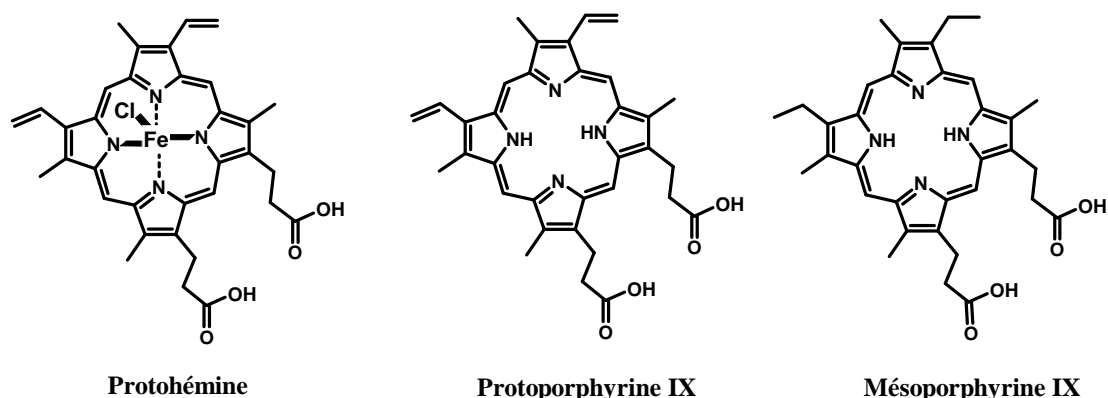


Figure I-22 : Structures de la protohémine et dérivés.

La méthode de Fischer⁴⁶.

Proposée par Fischer en 1955, cette méthode est devenue classique pour l'obtention de la protohémine. Elle consiste à chauffer du sang défibriné en milieu acide, puis à isoler la protohémine (par filtration ou centrifugation) lors du refroidissement du mélange. La purification est réalisée par recristallisation, ce qui permet d'obtenir 2,8 à 3,6 grammes de protohémine pure par litre de sang.

La méthode de Labbe et Nishida⁴⁷

Robert F. Labbe et Goro Nishida ont proposé une autre méthode, basée sur l'usage de chlorure de Strontium, afin d'éliminer la majorité des protéines par filtration à chaud. La protohémine cristallise dans le filtrat en cours de refroidissement, puis elle est purifiée, toujours par recristallisation. Les rendements obtenus par cette méthode sont sensiblement les mêmes que ceux obtenus par la méthode de Fisher.

⁴⁶ H. Fischer, *Org. Synth. Coll. Vol. III*, 442-443, 1955.

⁴⁷ R. F. Labbe, G. Nishida, *Biochem. Biophys. Acta*, 26, 437, 1957.

Ainsi obtenue, la protohème sert ensuite de précurseur pour la préparation de l'hématoporphyrine IX (traitement en milieu acide), de la protoporphyrine IX (par démétallation) ou encore de la *méso*-porphyrine IX, entre autres.

ii- Pigments d'origine végétale

Les chlorophylles naturelles (figure I-3) peuvent être extraites en abondance à partir des feuilles des végétaux. La chlorophylle *a* notamment est à la base d'un grand nombre de préparations de porphyrines et dérivés (figure I-23).⁴⁸

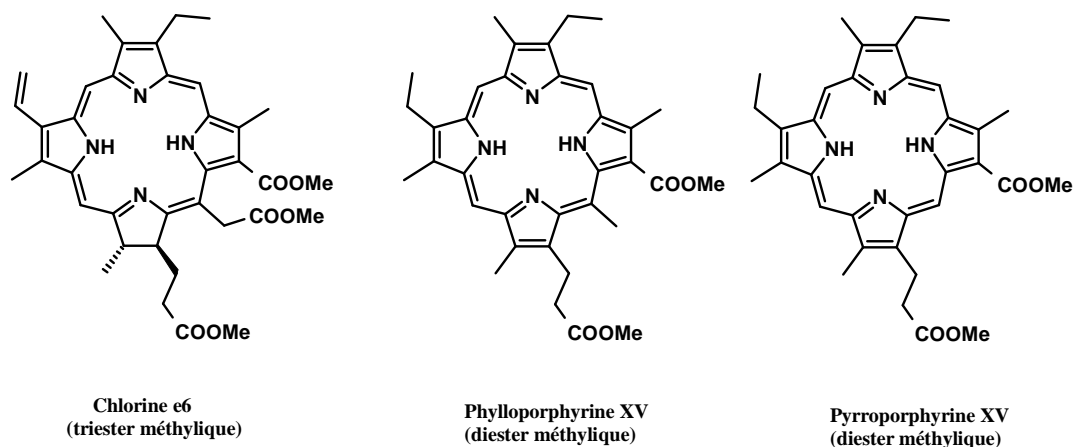


Figure I-23 : Macrocyces tétrapyrroliques issus de la chlorophylle a.

C'est par méthanolyse acide de la chlorophylle *a* que le triester méthylique de la chlorine-e6 est préparé.⁴⁹ De même, le traitement de la chlorophylle *a* par diverses conditions suivies d'une méthanolyse permettent d'obtenir les diesters méthyliques de la phylloporphyrine XV et la pyrroporphyrine XV.^{50,51}

⁴⁸ H.H. Inhoffen, *Naturwissenschaften* (1968), 55(10), 457-462.

⁴⁹ R. Willstatter, M. Utzinger, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (1911), 382, 129-94.

⁵⁰ H. Fischer, W. Seidel, L. Le Thierry, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (1933), 500, 137-202.

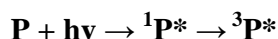
⁵¹ R. Willstatter, Y. Asahina, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (1910), 373, 227-238.

4) Applications chimiques des porphyrines

En raison de leur structure électronique particulière, les porphyrines ont souvent un caractère photosensible, ce qui en fait des agents photochimiques de premier choix. En outre, les quatre azotes donneurs dirigés vers l'intérieur du macrocycle plan confère un très fort effet chélate aux porphyrines : en présence de métaux, elles forment des complexes très stables qui sont de puissants systèmes oxydoréducteurs. Par ailleurs, leur structure macrocyclique constitue un squelette rigide et stable, pouvant être substitué par de nombreux groupements fonctionnels. Les propriétés et la modularité des porphyrines ont attiré l'attention des chimistes, ouvrant les portes de vastes domaines de recherches, comme les oxydations photo-induites, la catalyse biomimétique ou la conversion de l'énergie lumineuse.

A- Oxydations photo induites

Sous l'influence de la lumière, l'oxygène, en présence d'un sensibilisateur, est capable d'oxyder de nombreux composés organiques. Ces oxydations ont lieu selon deux modalités (mécanismes I et II) et s'effectuent en présence d'un colorant naturel (**P**) susceptible d'être excité par absorption d'un photon $h\nu$. Portée dans un état excité ($^1\mathbf{P}^*$), la molécule ne demande qu'à dissiper son excédent d'énergie, et son devenir après l'excitation lumineuse peut être décrit par le diagramme de Perrin-Jablonski (figure I-24). Son retour à l'état fondamental peut se faire selon les processus photophysiques radiatif (fluorescence) ou non radiatif (dissipation d'énergie calorifique), concurrents de la réaction photochimique. Mais si le photosensibilisateur est une porphyrine, le plus souvent (plus de 80% pour l'hématoporphyrine⁵²), une conversion intersystème par inversion de spin électronique conduit à la formation d'une porphyrine à l'état triplet ($^3\mathbf{P}^*$).



Celle-ci peut se désactiver par les processus photophysiques (phosphorescence, dissipation d'énergie calorifique) et, surtout, par réactions photochimiques, selon deux mécanismes.

⁵² G. Jori, J. D. Spikes, *Photobiochemistry of porphyrins. Topics in photomedicine*. K.C. Smith Ed., Plenum Press, New York 1984.

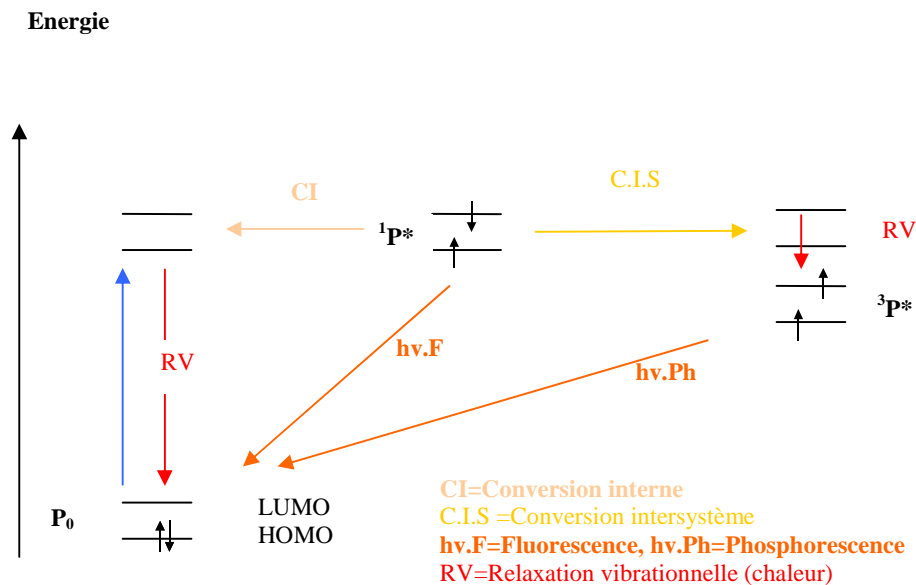
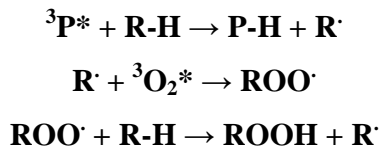


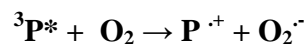
Figure I-24 : Diagramme de Perrin-Jablonski.

- Le mécanisme radicalaire photo-induit (type I)

Ce mécanisme implique un transfert d'électron du photosensibilisateur vers une molécule de substrat (**RH**), initiant une réaction radicalaire dont la chaîne de propagation est assurée par la présence d'oxygène moléculaire.



Les produits obtenus seront nombreux car les peroxydes formés sont instables, ce qui conduit à des processus de dégradation ou de polymérisation. Par ailleurs, ${}^3\text{P}^*$ peut céder un électron à l'oxygène, donnant l'anion superoxyde ($\text{O}_2^{\cdot-}$) qui peut former des adduits.



- Le mécanisme photochimique (type II)

Ce mécanisme implique quant à lui le transfert d'énergie au dioxygène moléculaire. Il passe alors de son état fondamental (état triplet : ${}^3\text{O}_2$) à l'état excité singulet (${}^1\text{O}_2$) qui est extrêmement électrophile. ${}^1\text{O}_2$ réagit avec les molécules du milieu, ce qui explique sa courte durée de vie dans le milieu (de l'ordre de la nanoseconde).

Un exemple typique d'adduit formé par l'oxygène singulet est l'ascaridole, synthétisé par les végétaux. Il s'agit de l'endoperoxyde-1,4 issu de la photo oxydation de l' α -terpinène, sensibilisé par les chlorophylles (figure I-25A). Ce type de réaction a donné lieu à des travaux sur l'oxydation photosensibilisée d'oléfines. Une des réactions les plus étudiées est l'hydroperoxydation des oléfines avec migration de la double liaison (figure I-25B).⁵³ Depuis, l'utilisation des porphyrines comme agent d'oxydation photochimique a permis de nombreuses synthèses.⁵⁴

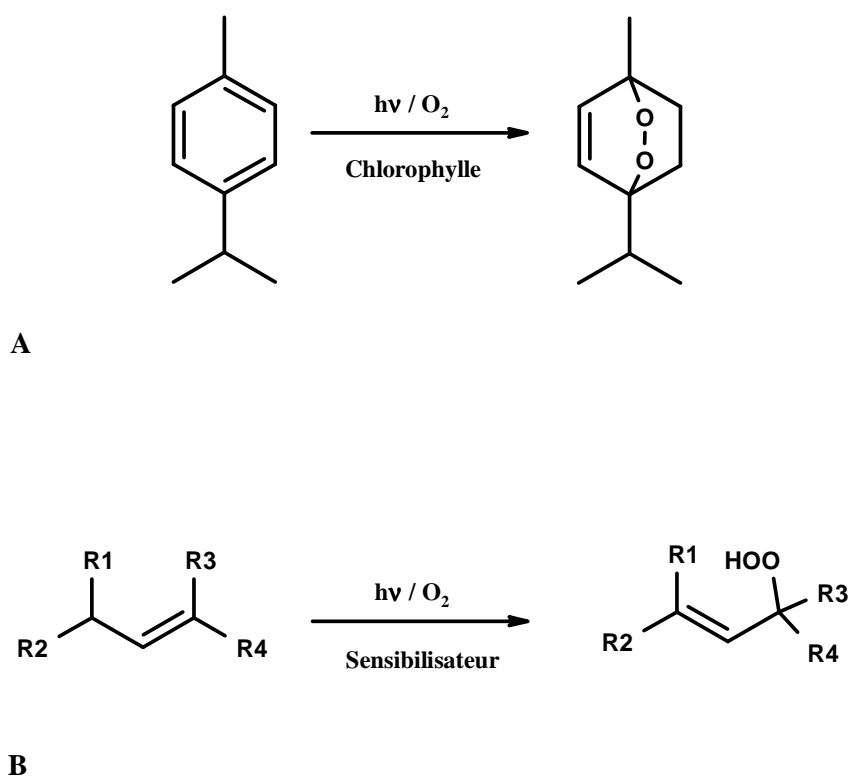


Figure I-25 : A- Formation de l'ascaridole ; B- Hydroperoxydation des oléfines.

En raison de l'importance de l'état triplet du photosensibilisateur dans le transfert d'énergie à l'oxygène, le sensibilisateur doit présenter un rendement élevé de passage à l'état triplet, une durée de vie de l'état triplet aussi longue que possible, un coefficient d'absorption important et une faible susceptibilité à l'oxydation. De plus, l'énergie de l'état triplet du photosensibilisateur ne doit pas être trop supérieure à l'énergie de l'oxygène. Les macrocycles porphyriniques répondent à ces conditions : de ce fait ils constituent de bons candidats.

⁵³ G.O. Schenck, *Angew. Chem.*, 69, 579, **1957**.

⁵⁴ E.M.K. Mansour, P. Maillard, P. Krausz, S. Gaspard, C. Giannotti, *J. Mol. Cat.*, 41, 361, **1987**.

B- Oxydations thermiques catalysées par les métallo-porphyrines

Le métabolisme des organismes vivants est assuré par les systèmes à cytochromes P450. Ces enzymes sont susceptibles de catalyser un très grand nombre de réactions. Dans leur activité de type monooxygénase, ils oxydent une large palette de substrats, réalisant entre autres, l'époxydation d'alcènes et l'hydroxylation d'alcane.⁵⁵ L'oxydant utilisé est le dioxygène, et le seul sous-produit est l'eau : on comprend donc l'intérêt industriel qu'il y aurait à mimer une telle réactivité. La chimie biomimétique met à profit la connaissance que nous avons de ces enzymes pour concevoir des catalyseurs de grande utilité. L'activité monooxygénase des cytochromes P450 peut être reproduite à l'aide de modèles métalloporphyriniques.⁵⁶ Les plus couramment employées, parce que les plus efficaces sont les *méso*-porphyrines de fer ou de manganèse.⁵⁷

En tant que catalyseurs biomimétiques les métalloporphyrines présentent une souplesse d'utilisation remarquable. En effet, ces catalyseurs sont efficaces avec une large gamme d'oxydants, généralement peu dangereux et peu coûteux. L'iodosylbenzène est le donneur d'oxygène le plus courant, mais on peut le remplacer par l'hypochlorite de sodium, par le dioxygène en présence d'une source d'électron, ou par des peroxydes inorganiques comme KHSO_5 ... Leur greffage de manière covalente, sur divers supports, permet le libre choix du système catalytique (homogène ou hétérogène). Modifiable en plusieurs sites, la structure des métalloporphyrines a permis la conception de différentes générations de catalyseurs. Les *méso*-porphyrines substituées par quatre groupements aryles identiques (phényles ou tolyles) se sont avérées relativement résistantes aux conditions oxydantes, conduisant à la première génération de catalyseurs (FeTPPCl et MnTTPCl par exemple). Les catalyseurs de seconde génération ont une durée de vie accrue par l'utilisation de groupes aryle halogénés. Par rapport aux *méso*-porphyrines précitées, les catalyseurs de troisième génération ont démontré leur efficacité supérieure : ces porphyrines sont substituées non seulement sur les phényles, mais aussi sur les pyrroles par des groupements électroattracteurs (fluor, chlore, nitro, sulfonates...). Enfin, des

⁵⁵ D. Mansuy, J.M. Berg, *Bioinorganic catalysis*, J. Reedijk Ed., M. Dekker, Inc., New York, **1993**, 395-468.

⁵⁶ D. Mansuy, *Pure and Appl. Chem.*, **1987**, 59, 759-770.

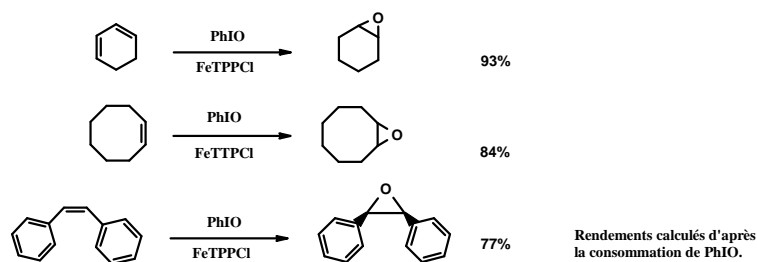
⁵⁷ F. Montanari, L. Casella, *Metalloporphyrins Catalysed Oxydations*, Kluwer Academic, Dordrecht, **1994**.

systèmes porphyriniques chiraux ont été développés dans le but de proposer des catalyseurs stéréo sélectifs pour la synthèse asymétrique.

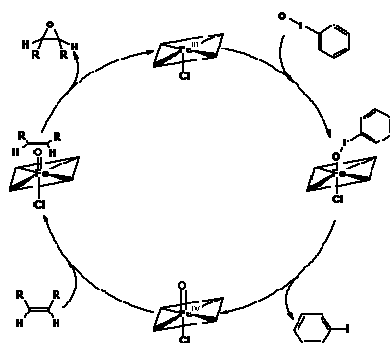
La fonctionnalisation d'hydrocarbures (alcanes, alcènes) est au centre des préoccupations de l'industrie chimique contemporaine, permettant la valorisation de simples combustibles en réactifs chimiques. Les porphyrines sont utilisées dans l'industrie pétrolière pour catalyser l'époxydation des oléfines, l'hydroxylation des alcanes, et la conversion d'oléfines terminales en aldéhydes.

i- Epoxydation d'oléfines

Groves et *coll.* ont publié en 1979 les premiers travaux d'oxygénation thermique catalysée par des métalloporphyrines.⁵⁸ Utilisant l'iodosylbenzène (PhIO) comme donneur, ils ont décrit l'époxydation d'oléfines (figure I-26A) en présence de tétraphényl- ou tétratolylporphyrines ferriques (respectivement FeTPPCl et FeTTPCl). Ces métalloporphyrines forment transitoirement un dérivé oxo-métallique qui est à l'origine du transfert d'un atome d'oxygène (figure I-26B).⁵⁹



A



B

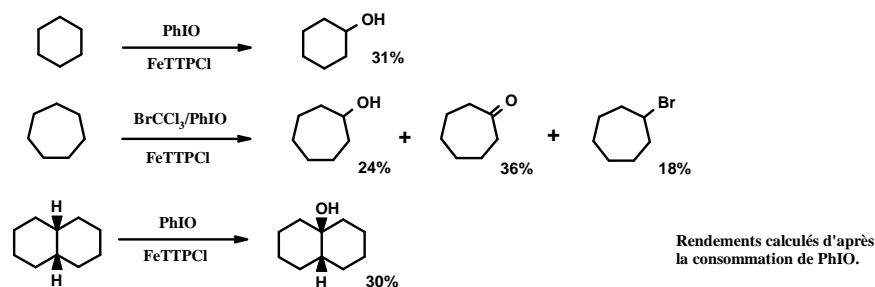
Figure I-26 : (A) Quelques exemples d'époxydations catalysées par des porphyrines de fer (III).⁵⁸
 (B) Schéma du cycle catalytique mettant en jeu une porphyrine de fer (III) dans l'époxydation d'alcènes.⁵⁹

⁵⁸ J. T. Groves, T. E. Nemo, R. S. Myers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101 (4), 1032-1033.

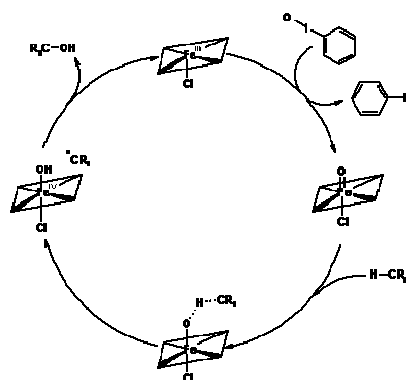
⁵⁹ J. T. Groves, R. S. Myers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 5786.

ii- Hydroxylation d'alcanes

La conversion des alcanes en alcools est un processus industriel difficile pour lequel les métalloporphyrines sont des catalyseurs de choix, assurant l'insertion d'oxygène par l'activation des liaisons C-H à des températures douces.⁶⁰ Les résultats obtenus par Groves sont présentés figure I-27A.⁶¹



A



B

Figure I-27 : (A) Hydroxylation d'alcanes catalysée par FeTPPCl.⁶¹
(B) Schéma du cycle catalytique générant des radicaux alkyles.⁶²

La régiosélectivité avec laquelle la décaline est hydroxylée suggère la formation d'un radical alkyle, ce qui est en accord avec le cycle catalytique présenté figure I-27B. Grâce à l'utilisation des métalloporphyrines de troisième génération, des rendements d'oxydation d'alcanes linéaires (en alcools secondaires et cétones) à hauteur de 80% ont été atteints.⁶³

Des catalyseurs d'oxydations asymétriques sont développés à partir de systèmes métalloporphyriniques chiraux. Il s'agit de porphyrines binaphtyles, à anses de panier ou encore

⁶⁰ M. Filatov, N. Harris, S. Shaik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, No. 23, 3510-3512

⁶¹ J. T. Groves, T. E. Nemo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 6243.

⁶² J.T. Groves, P. Viski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111(22), 8537-8538.

⁶³ D. Mansuy, P. Battioni, *Bioinorganic catalysis*, J. Reedijk Ed., Marcel Dekker, Inc., **1993**, 395-468.

de porphyrines glycosylées.⁶⁴⁻⁶⁵ Ces porphyrines constituent une cupule chirale qui catalyse une conversion de manière stéréosélective. Grieco et Stuck⁶⁶ ont réalisé l'hydroxylation directe et spécifique en position C9 et/ou C12 de 5- α -androstanes (figure I-28).

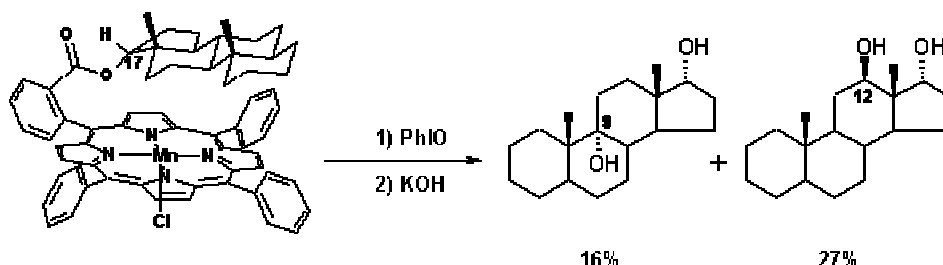


Figure I-28 : Hydroxylations de Grieco et Stuck.⁶⁶

Ils ont ainsi montré que l'hydroxylation de différentes liaisons C-H au sein d'un stéroïde peut être dirigée en faisant varier la longueur de chaîne d'un espaceur qui relie de manière covalente ce substrat à une porphyrine de manganèse (III).

iii- Clivages oxydatifs

D'autres conversions oxydantes de groupes fonctionnels sont réalisées avec des catalyseurs tels que les porphyrines sulfonées métallées par du fer ou du manganèse (MnTPPS).⁶⁷ Par exemple, Haber et coll.⁶⁸ ont étudié la co-oxydation du styrène et de l'isobutyraldéhyde (figure I-29).



Figure I-29 : Co-oxydation du styrène et de l'isobutyraldéhyde catalysée par MnTPPS.⁶⁸

Utilisant comme oxydant le dioxygène atmosphérique (abondant et gratuit), cette réaction catalysée par la MnTPPS a ouvert une intéressante voie pour la conversion des oléfines terminales en aldéhydes.

⁶⁴ D. Mansuy, P. Battioni, J.P. Renaud, P. Guerin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 155, **1985**.

⁶⁵ P. Maillard, J.L. Guerquin-Kern, M. Momenteau, *Tetrahedron Lett.*, 32, 4901, **1991**.

⁶⁶ a) P.A. Grieco, T.L. Stuk, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 7799, **1990**.

b) T.L. Stuk, P.A. Grieco, M.M. March, *J. Org. Chem.*, 56, 2957, **1991**.

⁶⁷ a) G.L. Labat, J.L. Seris, B. Meunier, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 29, 1471, **1990**.

b) B. Meunier, *Chem. Rev.*, 92, 1411, **1992**.

⁶⁸ J. Haber, M. Kosowski, J. Potowicz, *J. Mol. Cat. A: Chem.*, 201, 1-2, **2003**, 167-178.

C- Vers la photodécomposition de l'eau

Les porphyrines peuvent être utilisées pour convertir l'énergie solaire en dihydrogène, carburant propre et renouvelable par photodécomposition de l'eau. Ce processus a fait l'objet de nombreux travaux en raison de son impact potentiel dans le domaine des énergies renouvelables.⁶⁹ Il consiste à exciter par la lumière visible un photosensibilisateur porphyrinique (S) qui va céder un de ses électrons à une substance relais (le méthylviologène, MV) et décomposer l'eau catalytiquement pour fournir du dihydrogène. A l'autre extrémité de la chaîne, un donneur (D) est oxydé en cédant un électron au photosensibilisateur (figure I-30a).

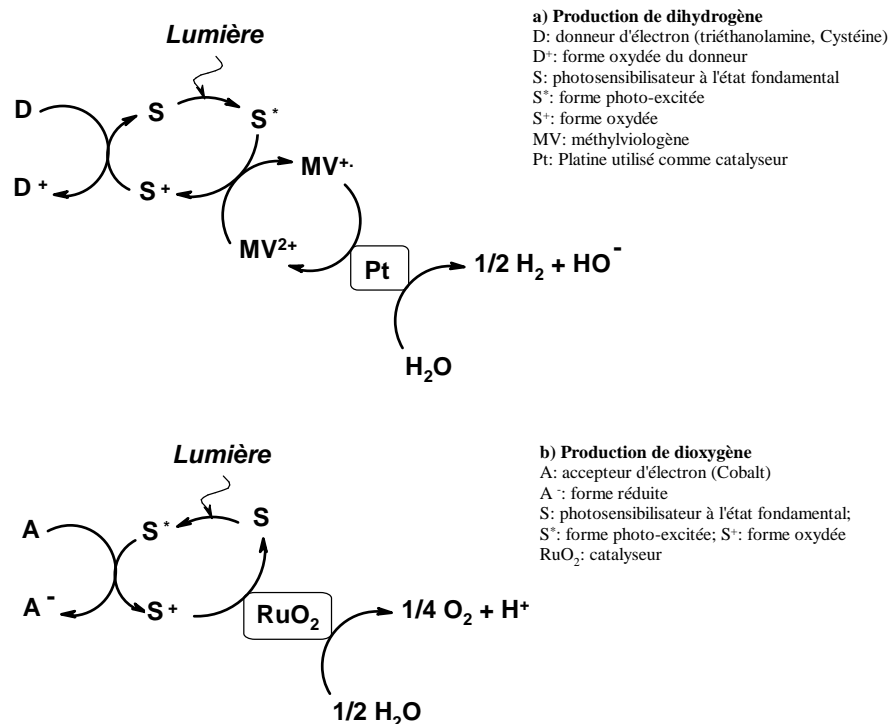


Figure I-30 : Systèmes utilisés pour la photodécomposition de l'eau.

(a) Production de dihydrogène (b) production de dioxygène.

Un tel système peut également être envisagé pour la production de dioxygène à partir d'eau (figure I-30b).⁷⁰ Dans ce cas, au lieu d'être réduite photochimiquement, l'eau est oxydée. Excité par la lumière, le sensibilisateur (S) s'oxyde en cédant son électron à l'accepteur (A). Son retour à l'état fondamental réduit est obtenu par l'oxydation du dioxyde de ruthénium : le métal achève un cycle catalytique par oxydation d'eau, formant ainsi le dioxygène.

⁶⁹ J. M. Lehn, M. Kirch, J.-P. Sauvage, R. Ziessel, *La Recherche*, **1980**, 11, 205.

⁷⁰ L. R. Milgrom ; *The Colors of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford Univ. Press, UK, **1997**, 151.

II- LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE DES CANCERS

L'activation photochimique du dioxygène par les porphyrines génère des espèces hautement réactives dont les applications dépassent le domaine de la synthèse organique : leur grande toxicité cellulaire est exploitée dans le domaine médicale, où elle est notamment dirigée contre les tumeurs cancéreuses, selon la méthode de la photothérapie dynamique. La photothérapie dynamique des cancers (PDT pour *Photo-Dynamic Therapy*) est une méthode curative basée sur l'utilisation d'un agent photosensibilisateur, comme une porphyrine, qui est rendue cytotoxique par exposition à la lumière en présence de dioxygène. Utilisable sur différents types de cancers épithéliaux, 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, la PDT est une méthode efficace et peu traumatisante qui connaît de ce fait un engouement croissant de la part de nombreuses équipes scientifiques et médicales.

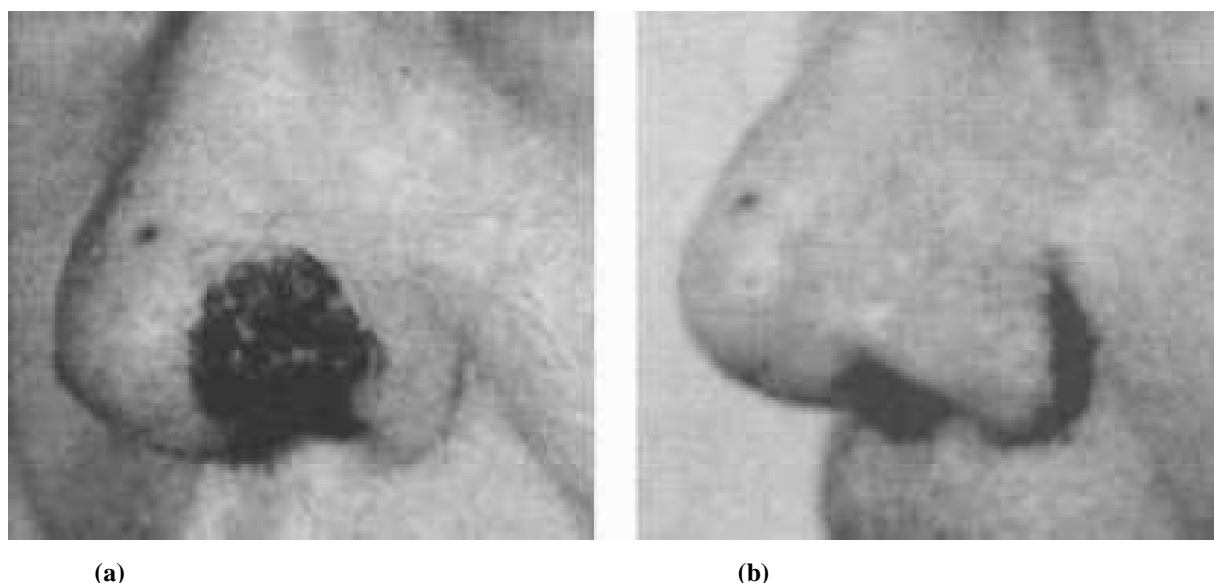


Figure I-31 : Carcinome basocellulaire de la base du nez, avant (a) et un mois après (b) les séances de PDT.

La figure I-31 présente un exemple de résultat obtenu avec la PDT. Ces deux clichés illustrent l'efficacité du traitement et la quasi-absence de cicatrices.

1) Rappel historique

Les médecins allemands Tappeiner et Jesionek ont introduit, en 1903, le concept de photothérapie dynamique (PDT) en traitant un sujet atteint d'un cancer de la peau par l'action combinée de l'éosine et de la lumière solaire.⁷¹ Dix ans plus tard, Meyer-Betz démontre de manière courageuse et spectaculaire l'action photosensibilisatrice de l'hématoporphyrine (Hp) : après l'injection de 200mg de ce composé il constate, sur lui-même, que les effets toxiques ne se développent qu'après exposition à la lumière solaire.⁷² C'est le français Policard, en 1924, qui attribue à l'accumulation de porphyrines endogènes dans les cellules cancéreuses la fluorescence rouge des tumeurs observée sous lumière ultraviolette.⁷³

En 1948, Figge et Weiland proposent d'exploiter la phototoxicité de l'hématoporphyrine (Hp) pour traiter les tumeurs cancéreuses épithéliales.⁷⁴ Cependant, le manque de sélectivité du phototosensibilisateur pour les tissus cancéreux inflige de graves lésions aux tissus sains environnants.⁷⁵ En vue d'atténuer les effets secondaires de la PDT, Lipson et coll. ont pratiqué sur l'Hp commerciale un traitement acide suivi d'une hydrolyse alcaline, obtenant ainsi l'« hématoporphyrine dérivée » (ou HpD).⁷⁶

Dix ans après sa mise au point, l'HpD a contribué au véritable essor de la PDT, grâce aux travaux de Dougherty. En premier lieu, il éradique totalement des tumeurs cutanées chez la souris par l'action de l'HpD et de la lumière rouge d'une lampe à Xénon.⁷⁷ Puis il publie les résultats des premiers essais cliniques en 1978.⁷⁸ A la même période, Weishaupt montre que la photocytotoxicité de ce nouvel agent est due à la production intracellulaire d'oxygène singulet après absorption de l'énergie photonique.⁷⁹

⁷¹ A. Jesionek, H. von Tappeiner, *Munch. Med. Wochenschr.*, **1903**, 41, 2042-2051.

⁷² F. Meyer-Betz, *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, **1913**, 112, 476-503.

⁷³ A. Policard, A. Leulier, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **1924**, 91, 1422-1433.

⁷⁴ F. H. J. Figge, G. S. Weiland, L. O. J. Manganiello, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, 68, 640-641.

⁷⁵ R. L. Lipson, E. J. Baldes, *Arch. Dermatol.*, **1960**, 82, 508-516.

⁷⁶ R.L. Lipson, E.J. Blades, A.M. Olsen, *J. Natl. Cancer I.*, **1961**, 26, 1-12.

⁷⁷ T. J. Dougherty, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1974**, 52, 1133-1136.

⁷⁸ T. J. Dougherty, J. Kaufman, *Cancer Res.*, **1978**, 38(8), 2628-2655.

⁷⁹ K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty, *Cancer Res.*, **1976**, 36, 2326-2329.

2- Principe de la photothérapie dynamique et mécanismes photochimiques du traitement des cancers

Le principe de la thérapie anti-tumorale photodynamique est basé sur l'association d'un photosensibilisateur capable de se concentrer dans les cellules tumorales, et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée. C'est la combinaison de ces deux facteurs qui permet de cibler les cancers épithéliaux (photodiagnostique) et de les détruire (photothérapie). La première étape d'une séance de PDT consiste à introduire, généralement par voie intraveineuse, l'agent photosensibilisateur (figure I-32).

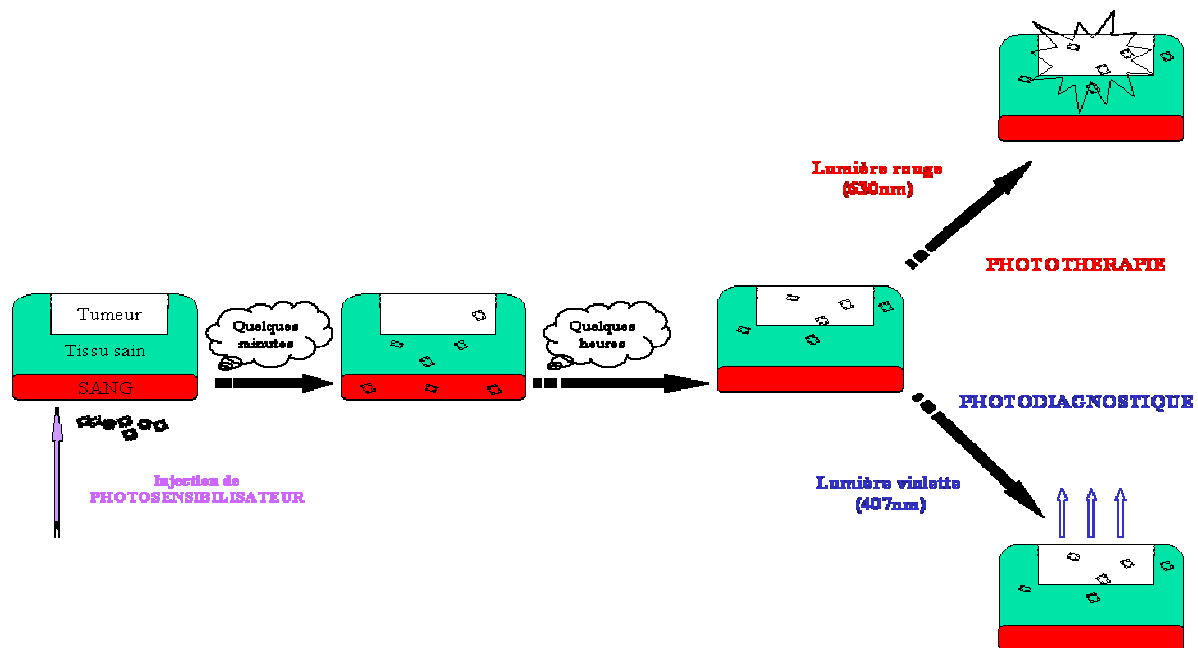


Figure I-32 : Représentation schématique du principe de la photothérapie dynamique.

Un délai de quelques heures est requis pour que l'agent intègre les cellules cancéreuses. Les zones tumorales sont alors éclairées avec une lumière rouge (λ comprise entre 620 et 660nm) afin de favoriser au maximum la pénétration de la lumière dans les tissus pour détruire les cellules malignes siégeant dans leurs couches profondes.

Le photosensibilisateur absorbe un photon, ce qui le conduit dans un état excité : le retour à l'état fondamental peut alors se faire par conversion interne de l'énergie photonique en chaleur, ou bien de l'émission de photons de fluorescence. Mais dans la majorité des cas (plus de 80% pour l'hématoporphyrine⁸⁰), l'agent réalise une conversion intersystème par inversion de spin électronique qui conduit à la formation d'une porphyrine à l'état triplet. Celle-ci peut se désactiver par émission de chaleur, par phosphorescence et surtout par interaction avec son environnement. L'interaction avec les molécules avoisinantes peut se faire selon deux mécanismes (figure I-33).

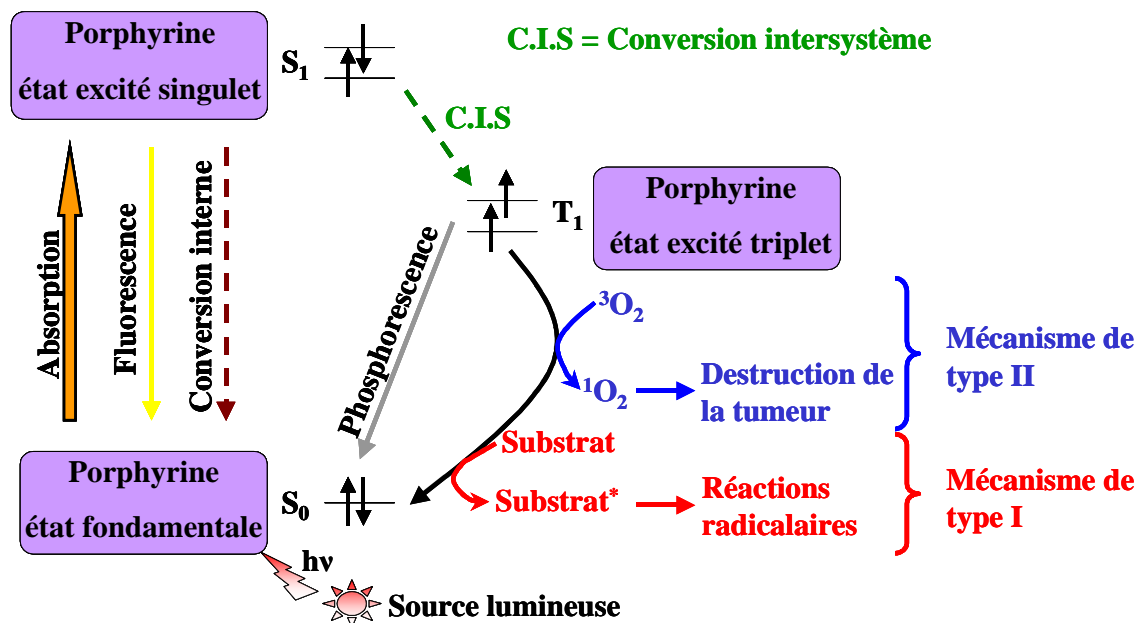


Figure I-33 : Mécanisme photochimique de la PDT⁸¹.

- Le mécanisme de type **I** implique un transfert d'électron du photosensibilisateur vers des substrats biologiques pour former des radicaux libres.
- Le mécanisme de type **II** implique quant à lui le transfert de l'énergie vers le dioxygène moléculaire, qui passe alors de son état fondamental (état triplet : 3O_2) à l'état singulet (1O_2) qui est une forme excitée extrêmement réactive.

⁸⁰ G. Jori, J. D. Spikes, *Photobiochemistry of porphyrins. Topics in photomedicine*. K.C. Smith Ed., Plenum Press, New York **1984**.

⁸¹ R. Bonnett, *New Scientist*, 55, **1989**.

L'efficacité de la PDT est principalement attribuée à la formation d'oxygène singulet. La cytotoxicité de l'oxygène singulet est due à son extrême électrophilie : il s'additionne sur les liaisons π de toutes les biomolécules l'entourant (phospholipides membranaires, acides aminés, bases nucléiques⁸²). Cette extrême réactivité explique la très courte durée de vie de l'oxygène singulet (de l'ordre de la nanoseconde) et son court rayon d'action qui se limite à son site de formation.⁸³ La mort cellulaire survient à la suite de lésions nucléaires (ADN et protéines) ou de lésions membranaires infligées à certains organites cytosoliques (mitochondries et lysosomes).

3- Les photosensibilisateurs utilisés en PDT

Les molécules utilisées en PDT des cancers sont essentiellement des photosensibilisateurs tétrapyrroliques. Initialement, l'arsenal thérapeutique s'est constitué autour de porphyrines d'origine animale. Leur utilisation a permis de mieux définir les propriétés que doit réunir un agent thérapeutique adapté, ce qui a donné lieu à l'introduction d'une seconde génération de photosensibilisateurs. Efficaces, ces molécules de synthèse sont actuellement en usage clinique : les recherches s'orientent maintenant sur leur combinaison avec des groupements de vectorisation, afin d'obtenir des photosensibilisateurs sélectifs.

A- Les photosensibilisateurs de première génération

Les photosensibilisateurs de première génération (figure I-34) regroupent l'hémato-porphyrine (Hp) (a) qui s'obtient à partir du sang soumis à des conditions acides, et ses dérivés que sont l'« hématorporphyrine dérivée » (HpD), et le Photofrin[®] (b).

L'HpD est obtenu par acétylation de l'hématorporphyrine (produit du traitement à l'acide acétique en présence d'acide sulfurique) suivi d'une saponification. Il s'agit d'un mélange complexe : l'analyse par HPLC révèle la présence de plusieurs monomères parmi lesquels l'hématorporphyrine (20%), l'hydroxy-éthyl-vinyl-deutéro-porphyrine (20-30%) ou encore la

⁸²E. D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brückner ; *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151-4202.

⁸³J. Moan ; *Photochem. Photobiol.*, **1990**, 6, 343-347.

protoporphyrine (3-5%) mais aussi de nombreux oligomères (de 2 à plus de 10 unités) formés de ponts éthers, esters ou carbone-carbone

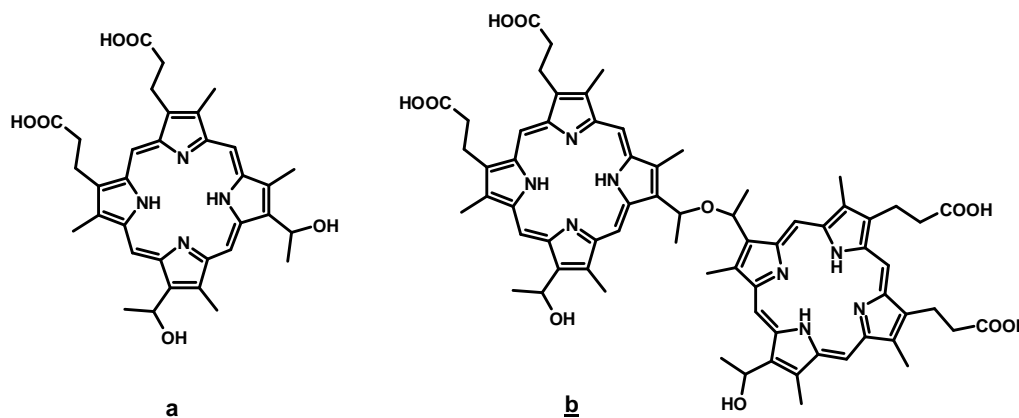


Figure I-34 : Photosensibilisateurs de première génération :

a- Structure de l'hématoporphyrine. **b-** Ether de dihématoporphyrine, une des structures actives du Photofrin®.

En 1984, par purification partielle du HpD, Dougherty et *coll.* ont obtenu un mélange enrichi en oligomères porphyriniques, appelé Photofrin®.⁸⁴ Par la suite, ils ont montré que seuls les dimères et trimères d'hématoporphyrine qui sont formés par des ponts éthers constituent la fraction active du Photofrin®. Ces premiers agents sont incontestablement phototoxiques. Cependant, il s'agit de mélanges complexes mal définis, ce qui pose certains problèmes :

- la préparation d'un échantillon n'est pas reproductible et il est donc difficile d'obtenir les mêmes propriétés photodynamiques d'un lot médicamenteux à l'autre.
- leur durée de vie dans l'organisme est importante (de 3 à 5 semaines) entraînant une photosensibilisation du patient qui doit être maintenue en chambre noire pendant encore quatre à huit semaines après l'acte thérapeutique.⁸⁵
- Leur faible sélectivité pour les cellules malignes nécessite une application lumineuse extrêmement précise, faute de quoi, les tissus sains avoisinants sont sérieusement endommagés.
- leur indication reste limitée aux traitements de tumeurs épithéliales superficielles (dans les cancers des bronches et de l'œsophage) car les photons les plus efficaces pour exciter ces sensibilisateurs ($\lambda=420\text{nm}$) sont peu pénétrants.

⁸⁴ T. J. Dougherty; W. R. Potter, K. R. Weishaupt, *Progress in Clinical and Biological Research*, **1984**, 170, 301-314.

⁸⁵ M. M. Ressler, R. K. Pandey ; *CHEMTECH*, **1998**, 28, 39-45.

A partir de ces observations et dans le but de pallier de tels inconvénients, les caractéristiques du photosensibilisateur idéal ont été définies. Celui-ci doit :

- être de structure chimique parfaitement définie et de synthèse reproductible, transposable à une grande échelle avec un coût le plus faible possible,
- être non cytotoxique à l'obscurité,
- se concentrer préférentiellement dans les cellules tumorales et être éliminé le plus rapidement possible des tissus sains pour ne pas générer d'effets secondaires,
- avoir une forte réactivité photochimique à l'état triplet pour produire efficacement de l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$. De plus, il ne doit pas s'agréger dans le milieu cellulaire (ce qui entraîne une forte diminution du rendement de formation de $^1\text{O}_2$),
- posséder une forte absorption de la lumière rouge ($\lambda > 650 \text{ nm}$) afin que l'effet thérapeutique soit le plus profond possible,
- être stable vis-à-vis des enzymes circulantes et de la lumière d'irradiation afin d'atteindre les cellules tumorales intactes et de ne pas être dégradé trop rapidement pendant l'illumination.

B- Les photosensibilisateurs de seconde génération

La mise au point de photosensibilisateurs dits de « seconde génération » est donc apparue indispensable. Nouvellement introduits en thérapie anti-cancéreuse, ces agents sont plus efficaces et moins contraignants que leurs prédécesseurs. En effet, ces molécules absorbent fortement dans le rouge et s'éliminent plus rapidement de l'organisme que le Photofrin[®]. Cette seconde génération de photosensibilisateurs comprend plusieurs familles de molécules telles que les porphyrines (o-THPP), les chlorines (Foscan[®]), les purpurines (Purlytin[®]), les texaphyrines (Xcytrin[®], Lutrin[®]) ou encore les précurseurs de porphyrines endogènes (5-ALA).

La tétra-(*m*éta-hydroxyphényl)chlorine (*m*-THPC), disponible en France depuis 2002 sous le nom de Foscan[®] (figure I-35) est la molécule la plus active, vis-à-vis de la PDT, d'une série d'analogues *méso*-tétrahydroxyphénylchlorines et porphyrines.

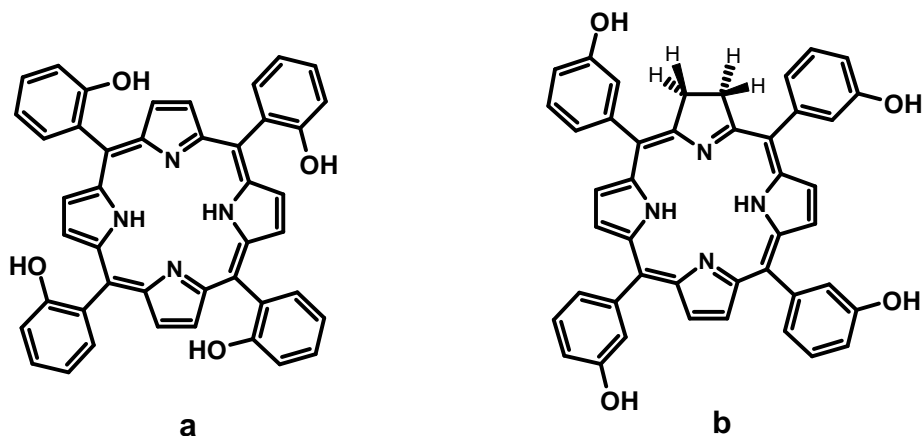


Figure I-35 : Photosensibilisateurs de seconde génération :

(a) o-THPP, (b) le Foscan[®](*m*-THPC).

En comparaison avec son analogue porphyrinique (a), le Foscan[®] (b) absorbe plus fortement la lumière rouge et possède une durée de vie à l'état triplet sensiblement plus longue, ce qui permet la production d'un plus grand nombre d'espèces réactives oxygénées. Même à de faibles concentrations, cette chlorine présente une réponse photodynamique satisfaisante, $\lambda_{\max} = 652\text{nm}$ ($\epsilon = 29600\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$).⁸⁶ Cependant, le Foscan[®] reste un photosensibilisateur peu sélectif vis-à-vis des cellules cancéreuses : l'éclairage de la cible doit être réalisé avec la plus grande précision afin d'épargner les tissus sains avoisinants, au prix de quoi ce composé s'est avéré être un bon candidat pour le traitement des cancers de la prostate ou du pancréas.⁸⁷⁻⁸⁸

Des dérivés de la **chlorophylle** sont également étudiés pour leur application en PDT, notamment la L-aspartylchlorine e6 (figure I-36) qui possède d'intéressantes propriétés pharmacocinétiques, absorbe la lumière rouge ($\lambda_{\max} = 660\text{nm}$) et s'avère relativement sélective. En effet, des travaux effectués sur des souris mettent en évidence une fluorescence tumorale cinq fois supérieure à celle des autres tissus, 72 heures après l'injection.⁸⁹ Proposé dans le traitement de tumeurs cutanées, ce composé est en phase I et II d'études pré-cliniques.⁹⁰

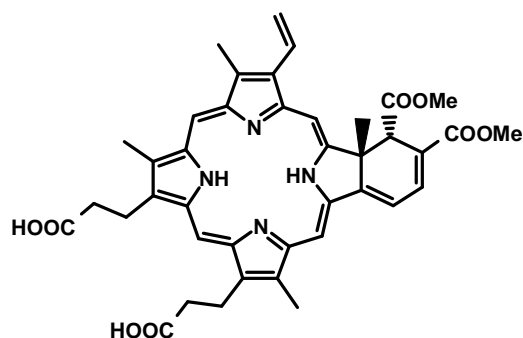
⁸⁶ R. Bonnett, B. D. Djelal, A. Nguyen, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5, 652-661.

⁸⁷ T. R. Nathan, D. E. Whitelaw, S. C. Chang, W. R. Lees, P. M. Ripley, H. Payne, M. C. Parkinson, M. Emberton, A. R. Gilliams, A. R. Mundy, S. G. Bown, *J. Urology*, **2002**, 168, 1427-1432.

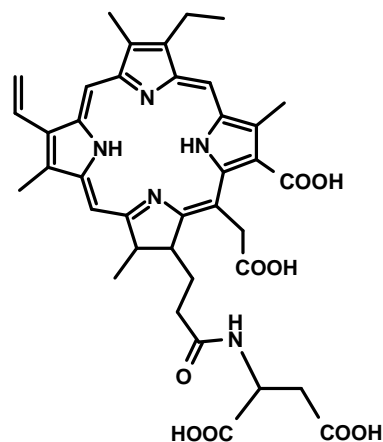
⁸⁸ S. G. Bown, A. Z. Rogowska, D. E. Whitelaw, W. R. Lees, L. B. Lovat, P. Ripley, L. Jones, P. Wyld, A. Gilliams, A. W. R. Hatfield, *Gut*, **2002**, 50, 549-557.

⁸⁹ G. A. Kostenich, I. N. Zhuravkin, E. A. Zhavrid, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 22, 211-217.

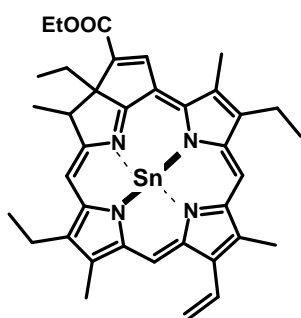
⁹⁰ T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 58, 895-900.



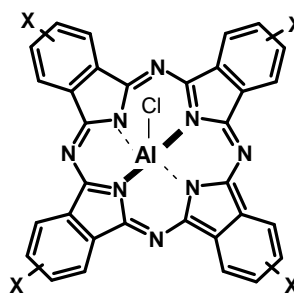
Benzoporphyrine dérivé
(BZP-MA; λ_{\max} = 690nm)



L-Aspartylchlorine e6
(NPe6; λ_{\max} = 654nm)



Ethylétiopurpurine d'étain
(SnEt₂; λ_{\max} = 650nm)



Phthalocyanine d'aluminium
(X= -H, -SO₃Na; λ_{\max} = 675nm)

Figure I-36 : Une sélection de photosensibilisateurs de seconde génération.

Les *benzoporphyrines* ou encore les *phthalocyanines*, macrocycles tétrapyrroliques étendus, sont également d'excellents candidats pour la photothérapie dynamique (figure I-36). Ces molécules présentent une absorption importante aux grandes longueurs d'ondes et sont généralement plus stables que les chlorines.

Les *purpurines* sont des molécules de la famille des chlorines : elles possèdent un cycle fusionné au squelette porphyrinique de base et absorbent la lumière rouge. Par rapport aux chlorines synthétiques, l'exocycle est à l'origine d'une stabilité *in vivo* satisfaisante. Ainsi, l'éthylétiopurpurine d'étain (figure I-36) est commercialisé sous le nom de Purlytin[®]. Il est étudié

pour les cancers de la prostate, et il est utilisé pour traiter la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).⁹¹

Contrairement aux porphyrines, *les texaphyrines* sont des composés tripyrroliques et possèdent cinq azotes internes. Ces molécules peuvent être complexées avec une large série de métaux, et notamment avec les lanthanides. Plusieurs molécules de ce type sont actuellement commercialisées (figure I-37). L'Xcytrin[®], dérivé du Gadolinium (III) est utilisé contre des tumeurs métastatiques du cerveau ; le Lutrin[®], dérivé du Lutetium (III) est préconisé dans les cancers récurrents du sein.

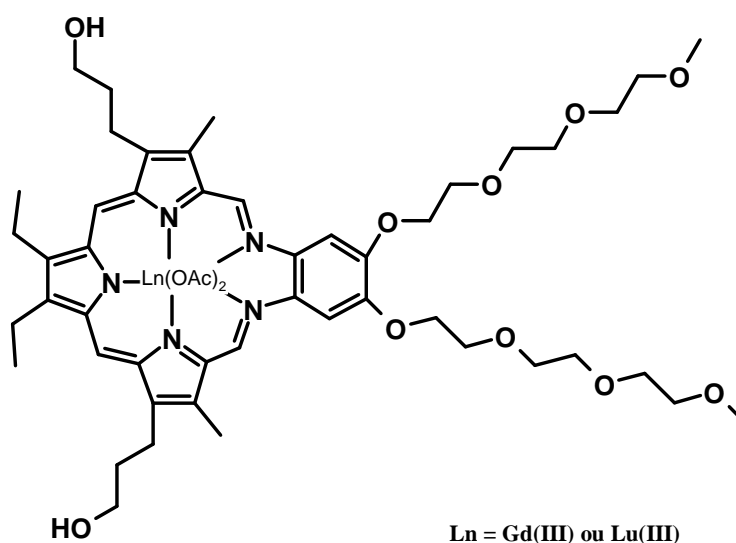


Figure I-37 : Structure du Xcytrin[®] et du Lutrin[®].

Ces métallotexaphyrines présentent une forte bande d'absorption entre 730 et 770 nm, permettant une bonne pénétration lumineuse à travers les tissus. De plus, l'état triplet relativement long de ces composés amène une production efficace d'oxygène singulet.⁹² L'irradiation peut être effectuée trois heures après l'injection et leur élimination rapide assure une photosensibilité réduite du patient.

Une autre approche utilisée en PDT exploite la phototoxicité de porphyrines endogènes. La biosynthèse de l'hème, groupement prosthétique de l'hémoglobine, est schématisé figure I-38.

⁹¹ S. H. Selman, D. Albrecht, R. W. Keck, P. Brennan, S. Kond, *J. Urology*, **2001**, 165, 1795-1801.

⁹² J. L. Sessler, R. A. Miller, *Biochem. Pharm.*, **2000**, 59, 733-739.

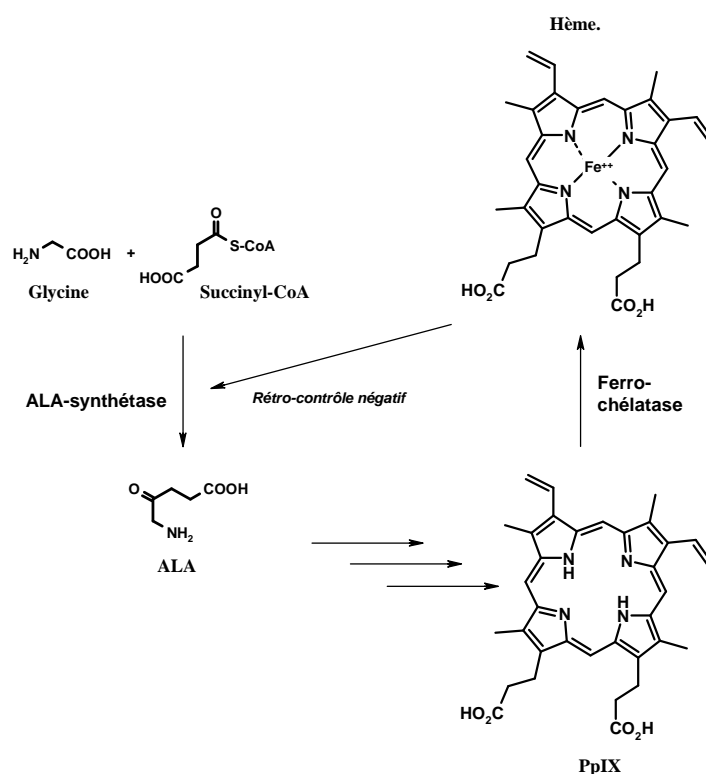


Figure I-38 : Biosynthèse de la protoporphyrine IX à partir de l'acide 5-amino-lévulinique.

L'acide 5-aminolévulinique (ALA) est le précurseur de la protoporphyrine IX (Pp-IX) qui est le photosensibilisateur impliqué au cours de ce traitement par PDT. Dans la cellule, la biosynthèse de l'hème est finement contrôlée : lorsque la concentration en hème est suffisante (de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-7} M en conditions physiologiques), elle exerce un rétrocontrôle négatif par inhibition de l'ALA-synthétase. L'administration d'ALA exogène court-circuite ce système régulateur : rapidement, les fortes concentrations intracellulaires d'ALA sont diminuées par conversion en Pp-IX. La ferrochélatase, en revanche, ne peut pas assurer aussi rapidement la synthèse de l'hème, ce qui conduit irrémédiablement à l'accumulation délétère de Pp-IX dans la cellule. L'acide 5-aminolévulinique (ALA), commercialisé sous l'appellation Lévilan® (AMM en France en 2000) est principalement utilisé en dermatologie, en application locale suivie d'une irradiation avec une lumière de longueur d'onde $\lambda = 635$ nm, en traitement des maladies de peau telles que le psoriasis ou des kératoses actiniques (lésions cancéreuse de la peau).⁹³

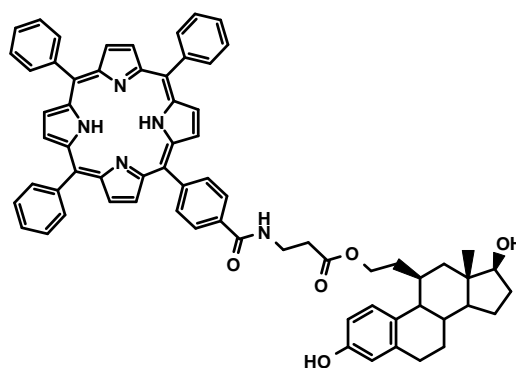
⁹³ R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C. J. H. Childs, C. H. Sibata ; *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2004**, 1, 27-42

L'introduction des photosensibilisateurs de seconde génération marque d'importantes avancées thérapeutiques, mais ces agents manquent encore de sélectivité : ils ne seront parfaitement efficaces et bien tolérés que s'ils possèdent la capacité de se concentrer spécifiquement en zones utiles. Dans le but d'augmenter l'affinité et la spécificité des agents photosensibilisateurs vis-à-vis des sites tumoraux, le greffage sur le macrocycle de substituants d'adressage se révèle être une excellente approche. Les composés ainsi développés représentent la dernière génération de photosensibilisateurs.

C- Les photosensibilisateurs de troisième génération.

La dernière génération de photosensibilisateurs est actuellement en cours de développement. Ce sont des *méso*-porphyrines substituées par des motifs de vectorisation et d'adressage, qui dérivent de ligands naturels spécifiquement reconnus par les cellules cancéreuses. Ces biomolécules peuvent être des stéroïdes, des sucres, des amines, des acides aminés ou des peptides : nous en proposons quelques exemples ci-dessous.

Le complexe estradiol-porphyrine⁹⁴⁻⁹⁵.

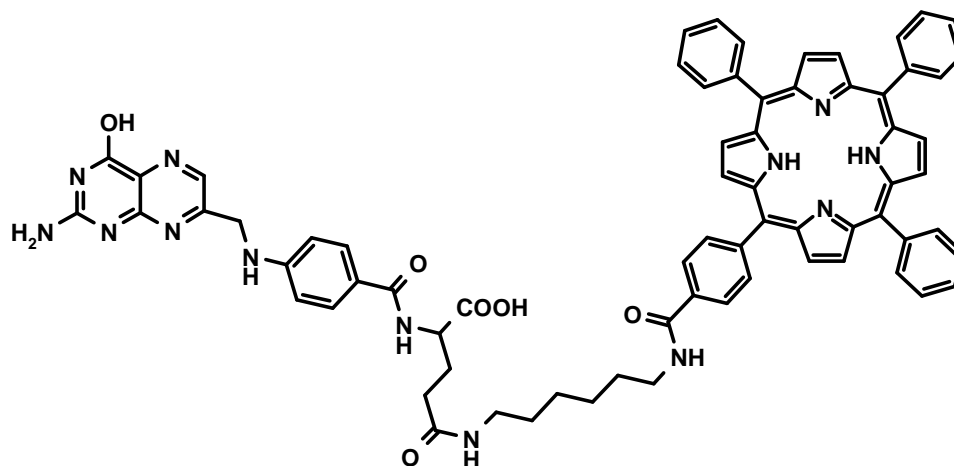


Ce noyau de type tétraphénylporphyrine relié à l'estradiol par l'intermédiaire d'un bras espaceur est reconnu spécifiquement par les récepteurs de l'œstrogène, surexprimés par les cellules tumorales dans certains cancers (cerveau, sein, ovaire). Mais l'activité photodynamique reste encore faible et d'autres types de photosensibilisateurs (de type chlorine) sont à l'étude.

⁹⁴ D. James, N. Swamy, N. Paz, R. Hanson, R. Ray, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* (1999), 9 (16), 2379-2384.

⁹⁵ N. Swamy, D. James, S.C. Mhor, R. Hanson, R. Ray ; *Bioorganic & Medical Chemistry* (2002), 10(10), 3237-3243.

Le complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique⁹⁶



Il s'agit d'une molécule ciblant les récepteurs de l'acide folique, surexprimés à la surface de nombreuses cellules cancéreuses (cancers du cerveau, des gonades, du poumon...) et constituant des cibles privilégiées. Cette molécule possède une forte activité photodynamique et la forte affinité de la molécule est établie *in vitro* pour ces récepteurs, mais le mécanisme du transport de l'acide folique à l'intérieur des cellules n'est pas élucidé.

Les photosensibilisateurs glycoconjugués

Des *méso*-porphyrines glycosylées ont été conçues et synthétisées au LCSN pour le ciblage des lectines, récepteurs transmembranaires surexprimés par les cellules cancéreuses.⁹⁷ Ces récepteurs reconnaissent spécifiquement un sucre ; par exemple le récepteur lectine DC-SIGN est spécifique du mannose. On distingue les porphyrines glycosylées par la position de substitution sur le macrocycle et le type de liaison dans laquelle l'unité osidique est engagée. Par exemple, en position *méso* du macrocycle, l'unité glucidique peut être directement fixée par une liaison carbone-carbone⁹⁸, ou par l'intermédiaire d'un groupe arylique⁹⁹, ce dernier pouvant même être porteur d'un bras jouant le rôle d'un espaceur additionnel.¹⁰⁰

⁹⁶ R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemain, J.-F. Müller, M. Barberi-Heyob, *Bioorg. Med. Chem.*, 13, (2005), 2799-2808.

⁹⁷ C. Kaldapa, J. C. Blais, V. Carré, R. Granet, V. Sol, M. Guilloton, M. Spiro, and P. Krausz, *Tetrahedron Lett.*, 41, 331-335, 2000.

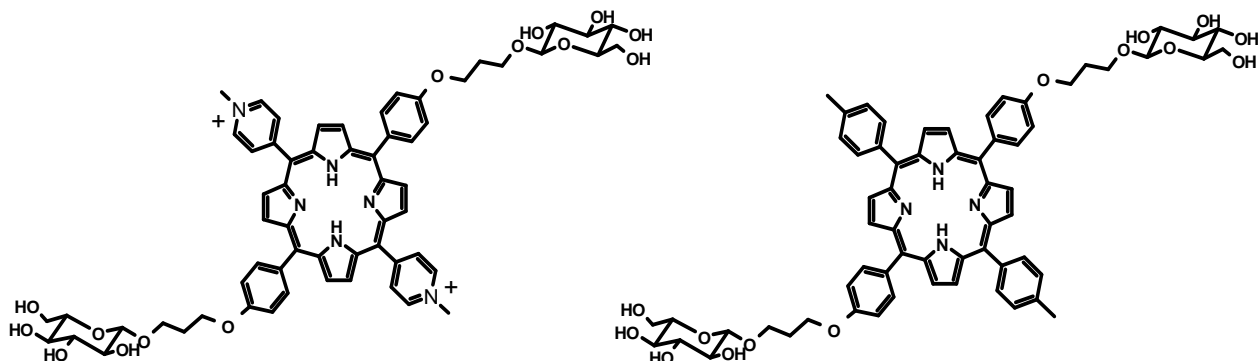
⁹⁸ a) N. Ono, M. Bougauchi, K. Maruyama, *Tetrahedron Lett.*, 33, 1629, 1992.

b) G. Gasiraghi, M. Cornia, R. Bortolini, *J. Org. Chem.*, 59, 1801, 1994.

⁹⁹ D. Oulmi, P. Maillard, J.-L. Guerquin-Kern, *J. Org. Chem.*, 60, 1554, 1995.

¹⁰⁰ a) O. Gaud, R. Granet, M. Kaouadji, P. Krausz, J.C. Blais, G. Bolbach, *Can. J. Chem.* 74, 481, 1996.

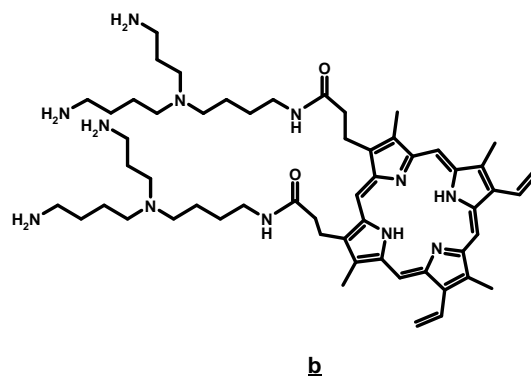
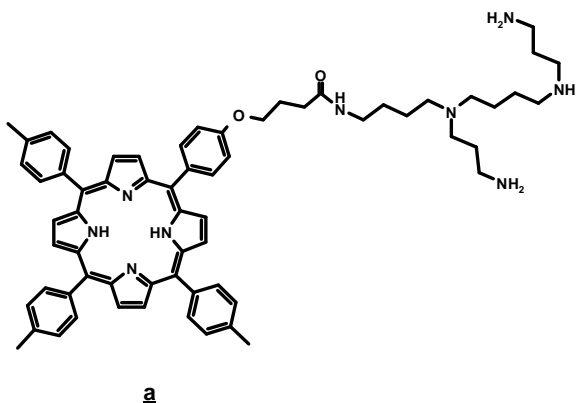
b) M. Momenteau, P. Maillard, M.-A. De Bélinay, D. Carrez, A. Croisy, *J. Biomed. Optics*, 4, 298, 1999.



Exemples de *méso*-porphyrines glycosylées phototoxiques préparées au LCSN.

L'étude de la phototoxicité *in vitro* montre que les macrocycles substitués par deux ou trois monosaccharides sont les plus cytotoxiques. On pourra noter que le remplacement d'un monosaccharide par un disaccharide diminue, voire supprime totalement l'action phototoxique.

Les *méso*-tritolylporphyrine et protoporphyrine IX conjuguées à des motifs polyaminés¹⁰¹



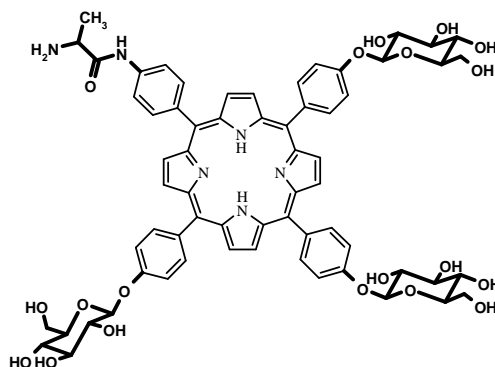
Des porphyrines porteuses de motifs spermine ou spermidine ont été conçues et synthétisées afin de viser la métabolisation de ces polyamines qui est anormalement élevé chez les cellules malignes dont l'activité mitotique est intense.¹⁰² Ces composés sont actuellement en cours d'évaluation.

¹⁰¹ V. Sol, F. Lamarche, G. Garcia, M. Enache, R. Granet, M. Guilloton, J.C. Blais and Pierre Krausz, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, **2006**, 1364-1377.

¹⁰² R.A. Casero, P.M. Woster, *J. Med. Chem.*, 4, **2001**, 1-25.

Les porphyrines peptidiques

Dans un premier temps, notre laboratoire a préparé des *méso*-porphyrines glycosylées portant un ou plusieurs acides aminés (alanine) pour cibler les sites de transport des acides aminés essentiels.¹⁰³ Dans cette approche, les sucres n'ont pas un rôle de reconnaissance mais servent à augmenter la biodisponibilité de l'agent photosensibilisateur.



Porphyrine triglycosylée portant un résidu alanine.

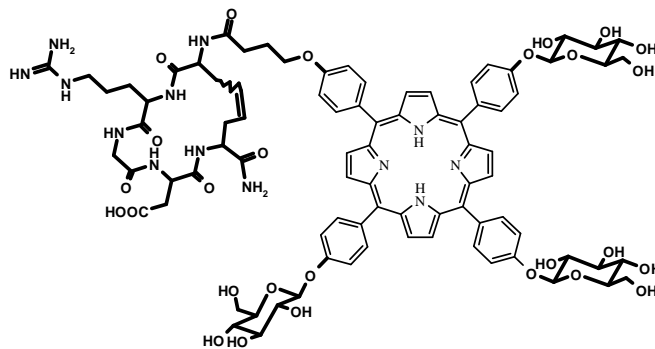
Notre laboratoire a également visé une autre cible biologique, la *néo*angiogenèse tumorale. Dans ce but, une molécule à trois résidus glucosyles portant la séquence RGD via un bras espaceur a été synthétisée. La courte séquence RGD (arginine-glycine-aspartate) est un motif peptidique qui a été greffé sur le macrocycle porphyrinique afin de cibler les intégrines $\alpha_v\beta_3$ notamment présentes dans la matrice extracellulaire des *néo*vaisseaux en périphérie des tumeurs solides.¹⁰⁴ L'affinité du photosensibilisateur *méso*-porphyrinique a ainsi été augmentée, tout en conservant ses propriétés photosensibilisatrices.¹⁰⁵ La séquence linéaire s'est avérée fragile (facilement hydrolysable par les peptidases), ce qui nous a orienté vers la préparation de la même séquence, mais sous forme cyclique, beaucoup plus stable.¹⁰⁶

¹⁰³ V. Sol, J. C. Blais, V. Carre, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 4431-4444.

¹⁰⁴ C. Frochot, B. Distasio, R. Vandresse, J.M. Belgy, M. Dodeller, F. Guillemain, M. L. Viriot, M. Barberi-Heyod, *Bioorg.Chem.*, 35 (2007) 205-220.

¹⁰⁵ V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1486-1493

¹⁰⁶ V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, *Tetrahedron Lett.* 45 (2004) 5295-5299



Complexe triglycosylporphyrine-RGDcyclisé.

Cependant, le caractère ubiquitaire des intégrines est un obstacle pour obtenir une sélectivité idéale avec le motif RGD. Actuellement, la *néoangiogenèse* est considérée comme une cible prometteuse dans le champ de la cancérologie, tant pour la thérapie que le diagnostique. C'est la connaissance que nous avons des mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus spécifiquement actif au niveau des zones tumorales qui nous a permis de choisir une cible moléculaire caractéristique.

III- LA NEO-ANGIOGENESE TUMORALE

1) Définition et enjeux de la *néo*-angiogenèse

L'angiogenèse est le processus biologique par lequel un vaisseau sanguin donne naissance à un nouveau capillaire.¹⁰⁷⁻¹⁰⁸ Crucial lors du développement embryonnaire, ce phénomène physiologique étroitement régulé se raréfie par la suite et reste localisé, dans les tissus, au niveau des zones en réparation, au cours du cycle menstruel ou lors des processus cicatriciels, suite à une blessure.¹⁰⁹⁻¹¹⁰

Relativement peu fréquente et très localisée chez l'adulte sain, la *néo*angiogenèse est invariablement observée au niveau des tumeurs cancéreuses solides, qu'elles soient primaires ou métastatiques.¹¹¹ C'est dans les années 70 que les travaux de Folkman et *Coll.*¹¹² ont mis en évidence l'origine et le rôle pathologique de la *néo*angiogenèse : elle est induite par les tumeurs pour former une néo-vascularisation qui garantit leur développement et leur survie en assurant l'apport d'oxygène, de nutriments et le drainage des produits de leurs métabolismes.

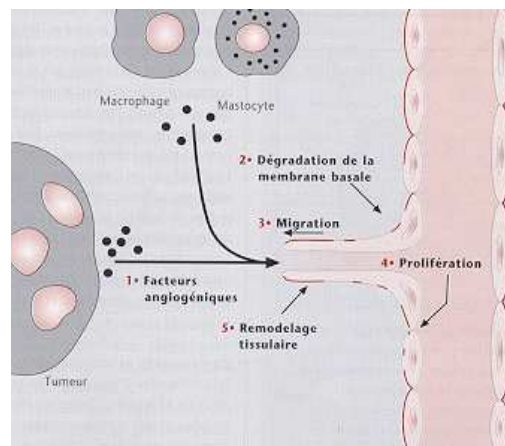


Figure I-39: Schémas de la réponse *néo*angiogénique

L'angiogenèse est une réponse biologique des cellules endothéliales à un signal extra-cellulaire (figure I-39). La sécrétion de facteurs de croissance par les cellules tumorales [1], provoque la prolifération des cellules endothéliales [4], qui s'orientent par chimiotactisme vers la cellule cancéreuse [3] en sécrétant des métalloprotéinases, indispensables à la dégradation de la matrice extra-cellulaire [2] ; et constituent un nouveau capillaire, très perméable [5].

¹⁰⁷ G. Bergers and L. E. Benjamin., *Nat. Rev. Cancer*, 3, 401-410 (2003).

¹⁰⁸ R. Kalluri., *Nat. Rev. Cancer*, 3, 422-433 (2003).

¹⁰⁹ L. P. Reynolds, A. T. Grazul-Bilska, and D. A. Redmer, *Int. J. Exp. Pathol.*, 83, 151 (2002).

¹¹⁰ J. Li, Y.-P. Zang, and R. Kirsner, *Micros. Res. Tech.*, vol. 60, 107-114 (2003).

¹¹¹ J. Folkman, *Nat. Med.*, 1, 27-31 (1995).

¹¹² J. Folkman, *New England Journal of Medicine*, 1971, 285, 1182-1186.

2) Mécanismes moléculaires impliqués

A- Les récepteurs endothéliaux de la néoangiogenèse

La réponse des endothélicytes est provoquée par ligation d'un facteur de croissance sur la partie extracellulaire de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine-kinase : les **RTK** (*Receptor with Tyrosine Kinase activity*).

Cette famille de récepteurs à activité enzymatique (figure I-40) est connue pour engendrer la réponse cellulaire par homo-dimérisation : la reconnaissance du ligand provoque le rapprochement des domaines extracellulaires de deux récepteurs à l'état monomères, entraînant la mise en relation étroite de leur domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase. Ce rapprochement spatial des domaines intracellulaires désinhibe leur activité catalytique : ils se phosphorylent alors mutuellement, au niveau de résidus tyrosines. Cette *trans*-phosphorylation exacerbe leur activité phosphoryl-transférase, les rendant aptes à phosphoryler des protéines cytosoliques. C'est ainsi que s'amorce une cascade de phosphorylations entre protéines intracellulaires, qui permet la transduction d'un signal extracellulaire jusqu'au noyau qui pourra, dès lors, engendrer la réponse cellulaire adéquate (mitoses par exemple).

En conditions physiologiques, l'expression de ces récepteurs est réprimée, mais elle est réversible en cas de besoin : ainsi en conditions anoxiques, on observe une augmentation de leur densité sur les membranes endothélicytaires. Lors du phénomène d'angiogenèse, le principal facteur, appelé VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) est reconnu par deux types de récepteurs

- Les **Flt-1** (Fms-like tyrosine kinase), encore appelés « VEGFR1 »,
- Les **KDR** (Kinase Domain Receptor), ou « VEGFR2 ».

Il a été démontré que c'est surtout l'interaction VEGF/KDR qui joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la néoangiogenèse tumorale¹¹³.

¹¹³ G.-H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein, and M. L. Breitman, *Nature* 376:66-74 (1997).

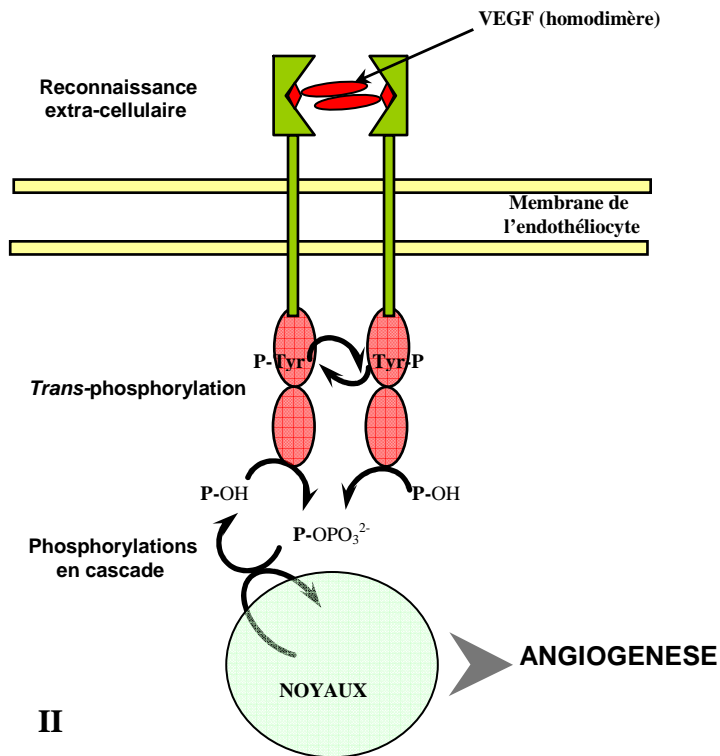
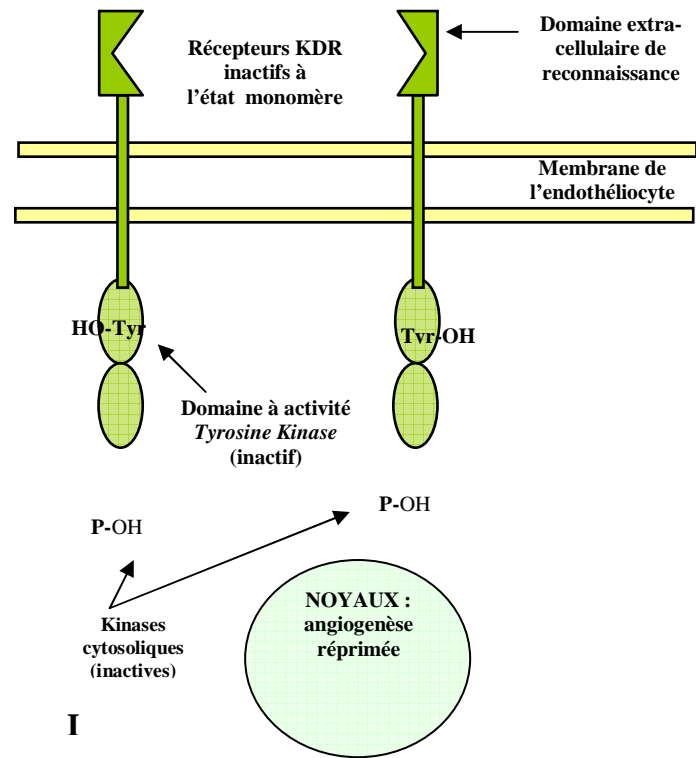


Figure I-40: Présentation schématique de récepteurs endothélicytaires KDR :
 I- Sous forme inactive (monomère). II- Sous forme active.

B- Facteur de croissance régulateur : le VEGF

Plusieurs facteurs de croissances sont impliqués dans la régulation de cette fonction biologique. Plus particulièrement, le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire, nommé **VEGF** (*Vascular Endothelial Growth Factor*) apparaît comme le facteur clé de la régulation de l'angiogenèse.¹¹⁴ En effet, l'inhibition de l'activité du VEGF provoque l'arrêt de la croissance tumorale *in vivo*.¹¹⁵

L'épissage alternatif est à l'origine de plusieurs isoformes de VEGF, le plus actif étant le VEGF₁₆₅. Il s'agit d'un glycopeptide de 165 acides aminés qui n'est actif que sous la forme de dimère. Sa structure tridimensionnelle (figure I-41) a été décrite en 1997 par diffraction des rayons X.¹¹⁶

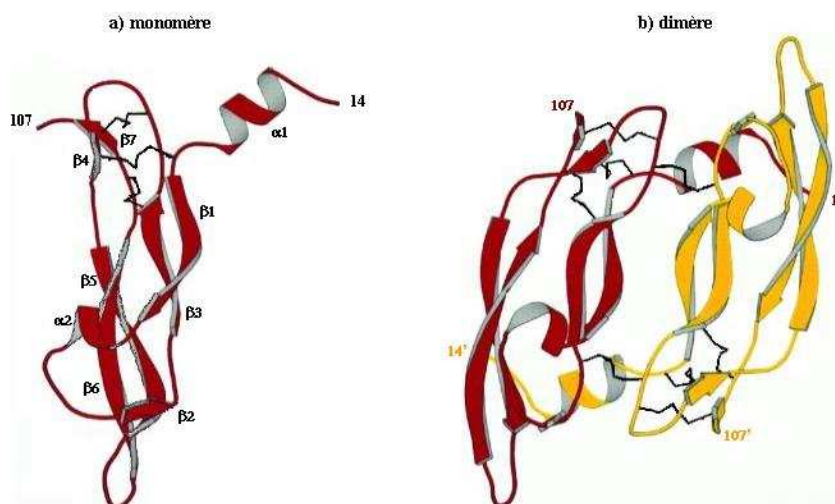


Figure I-41 : Représentation « en ruban » de la structure secondaire du VEGF.¹²⁴

(a) Sous forme de monomère, inactif ; (b) Homodimère de VEGF qui est la forme active.

L'étude des relations *Structures - Activité* a été menée par la technique de mutagenèse dirigée, aboutissant à la mise en évidence de la séquence indispensable à l'activité biologique du VEGF¹¹⁷ (figure I-42).

¹¹⁴ a) N. Ferrara, K. Houck, L. Jakeman, and D. W. Leung, *Endocr. Rev.*, 13, 18-32 (1992).

b) N. Ferrara, *Kidney Int.*, 56, 794-814 (1999).

c) A. Bikfalvi, R. Bicknell, *Trends Pharmacol. Sci.*, 23, 576-582 (2002).

¹¹⁵ K. J. Kim, B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips, and N. Ferrara, *Nature* 362, 841-844 (1993).

¹¹⁶ Y. M. Muller, *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, 94, 7192-7197 (1997).

¹¹⁷ B. A. Keyt, H. V. Nguyen, L. T. Berleau, C. M. Duarte, J. Parke, H. Chen, and N. Ferrara, *J. Biol. Chem.*, 271, 5638-5646 (1996).

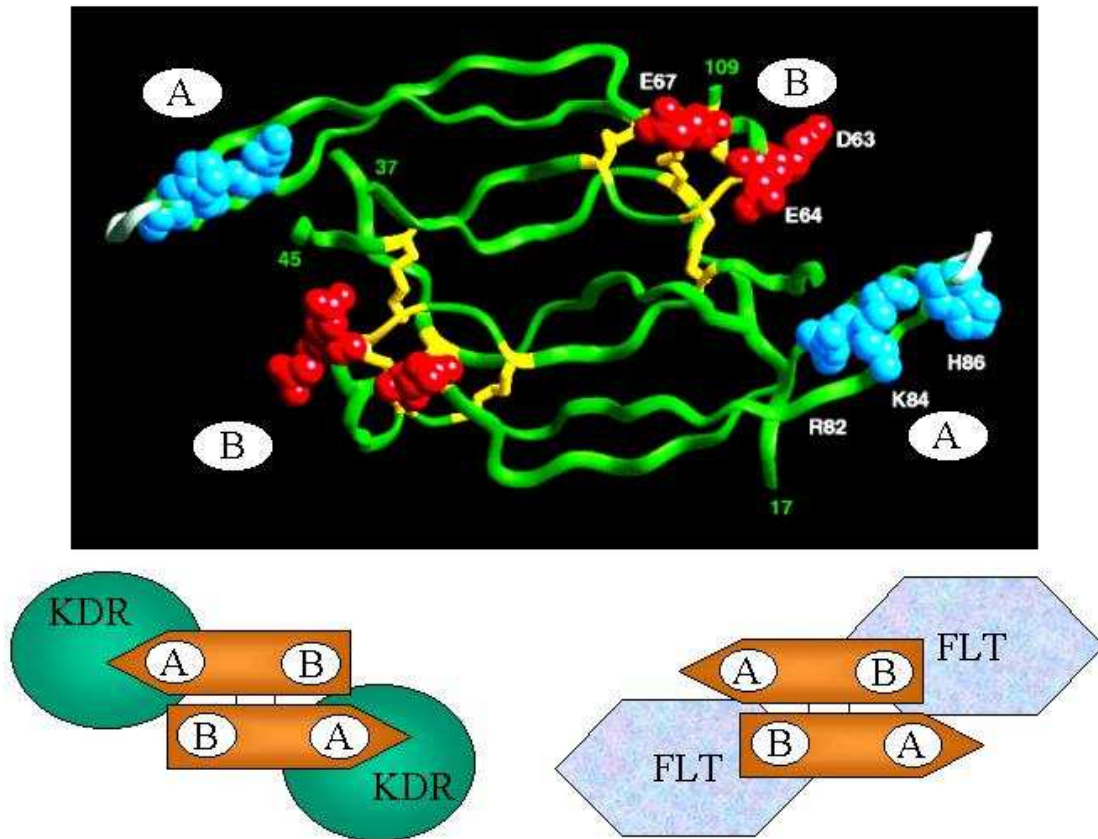


Figure I.42 : Modèle tridimensionnel du dimère du VEGF avec les positions de deux principaux déterminants pour les liaisons avec les récepteurs.¹²⁵(boucle A - site de liaison au KDR; boucle B - site de liaison au Flt-1) et présentation schématique des interactions du VEGF avec ses récepteurs.

Il s'agit du court enchaînement **Arg₈₂-Ile-Lys-Pro-His₈₆** au sein duquel les résidus basiques de l'Arginine₈₂, de la Lysine₈₄ et de l'Histidine₈₆ sont déterminants pour l'induction de la réponse biologique. Cette séquence forme une structure flexible (domaine 79-93) qui se situe à l'extrémité d'un feuillet β : elle est appelée **boucle A** et constitue le site de fixation du VEGF sur les KDR. De moindre influence sur le contrôle de l'angiogenèse, une autre séquence active a été mise en évidence. Comportant les résidus acides Aspartate₆₃, Glutamate₆₄ et Glutamate₆₇, cette séquence est située à l'opposée de la boucle A, au sein d'une autre structure en boucle : c'est ce site, appelé **boucle B**, qui est reconnu par les récepteurs Flt-1.

3- Le *cyclo*VEGI

Afin d'inhiber la néoangiogenèse tumorale, le groupe de Chimie Bio-Organique de l'université de Bordeaux II s'est appuyé sur ces découvertes pour concevoir des inhibiteurs compétitifs du VEGF. Ils ont ainsi synthétisé une série de peptides linéaires et cycliques mimant la boucle A dans le but d'inhiber de manière compétitive la fixation du VEGF sur les récepteurs KDR.

Ces travaux ont conduit à l'obtention de peptides cycliques originaux possédant une forte affinité pour les récepteurs KDR.¹¹⁸⁻¹¹⁹ Des essais biologiques ont permis de montrer que ces peptides inhibent la prolifération des cellules endothéliales et inhibent l'angiogenèse *in vivo*, sur les membranes chorio-allantoïdienne des œufs de poule (CAM pour chicken Chorio-Allantoic Membrane).¹²⁰

L'un de ces peptides, le *cyclo*VEGI (pour *Vascular Endothelial Growth Inhibitor*), possède un pouvoir inhibiteur remarquable : sa séquence est très proche de celle de la boucle naturelle (figure I-43), comportant bien les acides aminés **Arg₈₂**, **Lys₈₄** et **His₈₆** indispensables à la reconnaissance des récepteurs KDR.

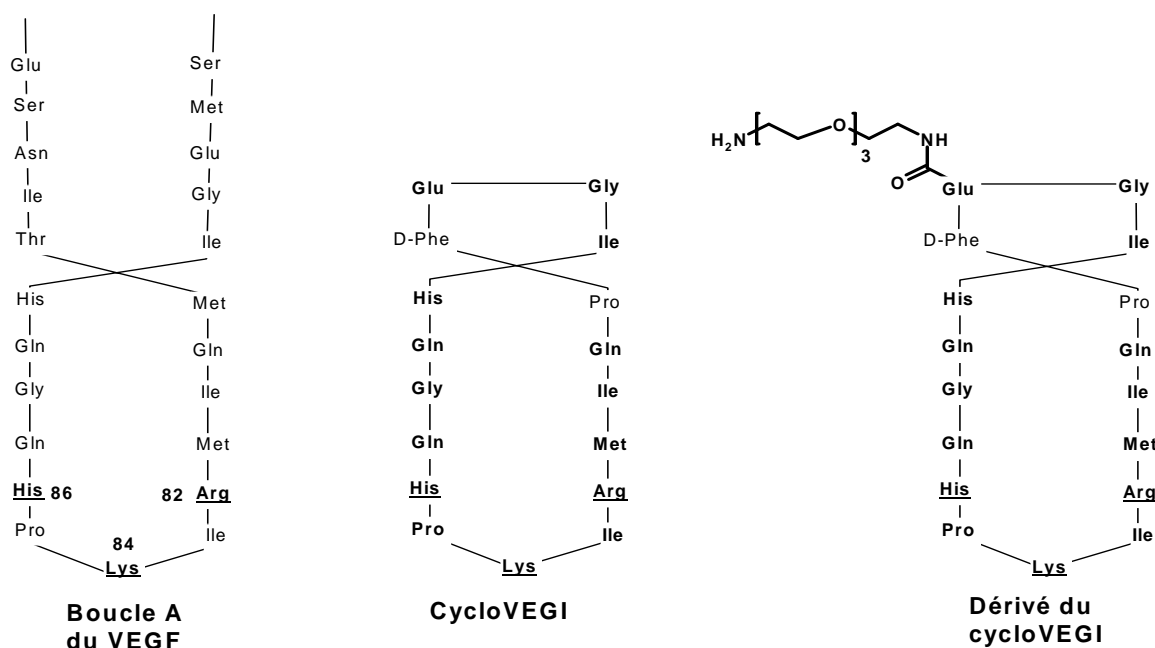


Figure I-43 : Séquences de la boucle A du VEGF, du *cyclo*VEGI et de son dérivé, tous deux actifs.

¹¹⁸ L. Bello, V. Lucini, F. Costa, M. Pluderi, C. Giussani, F. Acerbi, G. Carrabba, M. Pannacci, D. Caronzolo, S. Grosso, S. Shinkaruk, F. Colleoni, X. Canon, G. Tomei, G. Délérís, and A. Bikfalvi, *Clin. Cancer Res.*, 10, 4527-4537 (2004).

¹¹⁹ A. Bikfalvi, *Biochem. Pharmacol.*, 68, 1017-1021 (2004).

¹²⁰ L. Zilberberg, S. Shinkaruk, O. Lequin, B. Rousseau, M. Hagedorn, F. Costa, D. Caronzolo, M. Balke, X. Canon, O. Convert, G. Lain, K. Gionnet, M. Goncalves, M. Bayle, L. Bello, G. Chassaing, G. Délérís, and A. Bikfalvi, *J. Biol. Chem.*, 278, 35564-35573 (2003).

Ce composé actif original présente une concentration inhibitrice 50 (notée $I_{c_{50}}$) de $1,5\mu\text{M}$: il diminue significativement la croissance de gliomes humains implantés dans des souris et augmente significativement leur taux de survie (figure I-44).¹²⁰

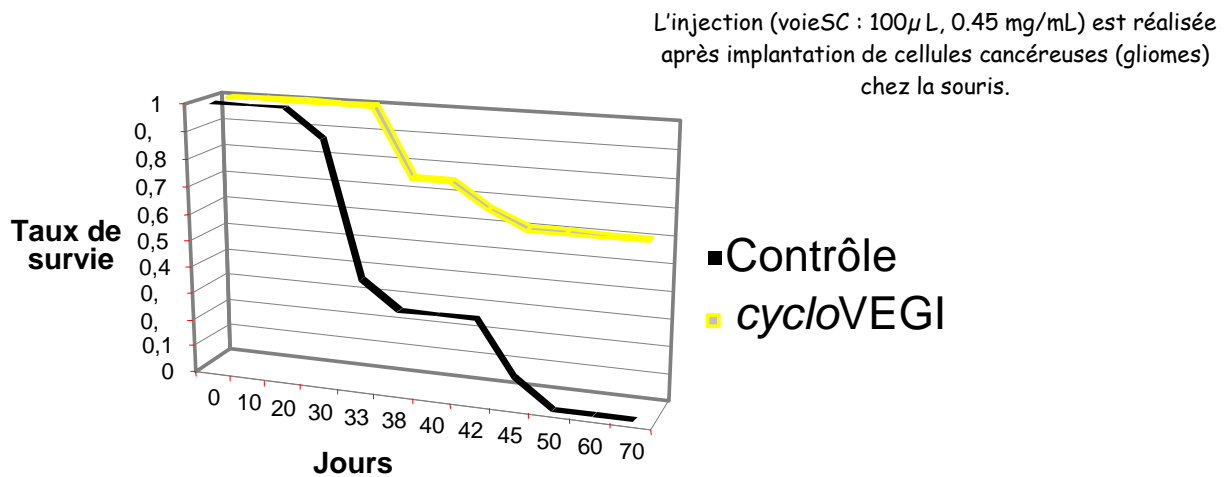


Figure I-44 : Démonstration *in vivo* de l'activité du cycloVEGI.¹²⁰

Dans le but de fournir un vecteur d'adressage cellulaire spécifique, à visées diagnostiques ou thérapeutiques, un « site de greffage » a été aménagé sur la chaîne latérale du glutamate du cycloVEGI et des bras espaceurs de différentes natures y ont été fixés afin de tester l'activité anti-angiogénique des dérivés obtenus. Il a ainsi été établi que l'affinité du cycloVEGI n'est pas diminuée par de telles modifications.¹²¹

¹²¹ M. Goncalves, K. Estieu-Gionnet, T. Berthelot, G. Laïñ, M. Bayle, X. Canron, N. Betz, A. Bikfalvi, and G. Délérís, *Pharma. Res.*, 22, 7, 2005.

But du travail

Dans le champ de la cancérologie, un agent idéal serait une molécule capable de se concentrer spécifiquement et avec une haute affinité au niveau des sites tumoraux. Cette molécule devrait posséder une toxicité modulable, ce qui permettrait d'exploiter un même agent autant pour le diagnostic que pour la thérapie de nombreux types de cancers. Pour satisfaire de telles conditions, les constructions moléculaires hybrides (figure I-45) semblent constituer d'excellents candidats.

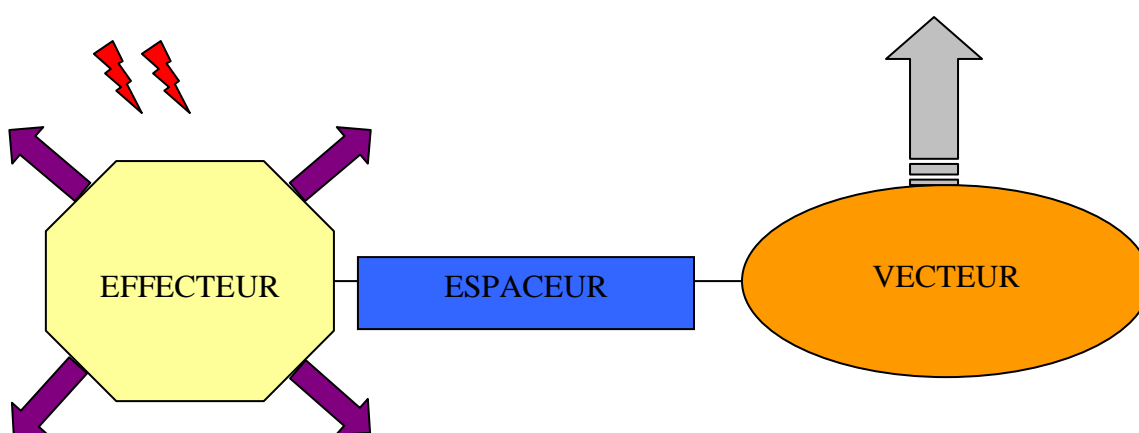


Figure I-45 : Schéma de la construction moléculaire hybride souhaitée.

Il s'agit de molécules réunissant de manière covalente un composé vecteur et un composé effecteur. Afin d'éviter toutes interactions, notamment de type stérique, qui pourrait avoir lieu entre les unités vectrice et effectrice, nous avons inclus un espaceur.

Choix du vecteur

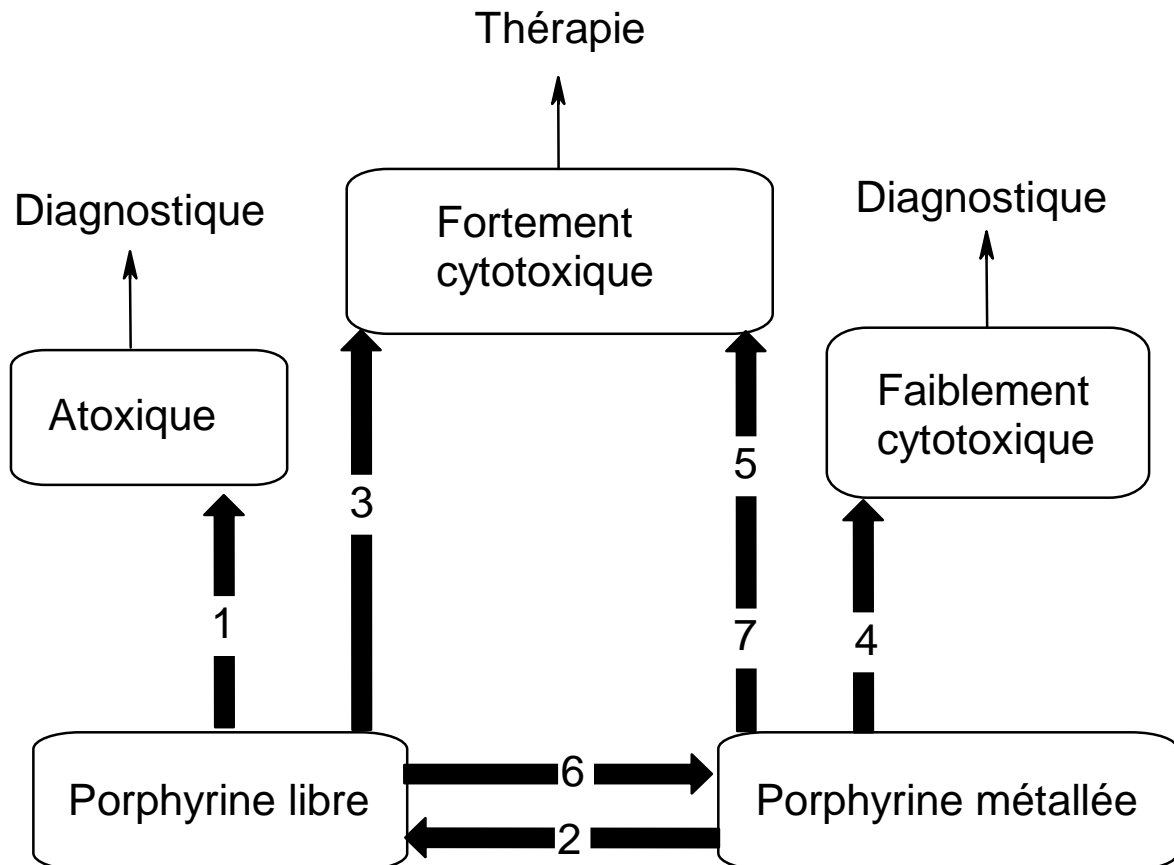
Le *cycloVEGI* a une grande affinité pour les récepteurs KDR surexprimés lors du développement tumoral. Parce que viser les sites néoangiogeniques, c'est cibler spécifiquement les zones cancéreuses, le *cycloVEGI* a été choisi comme vecteur.

Choix d'un système espaceur

Afin d'espaceur au mieux le *cycloVEGI* de l'effecteur, nous avons choisi une chaîne linéaire, hydrophile et flexible. Pour cela, nous avons conçu et synthétisé un espaceur de type tétraéthylène glycol, que nous avons hétéro-bi-fonctionnalisé afin de contrôler de manière chimiosélective ses greffages ultérieurs.

Choix de l'effecteur

Il apparaît très avantageux de greffer des porphyrines sur le *cycloVEGI*. En effet, ces molécules peuvent être assimilées à des unités effectrices particulièrement versatiles. Susceptibles d'être métallées, les porphyrines sont des chromophores photosensibilisateurs qui peuvent servir d'agent chélatant pour la vectorisation d'éléments à visées diagnostiques ou thérapeutiques (figure I-46).



Absence de lumière [1], absence de métallation [2], exposition lumineuse [3],
métallations avec un élément faiblement radioactif [4], un élément fortement radioactif [5],
avec un élément peu ou pas toxique [6], ou cytotoxique [7].

Figure I-46 : Illustration schématique des propriétés toxiques d'une porphyrine en fonction de deux facteurs : la luminosité et la nature du métal chélaté.

Les porphyrines sont donc des agents effecteurs d'une remarquable polyvalence. Leur cytotoxicité est largement variable et elle dépend des combinaisons de plusieurs facteurs, ce qui en fait des agents à toxicité modulable en fonction des effets biologiques souhaités.

Molécules ciblées au cours de ce travail

Pour élaborer de telles constructions, nous avons développé une méthodologie selon deux approches, grâce auxquelles les composés présentés figure I-47 ont été synthétisés dans des conditions douces. Les produits que nous avons obtenus sont issus d'un travail réalisé au LCSN (Limoges) et dans le groupe de Chimie Bio-Organique (Bordeaux).

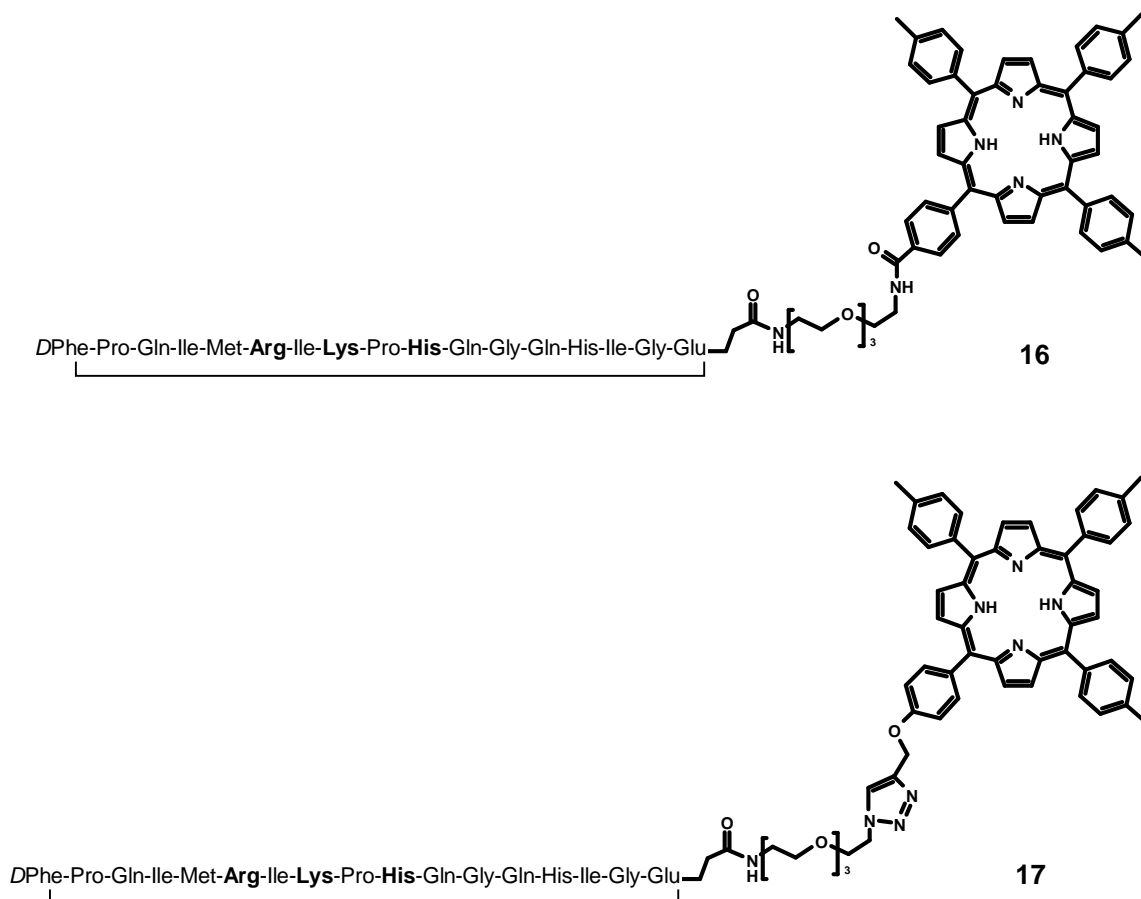


Figure I-47 : Structure des molécules ciblées et obtenues au cours de ce travail.

La structure moléculaire du composé **16** est formée de trois blocs, liés entre eux par deux liaisons amides. En revanche, la construction de l'analogue **17** s'appuie sur l'établissement d'un triazole pour lier l'espaceur à la porphyrine.

Autres constructions moléculaires envisagées

Afin d'associer photosensibilisateur(s) et vecteur, l'inclusion de porphyrine(s) au sein de la séquence peptidique du *cycloVEGI* a été envisagée (figure I-48). Toutefois, devant l'inexistence des synthons porphyriniques requis pour de telles constructions, nous avons orienté la seconde partie des travaux au développement nécessaire de porphyrines aminées acides.

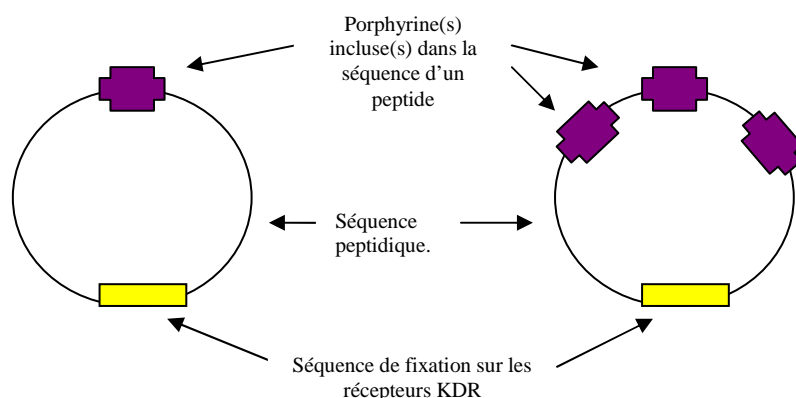


Figure I-48 : Autres constructions moléculaires envisagées :
 effecteur(s) directement inclus(s) dans la séquence d'un vecteur peptidique.

Par la mise au point d'une méthodologie de dé-symétrisation en phase solide, le composé **22** et ces homologues **26a** et **26b** (présentés figure I-49) sont obtenus à partir de la protoporphyrine IX, molécule naturelle et abondante.

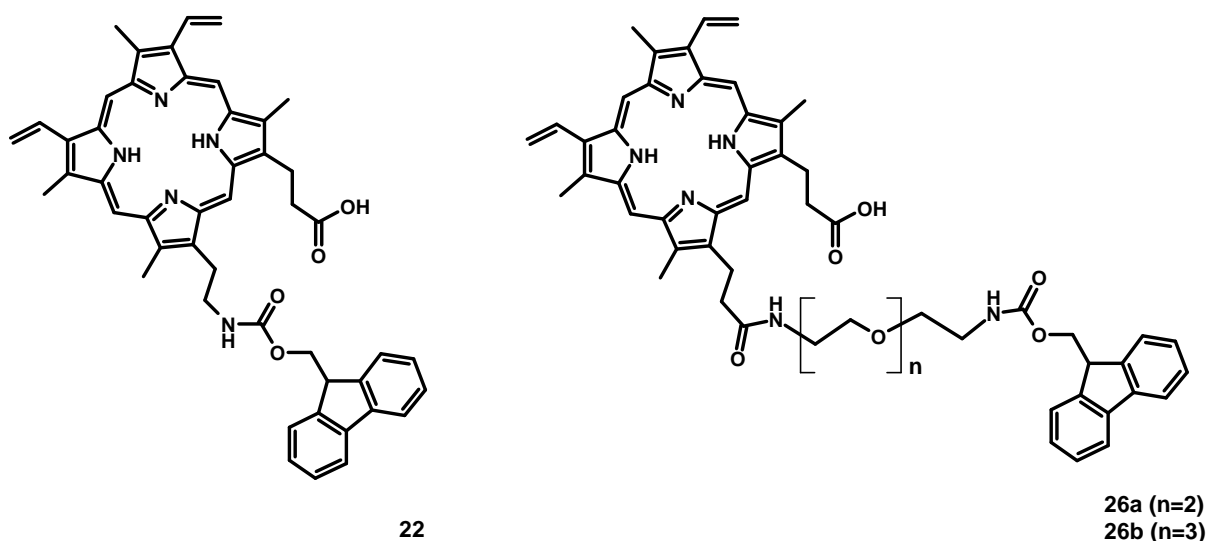


Figure I-49 : Structures de composés finaux synthétisés au cours de ce travail

Bi fonctionnelles, ces molécules sont des unités porphyriniques utilisables pour la synthèse de nouvelles constructions moléculaires hybrides : ce sont des synthons photosensibilisateurs versatiles, directement utilisables pour la synthèse peptidique en phase solide, selon la « chimie Fmoc », qui est la procédure la plus largement employée.

- CHAPITRE II -

*Synthèse de méso-
tritolylporphyrines présentant le
peptide cycloVEGI*

I- OBJET DU TRAVAIL ET STRATEGIES DE SYNTHESE

1) Rappel de l'objet du travail

Dans le but d'élaborer des photosensibilisateurs porphyriniques présentant une grande affinité et une forte spécificité vis-à-vis des zones tumorales, nous avons dans un premier temps synthétisé le 5-[4-(amido-3,6,9-trioxaundéca-11-amido-*cyclo*VEGI)-phényl]-10,15,20-tritolyl-porphyrine **16** ainsi que son analogue triazolé **17** présentés figure II-1.

La synthèse du composé **16** a été réalisée selon une méthodologie préparative, basée sur l'emploi d'agents de couplages développés pour la synthèse de peptides en conditions douces.

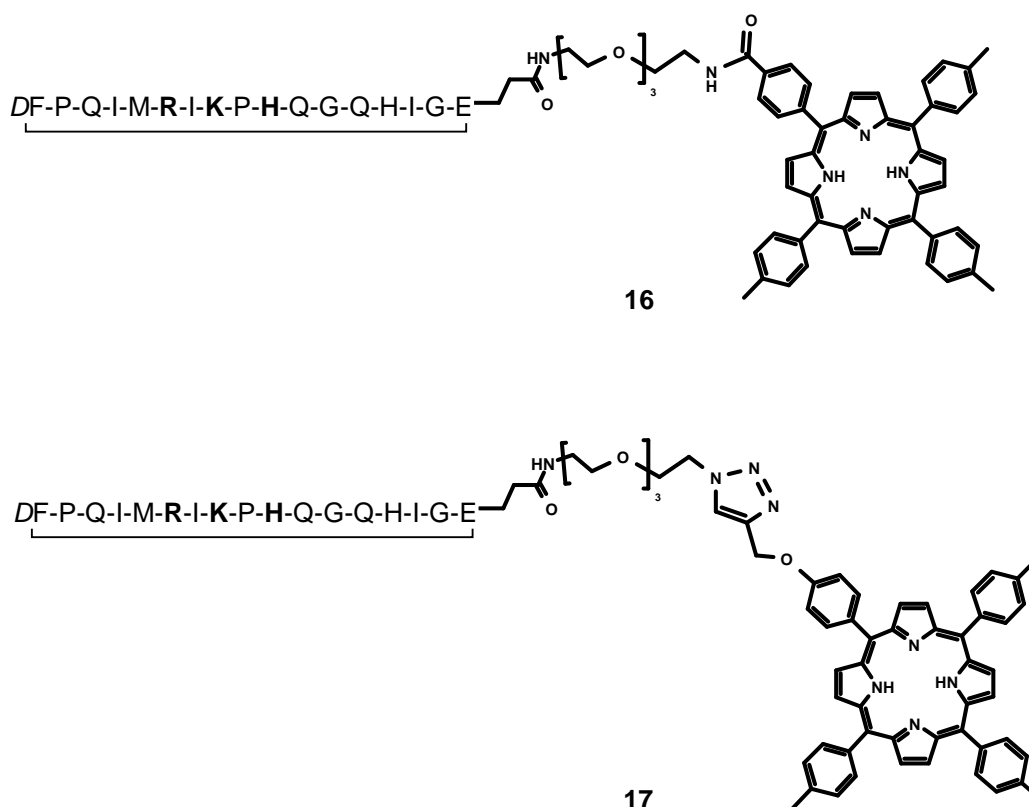


Figure II-1 : Structure des composés ciblés obtenus.

Dans le but de simplifier les procédures tout en réduisant les temps de couplages, nous avons également développé une méthodologie alternative pour la préparation de telles molécules, en nous intéressant au concept de « *Click-Chemistry* ». Adaptée avec succès pour une étape de couplage, cette approche a permis de synthétiser le composé **17** présenté figure II-1.

2) Méthodes générales de synthèses

A- Analyse rétrosynthétique du composé 16

La molécule ciblée est une *méso*-4-carboxy-phényl-tritolylporphyrine greffée sur le résidu glutamate du *cyclo*VEGI par le relais d'une chaîne tétraéthylène glycol, dont chaque extrémité est engagée dans une liaison amide. Notre analyse rétrosynthétique, présentée figure II-2, a permis d'envisager deux approches synthétiques, similaires en terme de convergence.

La voie de synthèse I

Cette première approche est définie par la **déconnection A** qui fait apparaître deux synthons clefs. Le premier est la *méso*-4-carboxyphényl-tritolylporphyrine **8**, que l'on obtient notamment selon la méthode des «aldéhydes mixtes», par condensation du 4-carboxybenzaldéhyde avec le 4-tolualdéhyde et le pyrrole. Le second synthon majeur est le peptide cyclique **4b**, qui correspond au *cyclo*VEGI sous forme protégée dont le résidu glutamate est couplé avec une chaîne tétraéthylène glycol.

La **déconnection B** permet de désigner comme précurseur le peptide cyclique **4a** (*cyclo*VEGI sous forme protégée) et de préciser que la structure du dernier synthon est une chaîne tétraéthylène glycol aux extrémités azotées. Afin d'éviter la formation d'homodimères lors de son couplage avec les partenaires macromoléculaires, il est nécessaire d'engager un précurseur non symétrique, c'est-à-dire un composé dont la réactivité des extrémités azotées ne sont pas équivalentes, ce qui nous a conduit à envisager la préparation d'une chaîne tétraéthylène glycol amino-azidée **7**.

La voie de synthèse II

Cette seconde approche correspond à la seconde option d'accès à la molécule ciblée par synthèse convergente. La **déconnection A'** place directement le peptide cyclique **4a** comme précurseur et laisse apparaître la porphyrine aminée **13** issue de la réduction du composé azidé **12**.

La seconde **déconnection B'** permet de visualiser les précurseurs nécessaires à son élaboration : il s'agit de la *méso*-4-carboxyphényl-tritolylporphyrine **8** et de la chaîne tétraéthylène glycol amino-azidée **7**.

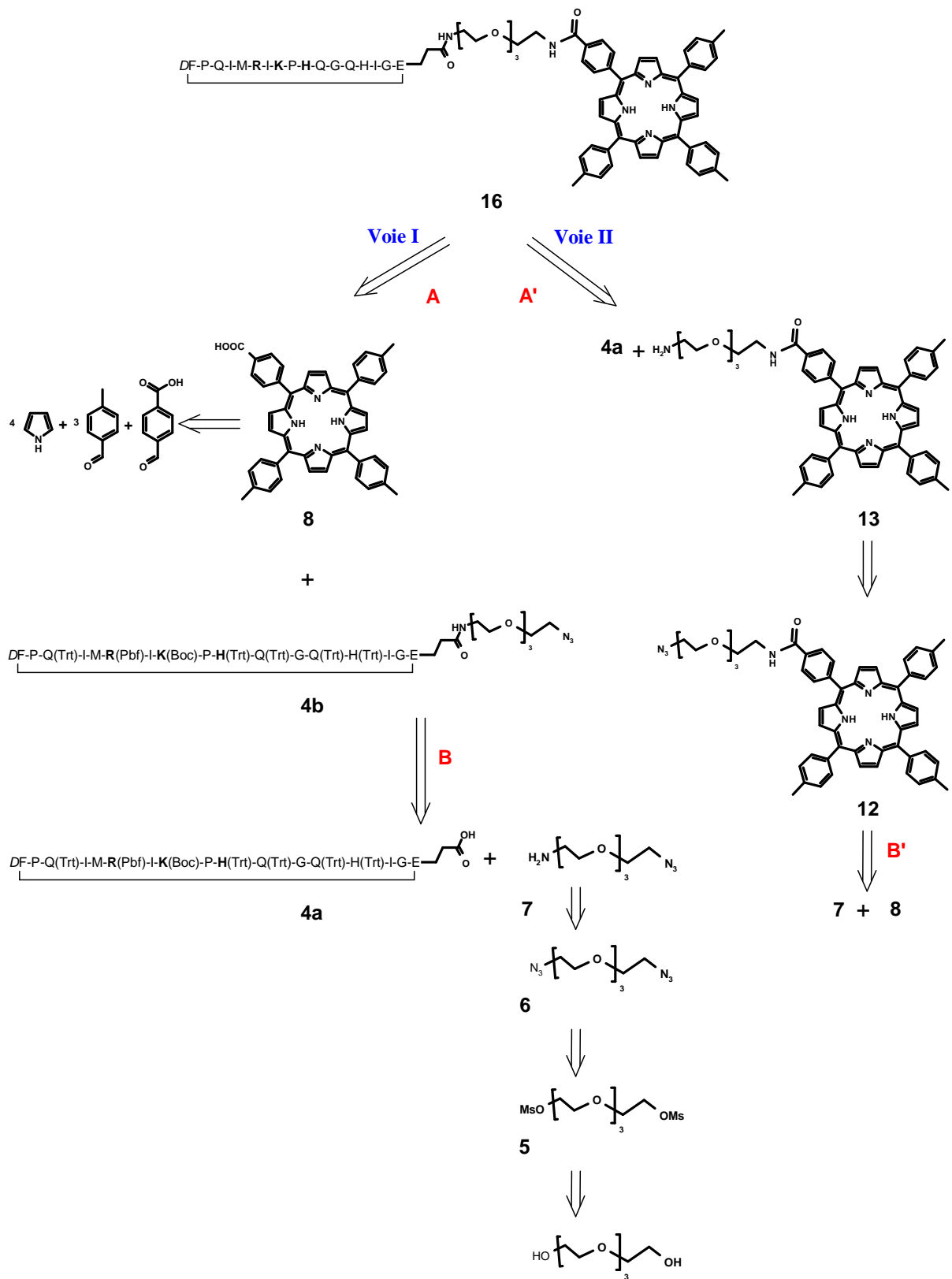


Figure II-2 : Analyse rétrosynthétique pour le composé **16**.

B- Analyse rétrosynthétique du composé 17

La molécule hybride **17** est construite autour de l'hétéro-bi-fonctionnalisation de l'espaceur amino-azidé **7**. L'analyse rétrosynthétique (figure II-3) permet de dégager deux voies de synthèses distinctes.

La voie de synthèse I

Cette première approche est définie par la **déconnection A** qui laisse apparaître le précurseur peptidique **4a**, à côté d'un synthon porphyrinique **15**, issu de la démétallation du précurseur **14**. La **déconnection B**, réalisée sur l'hétérocycle 1,2,3-triazole, conduit au précurseur amino-azidé **7** ainsi qu'à la *méso*-tritolylporphyrine porteuse d'un alcyne terminal **11**, obtenue par métallation avec le zinc de la base libre **10**. La *méso*-tritolylporphyrine **10** est le produit d'une propargylation réalisée sur la 4-hydroxy-phényl-tritolylporphyrine **9**, qui est formée par condensation du 4-hydroxy-benzaldéhyde avec le 4-tolualdéhyde et le pyrrole, selon la « méthode des aldéhydes mixtes ».

La voie de synthèse II

Selon cette seconde approche, la molécule-cible **17** est obtenue après démétallation de **17+Zn**. Réalisée sur l'hétérocycle 1,2,3-triazole de ce précurseur direct, la **déconnection A'** présente les synthons porphyrinique **11** et peptidique **4c**. Ce dernier étant obtenu après déprotection et purification par RP-HPLC du peptide cyclique **4b**. Enfin, la **déconnection B'** désigne le peptide **4a** et l'espaceur **7** comme ses précurseurs.

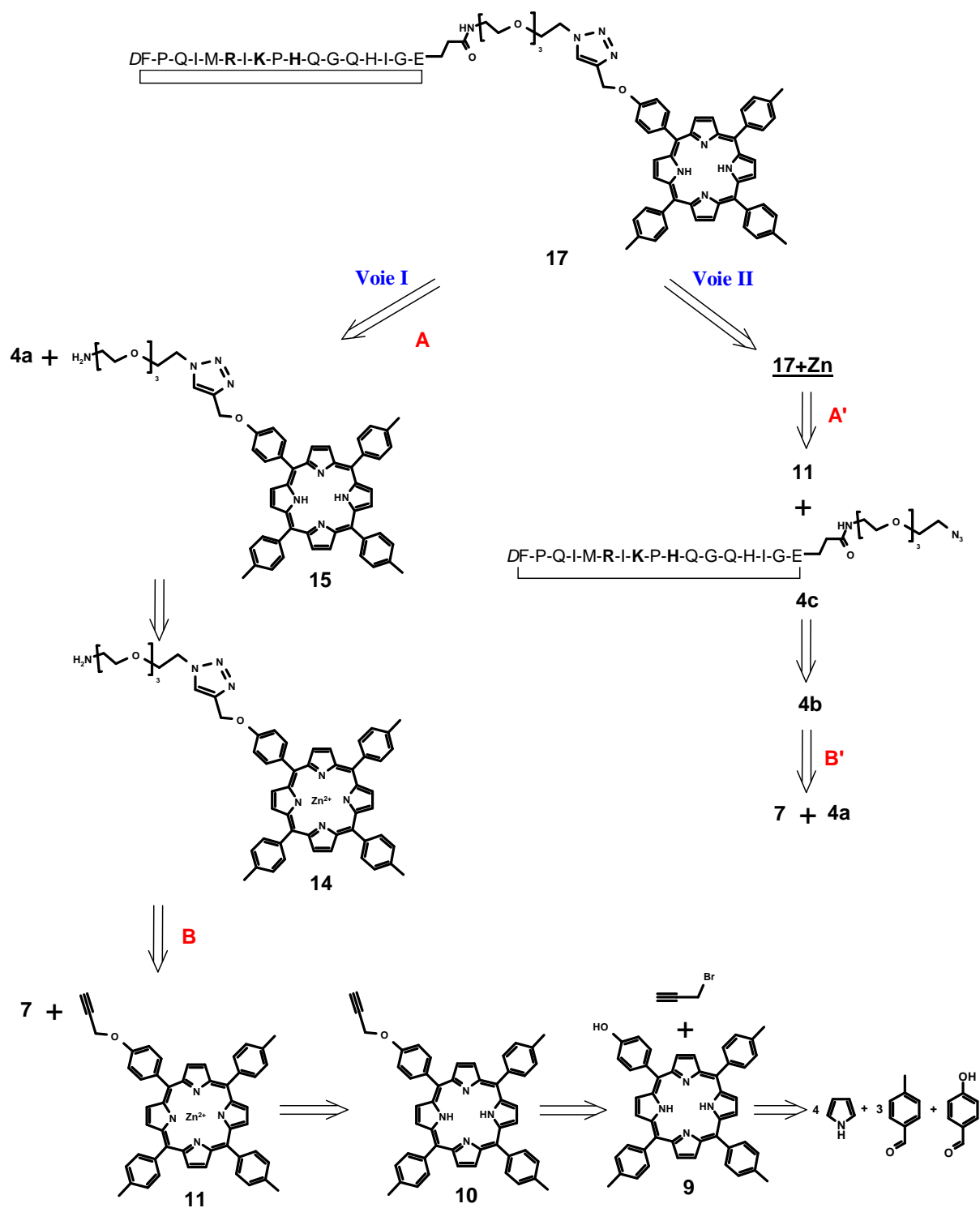


Figure II-3 : Schéma rétrosynthétique pour la formation du composé 17.

II- ELABORATION DES PRECURSEURS

1) Synthèse en phase solide du peptide vecteur.

Après avoir exposé le principe de la synthèse peptidique en phase solide, nous allons détailler la stratégie d'approche et l'élaboration du peptide cyclique **4a**, puis la caractérisation du *cycloVEGI*.

A- Principe de la synthèse peptidique en phase solide

La formation d'une liaison peptidique (liaison amide) par condensation de deux acides aminés est la réaction-clef de la synthèse de peptides et de protéines. Les différents groupements fonctionnels présents doivent être, selon leur rôle, protégés ou activés spécifiquement, pour assurer la régiosélectivité de cette réaction et empêcher les réactions secondaires indésirables. Les premières synthèses de peptides en phase liquide ont montré rapidement les limites de cette méthode au fur et à mesure que les séquences grandissaient. En effet les nombreuses étapes répétitives (activation, déprotection, couplage, lavage, isolation, caractérisation des intermédiaires) ajoutées aux difficultés rencontrées pour solubiliser les intermédiaires de haut poids moléculaire rendent la synthèse de longues séquences en phase liquide très difficile à accomplir. Cependant les premiers polypeptides naturels préparés en laboratoire (ocytocine, vasopressine) ont été synthétisés à l'aide de cette méthode.

En 1963, R.B. Merrifield a posé les bases stratégiques et techniques d'une méthode révolutionnaire, développée pour la synthèse des peptides : la synthèse peptidique en phase solide (SPPS).¹²² Par rapport à la synthèse en phase liquide, la SPPS présente des avantages considérables : de simples lavages remplacent les étapes de purification par chromatographie indispensables en phase liquide (figure II-4). La suppression de ces étapes fastidieuses, coûteuses en solvants et en produit est une avancée notoire qui permet des gains de temps et d'efficacité considérables. En outre, on peut augmenter le rendement d'une réaction en engageant un très large excès de réactifs.

¹²² R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (14), 2149-2154, 1963

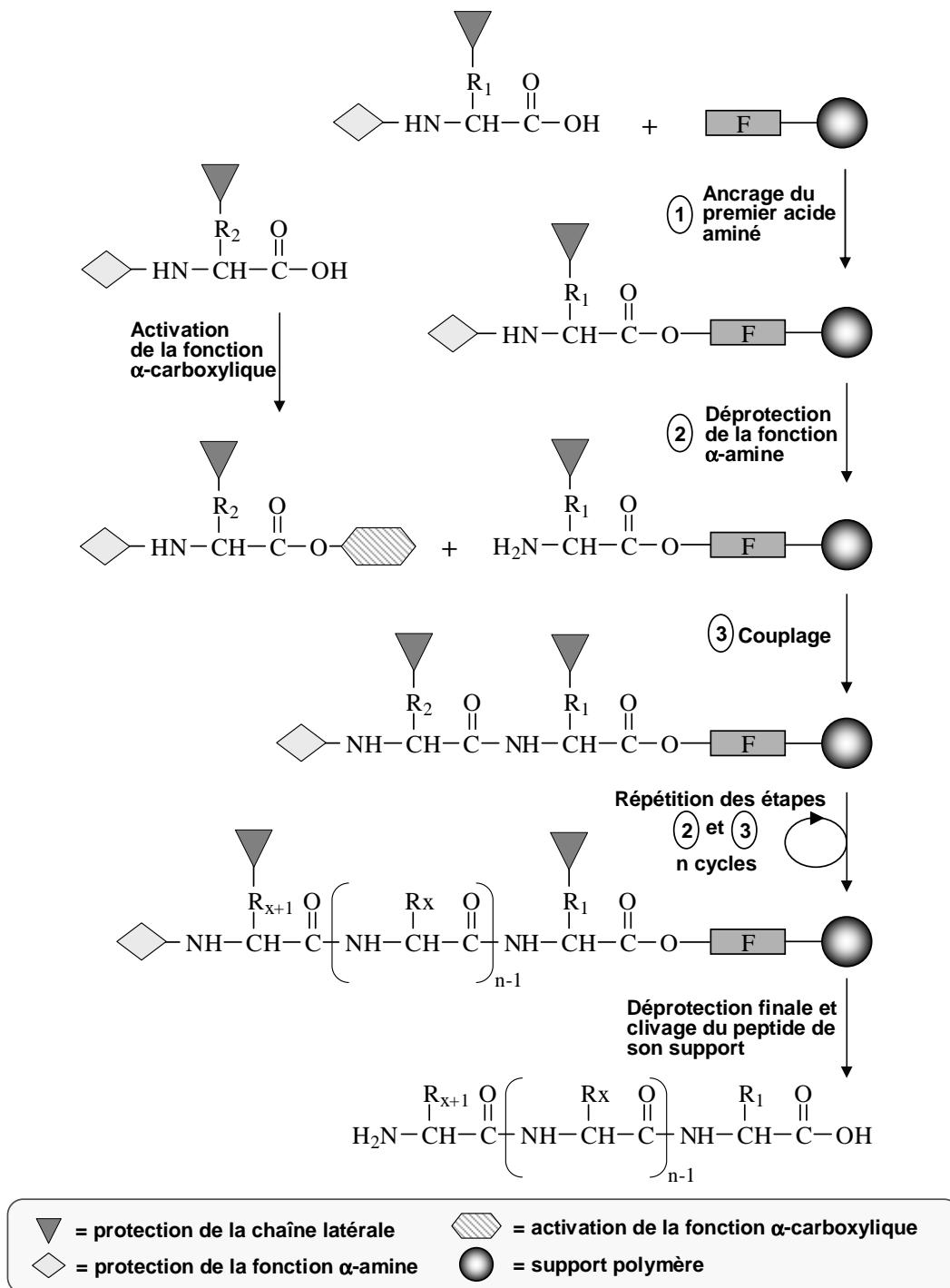


Figure II-4 : Représentation schématique de la synthèse peptidique en phase solide. Les étapes de déprotection et de couplage sont répétées pour chaque acide aminé à incorporer.

La synthèse s'effectue de façon itérative à partir du premier acide aminé, ancré sur le support solide par sa fonction carboxylique (étape 1). On utilise le groupement *t*-butoxycarbonyl Boc (acido-labile) ou le groupement 9-fluorénylméthylméthoxycarbonyl Fmoc (baso-labile) pour la protection temporaire de la fonction α -aminé. La libération de cette fonction constitue l'étape suivante de la synthèse (étape 2). Le deuxième acide aminé, dont la fonction α -carboxylique a été préalablement activée, est couplé avec le groupe α -amino libre de l'acide aminé immobilisé sur la résine (étape 3). Les étapes 2 et 3 sont répétées pour chaque résidu à incorporer, jusqu'à l'obtention du peptide final qui peut alors être décroché. Les groupements protecteurs des chaînes latérales sont souvent choisis pour que leur clivage se fasse lors de la libération du peptide de la résine.

Suivant la stratégie choisie (Boc ou Fmoc), les étapes de déprotection et de clivage ne se réalisent pas avec les mêmes réactifs. Le groupement protecteur Boc est enlevé à l'aide de l'acide trifluoroacétique (TFA) : ces acidolyses répétées peuvent provoquer des réactions secondaires et le clivage des liaisons peptidiques. De plus, la libération du peptide de son support est réalisé par traitement à l'acide fluorhydrique anhydre : dangereux à manipuler, cet acide nécessite un équipement de laboratoire spécifique. A l'inverse, selon la stratégie Fmoc, la libération de la fonction amine terminale se déroule dans un milieu basique doux (traitement à la pipéridine), tandis que le TFA est utilisé uniquement pour le clivage et la déprotection finale. Cette stratégie est plus accessible, plus facile à mettre en œuvre et donne de bons résultats en terme de rendement et de pureté des produits finaux.

Le laboratoire du groupe de chimie bio-organique de Bordeaux dispose d'un synthétiseur automatique de peptides et possède une solide expérience de la chimie peptidique selon la stratégie Fmoc. C'est donc par cette approche que nous avons construit la séquence du peptide vecteur.

B- Synthèse et cyclisation sur résine du peptide 4a

Dans le premier chapitre nous avons défini les déterminants structuraux responsables de la reconnaissance et de l'accrochage du VEGF sur le récepteur KDR. Un peptide linéaire représente une répartition conformationnelle dans laquelle la structure de la protéine d'origine est exprimée, jusqu'à un certain point. La cyclisation de la chaîne principale permet d'obtenir une imitation structurale plus satisfaisante par rapport à l'analogue linéaire. Grâce à cette diminution de la flexibilité conformationnelle, la cyclisation conduit à une augmentation

significative de la sélectivité et de l'activité biologique tout en diminuant la fragilité du peptide *in vivo*.

Les résidus responsables de l'interaction entre le VEGF et le récepteur KDR constituent un motif β formé par deux brins antiparallèles. La cyclisation peptidique classique par l'établissement d'une liaison amide entre les extrémités aminée et carboxylée (tête-queue) permet la formation de liaisons hydrogènes entre certains acides aminés (Gly, Pro, D_Phe) qui contribuent sensiblement à la rigidité stéréochimique du cycle en forme de feuillet β .

La construction du cycle de type « tête-queue », directement sur la résine, est assurée par fixation de la fonction carboxylique de la chaîne latérale du glutamate. La réussite de ce mode de cyclisation est basée sur la combinaison orthogonale de différents groupements protecteurs :

- Les groupements temporaires (Fmoc) pour la protection des amines N^α-protection.
- Le groupement semi-permanent (Allyle) pour l'extrémité carboxyle de la chaîne, qui s'élimine dans les conditions sélectives.
- Les groupements permanents (Trt, Boc, Pbf) pour la protection des fonctions latérales, qui resteront en place après le clivage du support.

Nous allons présenter les différentes étapes de synthèse du *cyclo*VEGI sous forme protégé (composé **4a**).

i- Fixation du premier acide aminé sur le support de synthèse

Choix de la résine

Actuellement, de très nombreux supports sont commerciaux. En stratégie de synthèse Fmoc, les résines utilisées sont des supports acido-labiles. Le choix du support est capital : il doit être réalisé en fonction des groupements protecteurs mis en jeu durant la synthèse et surtout en fonction du produit final souhaité. Nous avons choisi une résine 2-chloro-chlorotrytyle car l'ester qui constitue le lien covalent est hautement labile en milieu acide, même dilué, ce qui permettra de cliver le peptide sans altérer les protections de ses chaînes latérales. En revanche, cet ester acido-labile supporte très bien les traitements par des bases, réalisés afin de déprotéger les fonctions amines, introduites sous forme de carbamate de 9-méthylène fluorényle (NH_FFmoc). Sensible aux bases mais pas aux acides, le groupement Fmoc est dit orthogonal à l'ester de 2-chloro-trityle. Afin de garantir un taux de greffage suffisant, il est

indispensable que la résine soit porteuse d'une quantité importante de groupements réactifs et que ceux-ci soient accessibles. La résine 2-chloro-chlorotriptyle que nous avons utilisé est assez fortement fonctionnalisée (1,4mmoles de fonctions 2-chloro-chlorotriptyle par gramme de résine) avec un faible taux de réticulation (1% de DVB) ce qui assure son gonflement satisfaisant dans des solvants comme le DCM ou la NMP.

Choix du premier acide aminé

La cyclisation du peptide a été réalisée sur résine, selon la méthode dite « tête-à-queue », ce qui implique l'utilisation d'un acide aminé trifonctionnel tel le glutamate. Il est indispensable que sa fonction α -COOH soit protégée de manière semi-permanente, c'est pourquoi nous utilisons l'acide aminé Fmoc-Glu-OAll. En effet, l'ester allylique s'avère être un excellent groupe protecteur : orthogonale au groupement Fmoc, son clivage spécifique se fait en milieu neutre, en présence de *tétrakis* triphénylphosphine palladium [Pd(PPh₃)₄] et ne provoque pas le clivage du peptide de la résine.

Fixation sur le support et détermination du taux de greffage

Dans le DCM, en présence de DIEA, la résine 2-chloro-chlorotriptyle forme une liaison ester avec la fonction γ COOH de Fmoc-Glu-OAll : cette réaction a lieu à température ambiante et ne nécessite aucun agent couplant (figure II-5).

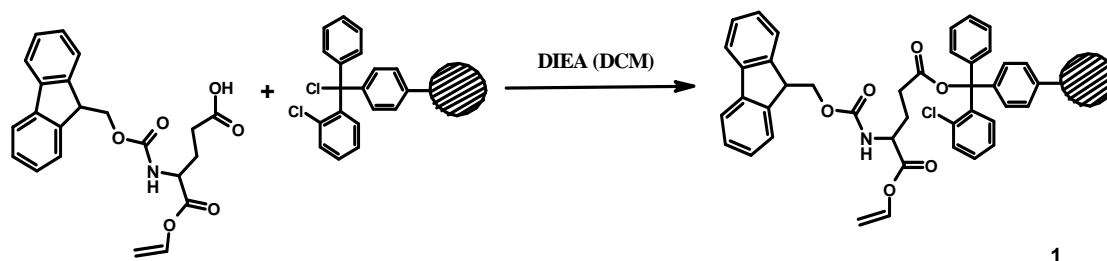


Figure II-5 : Fixation du premier acide aminé.

Le taux de fixation du premier acide aminé est alors déterminé, selon une méthode standard de dosage spectrophotométrique, introduite par Atherton et Sheppard.¹²³ En effet, la déprotection du groupement Fmoc d'un échantillon de résine **1** par la pipéridine conduit à la formation du dibenzofulvène (figure II-6).

¹²³ T.C. Blundell, G.G. Dodson, E. Dodson, D.C. Hodgkin, M. Vijayan, *Recent. Prog. Horm. Res.*, (1971), 27, 1.

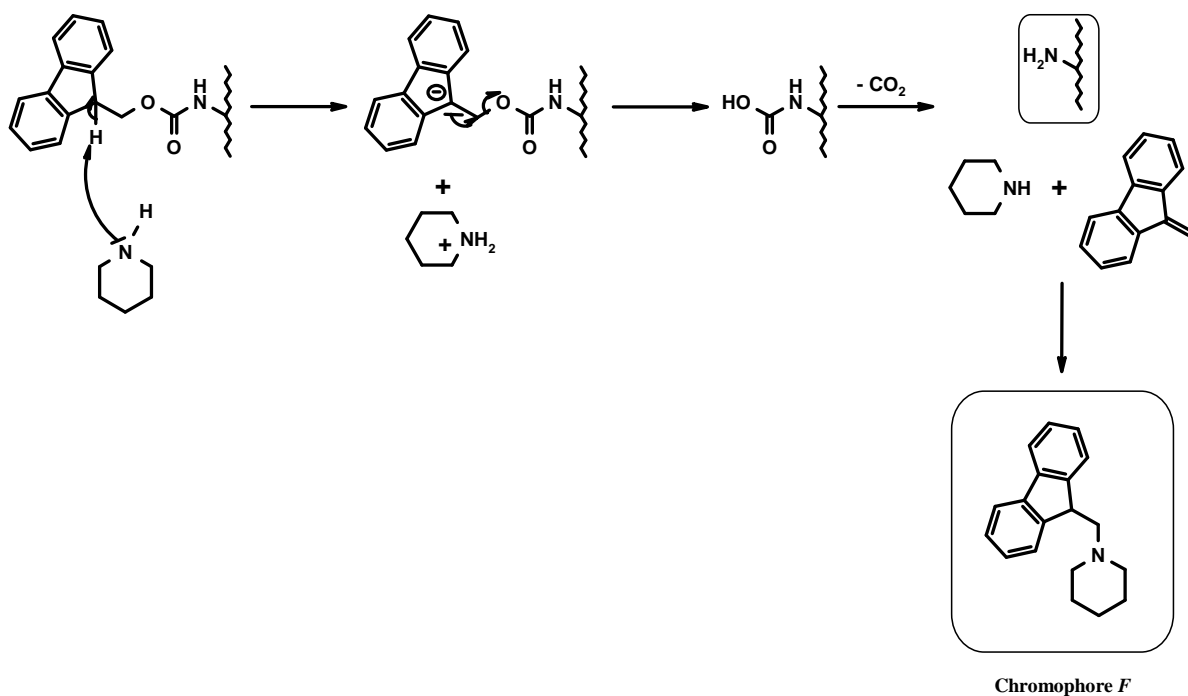


Figure II-6: Mécanisme de déblocage du Fmoc par la pipéridine.

Ce dernier forme alors avec la pipéridine un adduit (*chromophore F*) qui est dosé par quantification UV (301nm). Dans notre cas, le taux de greffage obtenu est de 0,63mmole/gramme de résine.

ii- Synthèse en phase solide du peptide sous forme linéaire

La synthèse de la chaîne peptidique est réalisée à l'aide d'un synthétiseur et les différentes étapes réalisées par l'automate sont présentées figure II-7. Après lavage de la résine **1**, une solution à 20% de pipéridine dans le DMF (i) libère la fonction amine sur la résine. L'acide aminé à coupler est activé par solubilisation dans la NMP en présence des agents de couplage (HBTU, HOBt et DIEA) puis il est introduit dans le réacteur (ii). Pour assurer un rendement maximal de couplage, les acides aminés activés sont introduits en excès (4 équivalents). Le mélange est alors agité à température ambiante, puis le synthétiseur amorce un nouveau cycle. Les acides aminés trifonctionnels que nous avons incorporé lors de l'élongation peptidique possèdent des protections semi permanentes sur leurs chaînes latérales. En effet, les groupements Boc (*t*-butyloxycarbonyle), Pbf (2,2,4,6,7-penta-méthyl-dihydrobenzofurane-5-sulfonyle) et Trt (trityle) sont prévus pour résister aux traitements basiques utilisés lors de l'élongation et en milieu acide dilué qui sera effectué en vue de décrocher le peptide de son support. Leur clivage, qui nécessite des conditions très acides, sera fait ultérieurement.

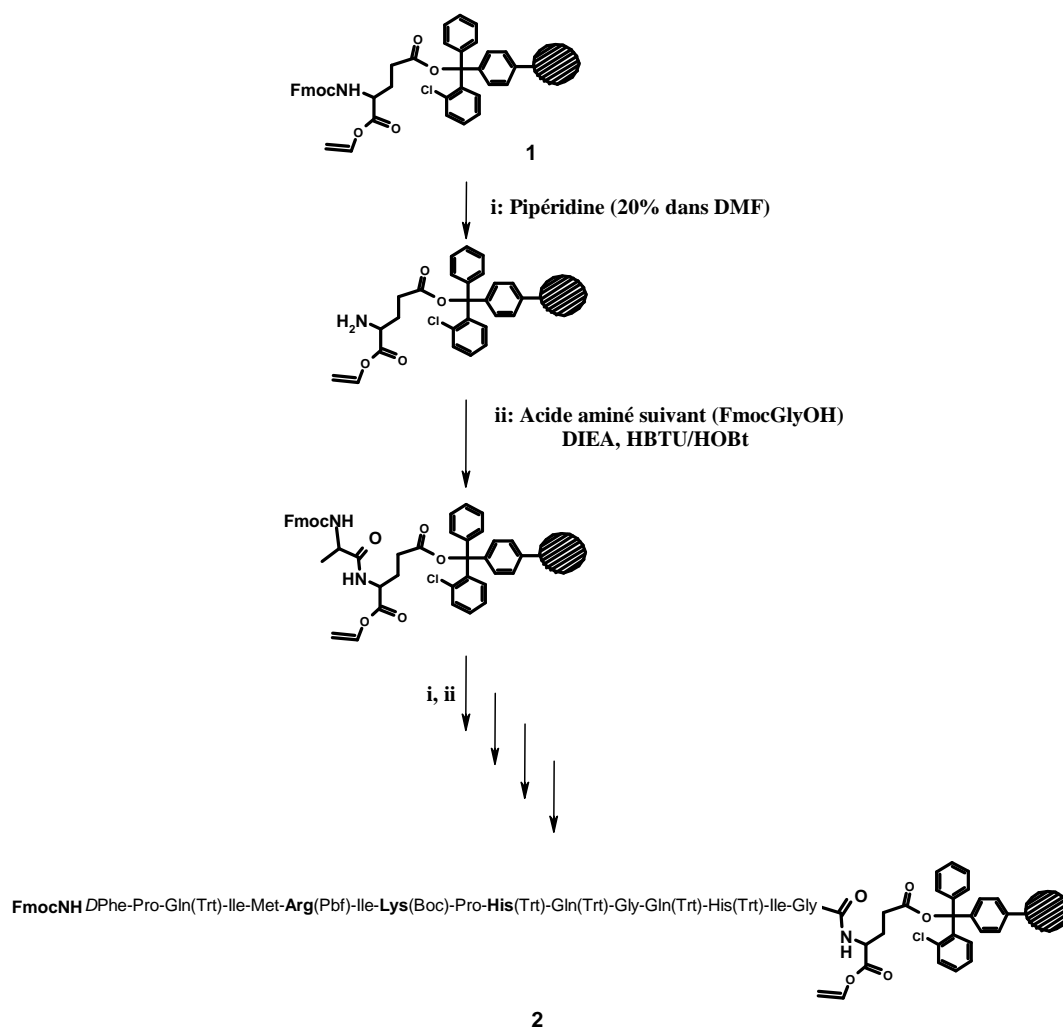


Figure II-7 : Synthèse du peptide linéaire réalisée par le synthétiseur automatique.

Lorsque l'ensemble du processus itératif est achevé, on isole la résine **2** sur laquelle est greffée la chaîne peptidique linéaire porteuse des protections semi-permanentes.

iii- Cyclisation du peptide sur résine

La construction du cycle de type « tête-queue » est réalisée selon la stratégie Fmoc/allyle en phase solide, présentée figure II-8. Le clivage de l'ester allylique est réalisé selon la méthode de Kates¹²⁴, basée sur l'utilisation du complexe *tétrakis*-triphénylphosphine-Palladium [Pd(PPh₃)₄] dans le chloroforme en présence de N-méthylmorpholine, neutralisée avec de l'acide acétique. Conduite en milieu neutre, cette réaction de dé-allylation permet la déprotection sélective du groupement αCOOH du peptide linéaire supporté.

¹²⁴ S.A. Kates, *Peptides, Chemistry, Structure, Biology, Proc. 13th American Peptide Symposium, ESCOM Leiden, 1994.*

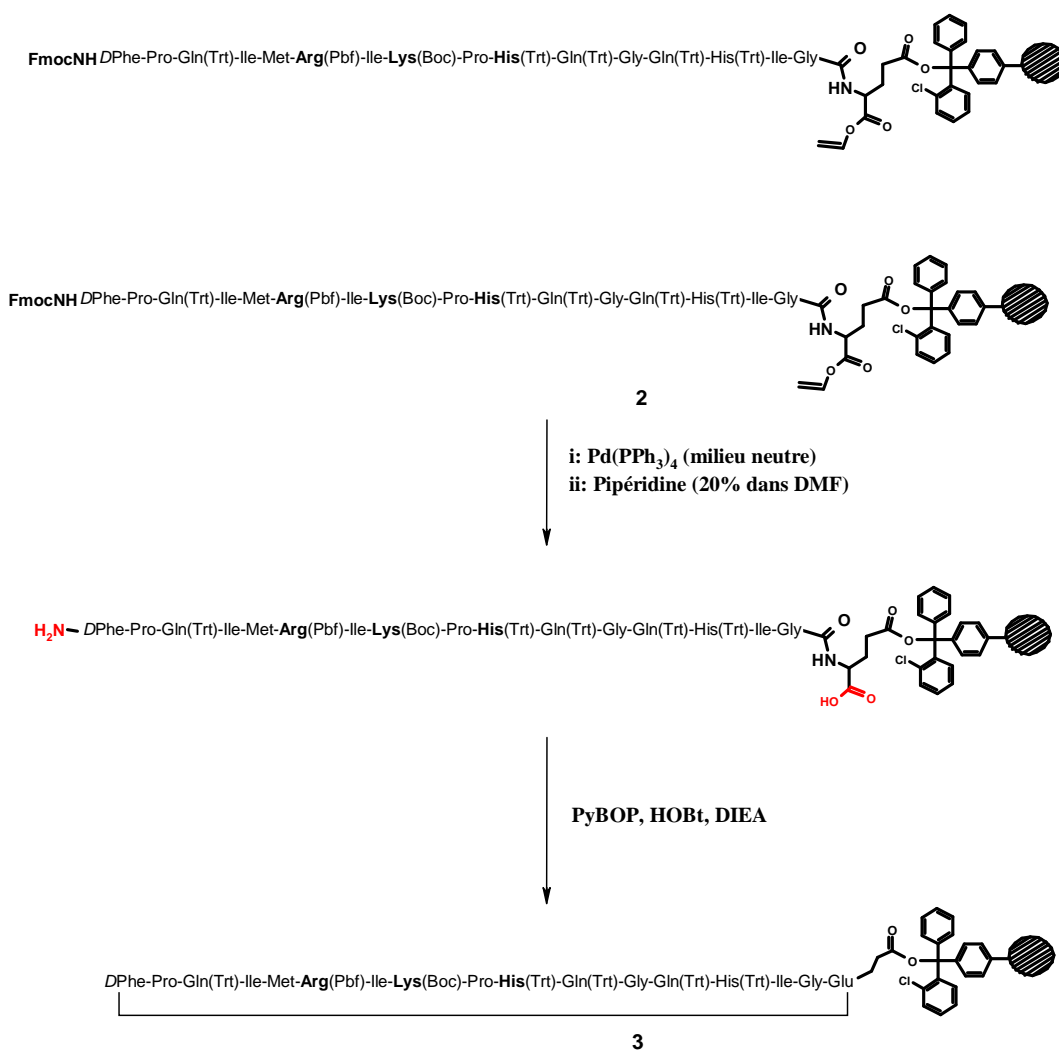


Figure II-8 : Cyclisation du peptide sur résine.

La fonction amine du résidu terminal D-phénylalanyle est ensuite libérée par traitement avec une solution à 20% de pipéridine dans le DMF. Enfin, la formation du peptide cyclique se fait par couplage intramoléculaire en utilisant le système couplant PyBOP/HOBt. La cyclisation est réalisée en vérifiant l'achèvement de la réaction par le test à la ninhydrine.

iv- Clivage du support de synthèse

Le peptide cyclique protégé est décroché de son support de synthèse en milieu acide, par réaction avec l'acide trifluoroacétique dilué à 1% dans le dichlorométhane, ce qui permet la libération de la fonction γCOOH tout en conservant les groupements protecteurs Boc, Pbf et Trt (figure II-9).

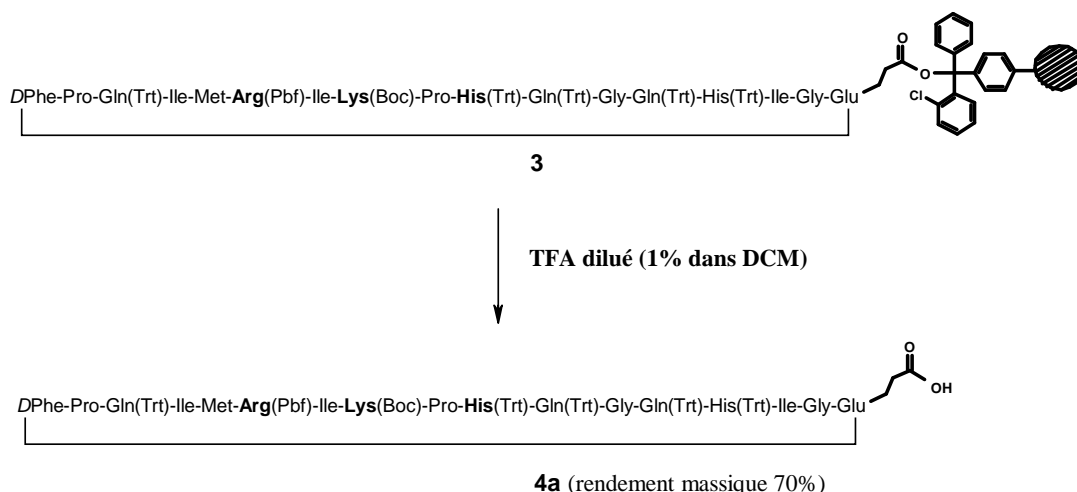


Figure II-9 : Décrochage de la résine 2-chlorotrityle.

Un échantillon de **4a** a été déprotégée puis purifiée par HPLC préparative, ce qui nous a permis de déterminer un rendement global pour la synthèse de **4a** de 25%, valeur satisfaisante pour ce type de synthèses.

C- Purification et caractérisation

Lors de l'assemblage des acides aminés sur une phase solide, un mélange hétérogène de peptides de longueurs différentes se retrouve à l'issue de la synthèse. Pour ce peptide cyclique, malgré tous nos efforts et nos précautions, le rendement de cyclisation ne dépasse pas 70% et le produit brut a toujours contenu au moins 5% de précurseur linéaire, ainsi que des produits de cyclisation intermoléculaire et de racémisation. De plus, la présence des groupements protecteurs sur les composés **4a** et **4b** s'est avérée gênante pour leur purification et leur analyse par spectrométrie MALDI, ce qui a imposé un travail « en aveugle » à partir de bruts.

Nous avons effectué la purification du produit déprotégé par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) en phase inverse, selon un gradient croissant d'acétonitrile dans la phase mobile. A la sortie de la colonne le peptide est détecté par absorption UV à 214 nm. L'efficacité de purification par HPLC préparative a été contrôlée par HPLC analytique et les fractions séparées ont été caractérisées par spectrométrie MALDI.

2) Synthèse du bras espaceur 1-amino-11-azido-trioxaundécane **7**

Rappelons qu'afin d'éviter les interactions (de type empilements), notre but est de préparer un bras espaceur linéaire, flexible et hydrophile, susceptible d'établir un pontage chimique stable avec la fonction carboxylique d'une molécule de *cycloVEGI* et celle d'une molécule chromophore de *méso*-(4-carboxyphényl)-tritolylporphyrine.

Des travaux visant à concevoir, synthétiser et greffer des systèmes espaceurs sur le *cycloVEGI* ont été menés par l'équipe du Groupe de Chimie Bio-Organique de Bordeaux¹²¹. En particulier, le 1-amino-11-azido-trioxaundécane s'avère être un excellent système espaceur. Son extrémité aminée permet d'établir une liaison amide avec la fonction γ COOH du *cycloVEGI* et cette modification du peptide n'altère pas son affinité *in vitro* pour les récepteurs KDR. De plus, l'extrémité azide offre de bonnes potentialités pour des fonctionnalisations ultérieures pouvant conduire à la formation de liaison amide, après réduction, ou à la formation de triazoles 1,4-disubstitués, par réaction de « *click-chemistry* ». Nous avons donc choisi d'utiliser le système espaceur 1-amino-11-azido-trioxaundécane.

A- Stratégie de synthèse

La molécule ciblée étant définie comme le 1-amino-11-azido-trioxaundécane **7**, nous avons développé une approche de synthèse en trois étapes, présentée figure II 10. Dans un premier temps, les alcools aux extrémités de la chaîne tétraéthylène glycol sont converties en groupements azotés, ce qui est l'objet des réactions de méthylation (A) et d'azidation (B). C'est au cours de la dernière étape que la molécule est désymétrisée : nous avons obtenu la molécule ciblée par une réduction partielle (C) de la chaîne diazidée.

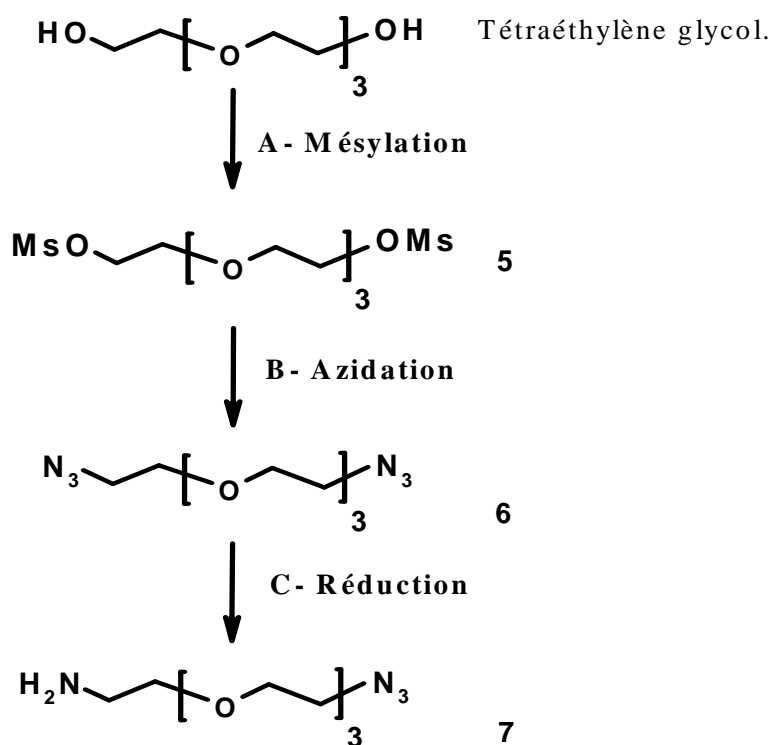


Figure II.10 : Schéma général de la synthèse du composé 7.

B- Synthèse et caractérisation

i- Synthèse du 1,11-dimésylate de 3,6,9-trioxaundécane 5

Les alcools primaires ont été convertis en mésylates par le traitement à froid du tétraéthylène glycol (TEG) avec du chlorure de méthanesulfonyle en présence de triéthylamine (figure II-11). Nous avons choisi de former le mésylate car c'est un meilleur nucléofuge que les halogènes et que le tosylate. La préparation du mésylate a été préférée à celle du tosylate car elle présente les avantages d'être plus rapide que cette dernière et, surtout, de fournir un brut réactionnel plus simple à purifier car l'excès de chlorure de mésyle est éliminé à l'évaporateur rotatif.

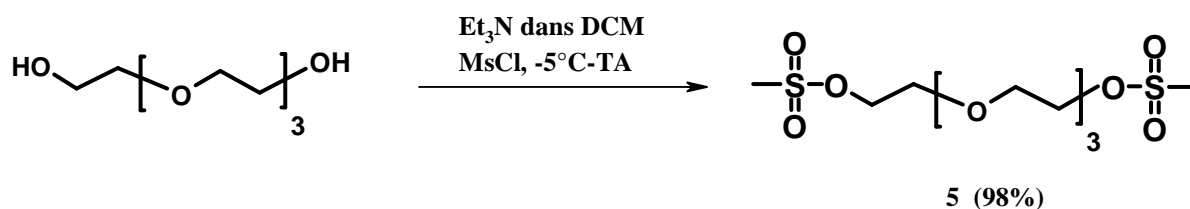


Figure II-11 : Méthylation du tétraéthylène glycol

Le composé 5 est obtenu avec un rendement quasi-quantitatif (98%). Les analyses, réalisées par spectrométries RMN et infra-rouge confirment la structure du produit attendu.

ii- Synthèse du 1,11-diazido-3, 6, 9-trioxaundécane 6

Nous avons préparé ce composé par chauffage du mésylate **5** dans un milieu protique polaire (éthanol) en présence d'azoture de sodium en excès (figure II-12).

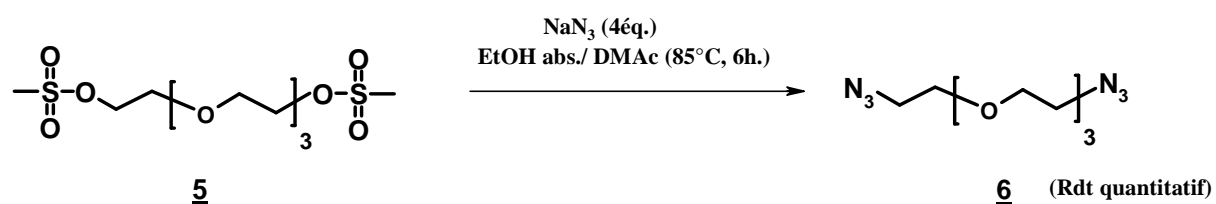


Figure II-12 : Synthèse du bras diazidé.

Le diazide **6** est obtenu en quelques heures avec un rendement quantitatif. La structure du produit attendu est confirmée par RMN et spectrométrie infra-rouge.

iii- Synthèse du 1-amino-11-azido-3,6,9-trioxaundécane 7

La réduction des azides constitue une méthode efficace et bien connue pour préparer les amines primaires. Parmi les méthodes de réduction envisageables, nous avons choisi la réduction de Staüdinger¹²⁵ (figure II-13) car cette réaction chimiosélective permet de réaliser efficacement la conversion de l'azide, dans des conditions remarquablement douces.

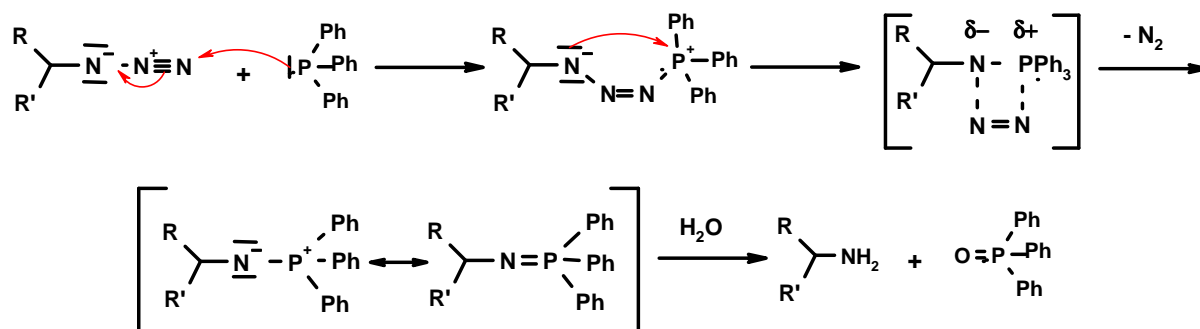


Figure II-13 : Mécanisme de la réduction de Staüdinger.¹²⁵

Un azide organique réagit avec une phosphine tertiaire (PR₃ avec R = alkyle ou aryle), générant un phosphorazide. Par élimination d'une molécule de diazote, ce dernier forme un iminophosphorane qui réagit avec l'eau pour donner l'amine primaire attendue est l'oxyde de phosphine (très hydrophobe). L'obtention du produit mono-réduit est contrôlée par l'addition

¹²⁵ H. Staüdinger, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 2, 635-646, 1919

progressive d'une quantité totale de triphénylphosphine (PPh_3) correspondant à 0,5 équivalent de phosphine par azide. Ce contrôle statistique est renforcé par le contrôle spatial qu'autorise l'usage d'un mélange biphasique (figure II-14). Dès sa formation, l'amine se protone et migre dans la phase aqueuse acide, préservant ainsi le produit attendu de toute nouvelle réduction puisque PPh_3 et OPPh_3 , très hydrophobes, restent dans la phase étherée. En fin de réaction, la phase aqueuse recueillie est basifiée et extraite pour fournir le composé **7** avec un rendement de 67%.

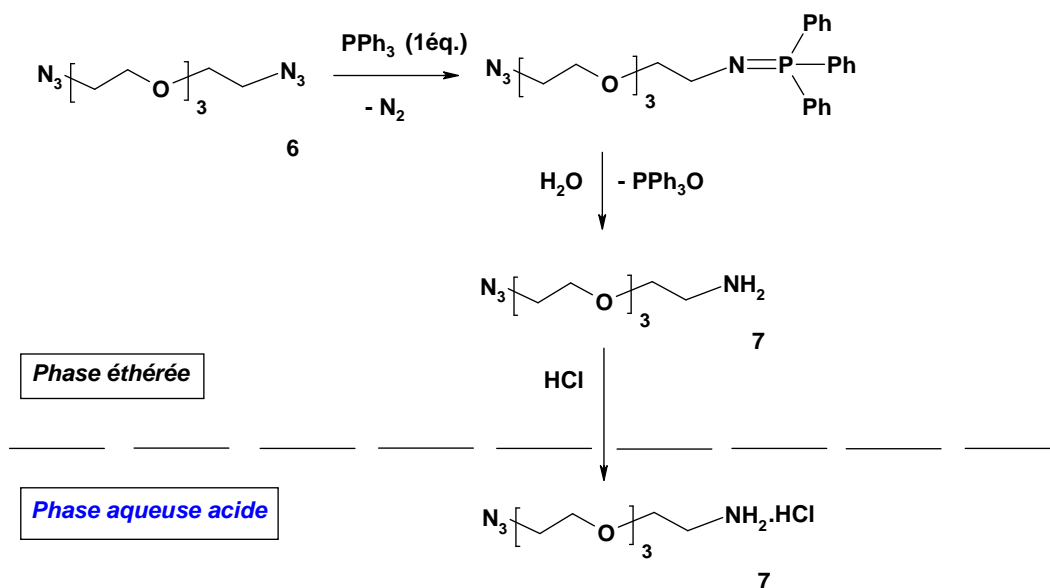
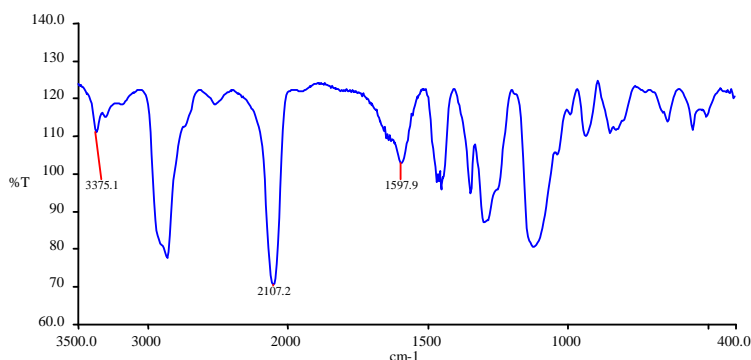


Figure II-14 : Réduction de Staudinger réalisée en milieu biphasique.

Pour les composés **5**, **6** et **7** l'analyse des spectres infra-rouge s'est avérée particulièrement utile, les groupements amine primaire (base libre) et azide étant très caractéristiques. Le spectre IR ci-dessous est celui du composé **7**.



Spectre IR du composé **7** : on distingue les bandes caractéristiques de l'amine primaire et celle du noyau azide.

Outre la bande forte de vibration asymétrique du groupe N_3 (2107cm^{-1}), on distingue la bande correspondant à la déformation de liaison N-H (1597cm^{-1}) ainsi qu'une des deux bandes

d'élongation de liaison N-H (3375cm^{-1}). Le spectre de masse haute résolution confirme la structure du composé **7**.

Ainsi, nous avons préparé le bras espaceur amino-azidé **7** à partir du tétraéthylène glycol avec un rendement global de 66%, selon un schéma de synthèse en trois étapes. Notre approche est plus simple, rapide et efficace que la méthode de préparation initialement décrite par Goncalves et *coll.*¹²¹ qui obtient ce composé en cinq étapes, également à partir du tétraéthylène glycol, avec un rendement global de 49%.

3) Synthèses des *méso*-tritolylporphyrines mono-carboxylique **8** et mono-propargylée **11**.

A- Synthèse des 5-(*para*-hydroxyphényl)- et 5-(*para*-carboxyphényl)-tritolylporphyrines selon la méthode de Little.

Nous avons utilisé la méthode des « aldéhydes mixtes » décrite par Little (page 22) car elle est bien adaptée à la synthèse des *méso*-tritolylporphyrines mono-fonctionnalisées **8** et **9** qui cristallisent dans le milieu en fin de réaction (figure II-15).

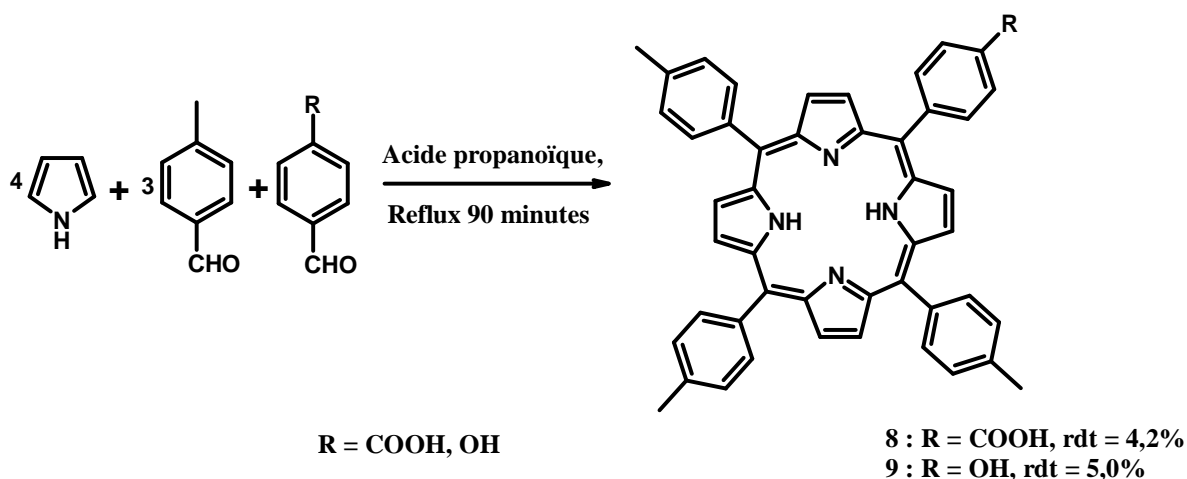


Figure II-15 : Synthèse des *méso*-aryltritolylporphyrines mono-substituées **8** et **9**.

Le produit attendu est obtenu par la condensation du pyrrole (4 éq.), et du *para*-tolualdéhyde (3 éq.) fraîchement distillés sur le 4-carboxybenzaldéhyde (1 éq.), dans l'acide propanoïque

au reflux qui joue le rôle de solvant et de catalyseur. La porphyrine mono-carboxylée cristallise après 18 heures à 4°C, en même temps que d'autres produits qui sont essentiellement la tétratolylporphyrine et des porphyrines di- et tri-carboxylées. Ce mélange est ensuite purifié par chromatographie éclairée, sur colonne de silice. On obtient ainsi la *méso* (4-carboxyphényl)-tritolylporphyrine **8** avec un rendement de 4,2%. En remplaçant le 4-carboxybenzaldéhyde par le 4-hydroxybenzaldéhyde, nous avons obtenu la *méso*-(4-hydroxyphényl)-tritolylporphyrine **9** avec un rendement de 5,0%. Ces rendements, certes modestes, restent néanmoins conformes à ceux attendus pour ce type de réaction et résultent notamment de la polymérisation concomitante du pyrrole.

Les analyses par spectrométries RMN du proton et UV-visible ont confirmé les structures des porphyrines obtenues.

En RMN du proton, on observe pour les composés **8** et **9** les principaux groupes de signaux attendus :

- les protons NH pyrroliques (vers -2,7ppm),
- les protons méthyliques des tolyles (vers 2,7ppm),
- les protons phényliques (vers 8,3ppm),
- et les protons β -pyrroliques (vers 8,8ppm).

Les spectres UV-visible de ces deux chromophores sont conformes à ceux attendus pour des *méso*-porphyrines. Nous pouvons noter cependant que le spectre du composé **9** (tableau II-1) se singularise par une légère modification dans la distribution des intensités de ses bandes I et II, donnant un spectre atypique avec ϵ_I supérieur à ϵ_{II} .¹²⁶

Tableau II-1: caractéristiques spectrales UV- visible des porphyrines **8** et **9** dans le chloroforme.

λ_{\max} est donné en nm, ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ en L.mol⁻¹cm⁻¹)

Composés	Soret	QIV	QIII	QII	QI	$\epsilon_I / \epsilon_{II}$
	λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	
8	420 (689,3)	517 (23,2)	553 (10,6)	592 (5,1)	648 (4,7)	0,92
9	416 (363,0)	516 (13,5)	552 (7,4)	592 (4,0)	648 (4,2)	1,05

¹²⁶ V. Chaleix, V. Sol, Y.-M. Huang, M. Guilloton, R. Granet, J.-C. Blais, P. Krausz, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1486-1493.

B- Alkylation de la *méso*-4-hydroxyphényltritolyl-porphyrine **9**

Pour fixer l'unité propargylique sur la porphyrine hydroxylée **9**, nous avons effectué une O-propargylation, par la réaction classique de Williamson (figure II-16).

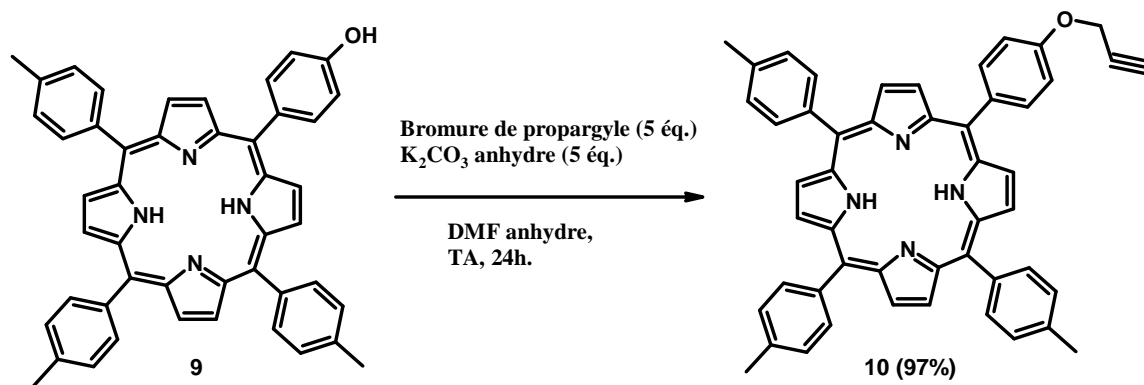


Figure II.16 : Fixation d'un alcyne vrai par éthérisation de Williamson.

Dans le DMF anhydre, la fonction phénol est convertie en phénate par un excès de carbonate de potassium (anhydre) et réalise une SN₂ sur le bromure de propargyle. Après 24 heures à température ambiante, l'addition d'eau précipite l'éther propargylique que nous avons isolé par filtration. Après purification par chromatographie, nous obtenons le composé **10** avec un rendement quasi-quantitatif (97%).

La structure du composé **10** est confirmée par RMN du proton. Outre les signaux caractéristiques observés sur le spectre de la *méso*-porphyrine **9**, on trouve les signaux correspondants aux protons propargyliques, à savoir -O-CH₂- (4,98ppm, triplet, ³J=2,2Hz) et C-H (2,68ppm, triplet, ³J= 2,5Hz). Le spectre de masse, obtenu par la méthode MALDI, montre la présence de l'ion quasi-moléculaire attendu.

C- Métallation par le Zinc de la porphyrine propargylée **10**

La *méso*-porphyrine **10** étant destinée à être engagée dans un couplage de « Click-Chemistry », l'utilisation de l'ion cuivre (I) en tant que catalyseur risquerait de la métaller, entraînant la perte de ses propriétés photosensibilisatrices. Afin d'éviter sa métallation par le

cuivre en cours de réaction, nous avons préalablement chélaté cette porphyrine par le zinc (figure II-17) qui est un métal facile à décomplexer.¹²⁷

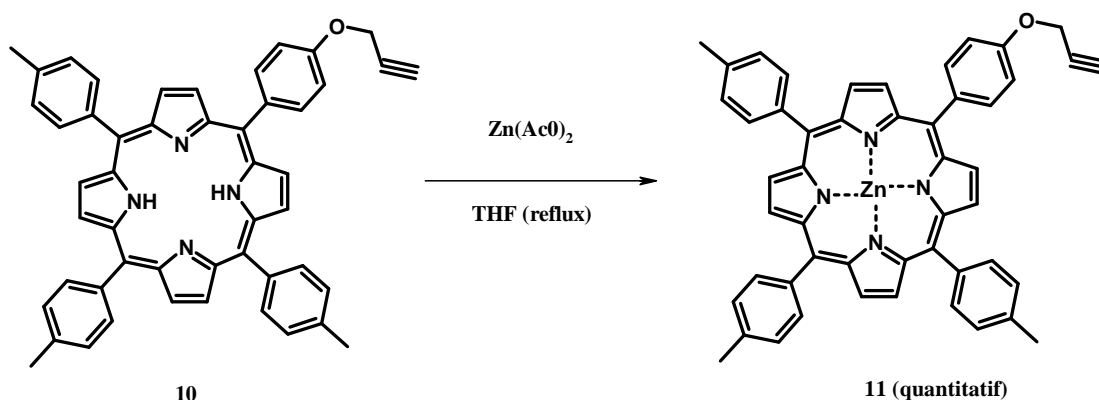


Figure II-17 : Métallation de la porphyrine **10** avec le diacétate de Zinc.

Cette métallation est réalisée en traitant la porphyrine base libre **10** avec un excès de diacétate de zinc, dans le THF au reflux durant 2 heures. La réaction est quantitative.

Par UV-visible on observe les bandes généralement attendues pour ce type de composé métallé.

III- ELABORATION DES MOLECULES CIBLES

Dans le but de construire les molécules cibles **16** et **17** nous avons élaboré des stratégies de synthèse convergentes. Dans un premier temps, les précurseurs ont été préparés et nous allons maintenant les coupler entre eux de manière covalente.

1) Couplage peptidique du bras espaceur **7** sur le vecteur **4a**

Rappelons que deux approches ont été envisagées pour l'élaboration des composés **16** et **17** (voir figures II-2 page 73 et II-3 page 75). Selon la voie I, la molécule-cible **16** est obtenue après couplage de la porphyrine **8** avec le composé **4b**. Ce peptide est également précurseur de synthèse pour le produit **17** selon la voie II. Nous l'avons obtenu par condensation de la fonction carboxylique du peptide **4a** avec l'amine primaire du bras espaceur **7** (figure II-18). Dans la NMP anhydre, en présence de DIEA, l'agent de couplage PyBOP[®] (1H-

¹²⁷ R.A. Decréau, J. P. Collman, Y. Yang, Y. Yan, and N. K. Devaraj, *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2794-2802

Benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidinophosphonium hexafluorophosphate) forme un « ester activé » à partir de l'acide carboxylique.¹²⁸⁻¹²⁹ Généré *in situ*, l'ester de benzotriazolyle est une espèce hautement réactive car le groupement O-benzotriazolyle est un excellent nucléofuge. La liaison amide se forme alors par une SN2 avec l'amine primaire présente dans le milieu.¹³⁰



Figure II-18 : Synthèse du composé **4b**.

Les meilleurs résultats sont obtenus en additionnant une quantité de HOBT équivalente à celle de PyBOP.¹³¹⁻¹³² Comme on peut le voir sur le schéma réactionnel détaillé figure II-19, la présence de HOBT n'est pas indispensable, mais son addition améliore le rendement par augmentation de la vitesse réactionnelle.

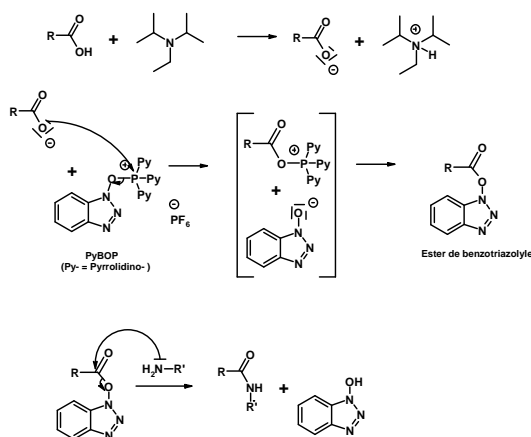


Figure II-19 : Schéma réactionnel d'un couplage peptidique réalisé avec le PyBOP.¹³³⁻¹³⁴

¹²⁸ J. C. Bagley, K. Barlos, *Int. J. Peptide Protein. Res.*, 36, 356 (1990).

¹²⁹ T. Høeg-Jensen, M. H. Jakobsen, C. E. Olsen, A. Holm, *Tetrahedron Lett.*, 32, 7617-7620 (1991).

¹³⁰ M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, Hubert Köster, *Tetrahedron Lett.*, 30, 4645-4648 (1989).

¹³¹ C.G. Fields, D.H. Lloyd, R.L. Macdonald, K.M. Otteson, R.L. Noble, *Pept.Res.*, 4, 95 (1991).

¹³² G.E. Reid, R.J. Simpson, *Anal. Biochem.*, 200, 301 (1992).

¹³³ J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett.*, 31, 205-208 (1990).

¹³⁴ L. Carpino, E.-F. Ayman, *Chem. Commun.*, 2, 201-203 (1994).

Un échantillon du peptide **4b** ainsi obtenu a été déprotégé puis analysé, selon la procédure décrite page 84. La déprotection et la purification d'une portion de **4b** ont ensuite permis d'obtenir le précurseur **4c**.

2) Couplages du bras espaceur **7** sur les *méso*-porphyrines carboxylée **8** et propargylée **11**

A- Synthèse de la porphyrine porteuse du bras espaceur **13** par couplage peptidique.

Le composé **12** est obtenu par création d'une liaison amide engageant l'amine primaire du composé **7** et la fonction carboxylique du composé **8**. Par réduction de Staudinger, le composé **12** fourni ensuite la porphyrine aminée **13**.

i- Synthèse de la porphyrine azidée **12**

Pour parvenir au composé **12**, nous avons fait réagir la porphyrine carboxylée **8** sur le bras espaceur amino-azidé **7** introduit en excès (2 équivalents d'amine par fonction carboxylique). Le chlorhydrate de N,N-diméthyl-aminopropyl-éthyl-carbodiimide (EDC) est un carbodiimide hydrosoluble, tout comme l'urée qui est le sous-produit de la réaction. Nous avons choisi de l'utiliser en présence de N-hydroxy-succinimide (NHS) qui est un catalyseur hydrosoluble dans le but de former un système couplant efficace, pouvant être éliminé, en fin de réaction, par de simples lavages à l'eau. Le couplage est réalisé dans le chloroforme, à température ambiante, avec un rendement de 98% (figure II.20).

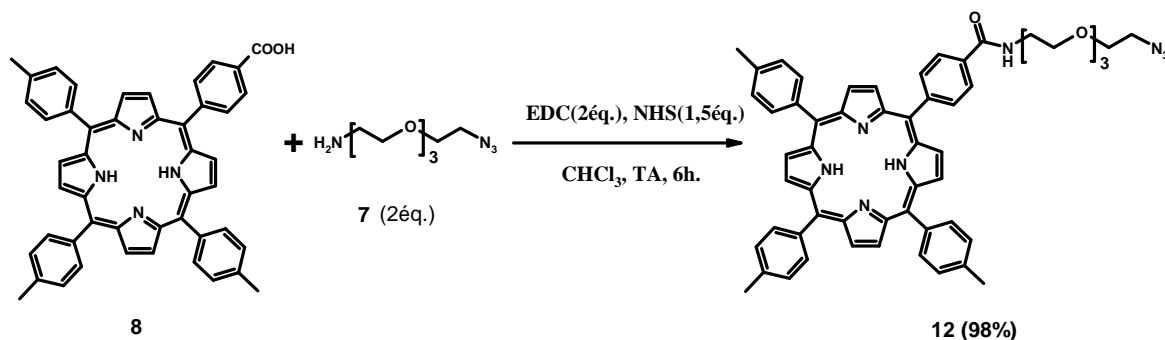


Figure II-20 : Synthèse du composé **12** par couplage peptidique.

Le mécanisme proposé pour ce couplage est présenté figure II-21. Dans un premier temps, l'addition nucléophile (A) d'un acide carboxylique sur le carbodiimide permet l'activation du groupement carbonyle, sous la forme d'un anhydride mixte (O-acylisourée). Ce dernier, en présence de N-hydroxysuccinimide (NHS), forme un ester par substitution nucléophile (B).

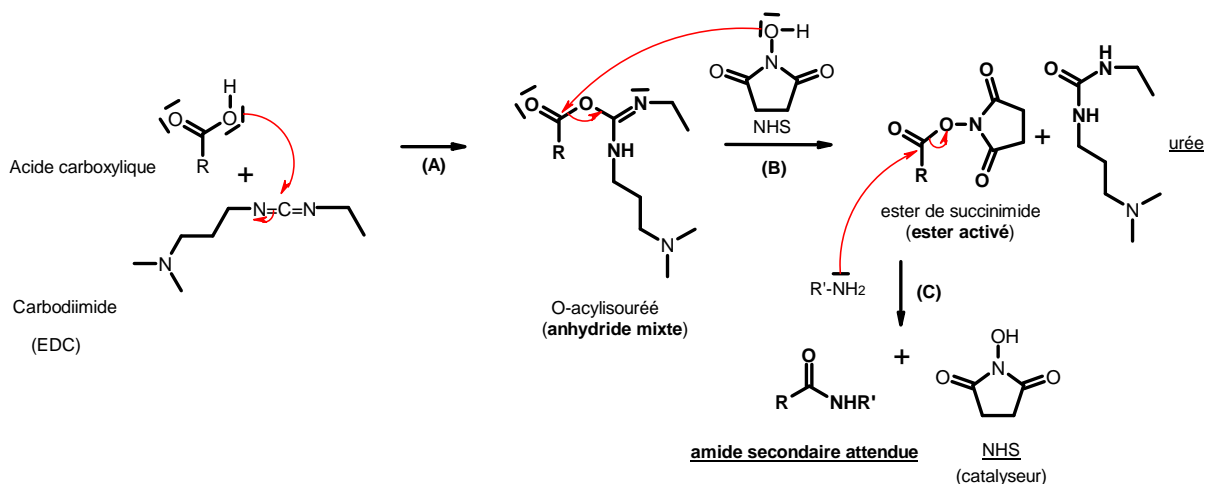


Figure II-21 : Mécanisme réactionnel du couplage peptidique réalisé avec le système EDC/NHS.

L'ester de succinimide obtenu est particulièrement électrophile car il est composé d'un groupement très nucléofuge. Cet ester activé est l'intermédiaire le plus efficace¹³⁵ (pas de réactions secondaires, et bonne stabilité thermique et chimique, notamment vis-à-vis des composés hydroxylés tels l'eau et les alcools) pour former une liaison amide par substitution nucléophile (C) avec une amine introduite dans le milieu.

ii- Synthèse et caractérisation de la porphyrine aminée 13

La fonction azide terminale portée par le composé **12** est convertie en amine primaire par une réduction de Staudinger. La porphyrine **12** est traitée en conditions douces, par la triphénylphosphine dans le THF en présence d'eau (figure II-22).

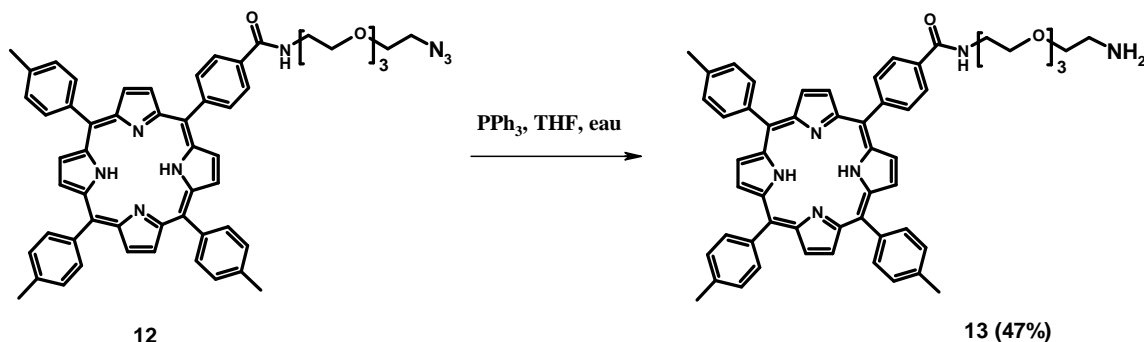


Figure II-22 : Synthèse de la porphyrine aminée **13** par réduction de Staudinger.

¹³⁵ L. Carpino, E.-F. Ayman, F. Albericio, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 11, 3561-3564.

La porphyrine aminée **13** est obtenue avec un rendement de 47%, résultat acceptable, s'expliquant surtout par la difficulté de purification du composé aminé sur colonne. Les analyses du produit obtenu par spectrométries RMN (^1H et ^{13}C), de masse et UV-visible ont confirmé sa structure

Parmi les spectres RMN du proton des *méso*-tritolylporphyrines, nous avons choisi de détailler l'étude du 5-[4-amido-3,6,9-trioxaundeca-11-amino)-phényl]-10,15,20-tritolylporphyrine **13** (figure II-23).

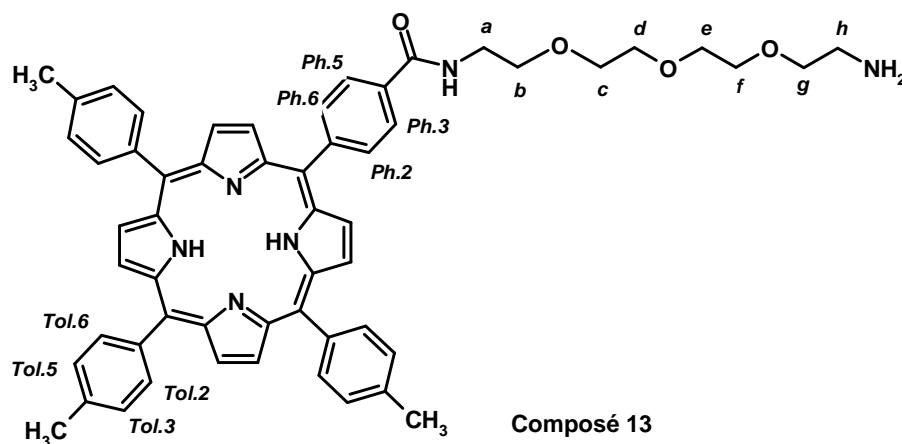


Figure II-23 : Groupes des principaux signaux des spectres RMN (^1H et ^{13}C) du composé **13**.

Ce composé est substitué en position para du groupe *méso*-aryle par la fonction amide secondaire formée avec un bras espaceur de type tétraéthylène glycol. La symétrie relative du composé simplifie l'allure du spectre. En effet, en raison du rapide échange tautomérique des protons internes NH pyrroliques, la porphyrine présente une symétrie d'ordre 2. Nous observons :

- Un singlet élargi à -2,77ppm correspondant aux NH pyrroliques.
- Les protons méthyliques, portés par les tolyles, résonnent sous la forme de singlets, à 2,70ppm.
- Le singlet élargi observé à 4,86ppm correspond aux protons de la fonction amine primaire.
- Les protons portés par l'espaceur résonnent sous la forme d'un singlet à 2,81ppm pour H_h , sous la forme d'un triplet à 3,48ppm ($J=5,0\text{Hz}$) pour H_g , tandis que les protons $H_{a,b,c,d,e}$ résonnent sous forme de multiplets, entre 3,62 et 3,85ppm.
- Les protons β pyrroliques résonnent sous la forme d'un singlet à 8,78ppm pour H_2 et 18, et sous la forme d'un doublet à 8,86ppm pour $H_{3,7,8,12,13}$ et 17 ($J=4,7\text{Hz}$).

- Les protons aromatiques des *méso*-substituants résonnent sous forme de doublets à 7,55ppm et 8,08ppm ($J=7,8\text{Hz}$) respectivement pour les protons des tolyles $H_{3,5}$ et $H_{2,6}$.
- Enfin, les doublets observés à 8,25ppm et 8,27ppm ($J=8,3\text{Hz}$) correspondent respectivement aux protons aryliques $H_{2,6}$ et $H_{3,5}$. Le rapport des intégrations confirme ces attributions.

L'analyse du spectre ^{13}C de ce composé en J-MOD (figure II-24) permet de discriminer les carbones selon leur nature (carbones primaires et tertiaires, secondaires et quaternaires). On observe les signaux caractéristiques des *méso*-porphyrines en général et du composé **13** en particulier:

- Le carbone de la fonction amide est le plus déblindé : il résonne à 167,8ppm.
- Les signaux des carbones tertiaires C 3 et 5 aryliques et des tolyles résonnent respectivement à 134,5 et 127,4ppm.
- Les signaux des carbones tertiaires C 2 et 6 aryliques et des tolyles résonnent respectivement à 125,7 et 134,5ppm.
- Les carbones quaternaires en position 1 (ipso) des tolyles résonnent à 139,1ppm, tandis que les C4 résonnent à 137,4ppm.
- Le carbone quaternaire en position 1 (ipso) arylique résonne à 118,5ppm.
- Les carbones α et β pyrroliques résonnent respectivement vers 145-150 et 131,1ppm.
- Les carbones *méso* résonnent sous la forme de deux signaux, à 120,6 et 120,3ppm : le plus déblindé correspond au C5, substitué par le groupe aryle.
- Les carbones secondaires Ca et Ch résonnent respectivement à 40,1 et 41,6ppm.
- Les autres carbones portés par le bras espaceur (Cb,c,d,e et f) sortent sous la forme d'un unique signal, à 70,61ppm, tandis que Cg, déblindé, résonne à 73,2ppm.
- Enfin, nous trouvons à 21,5ppm le signal des carbones méthyliques des tolyles.

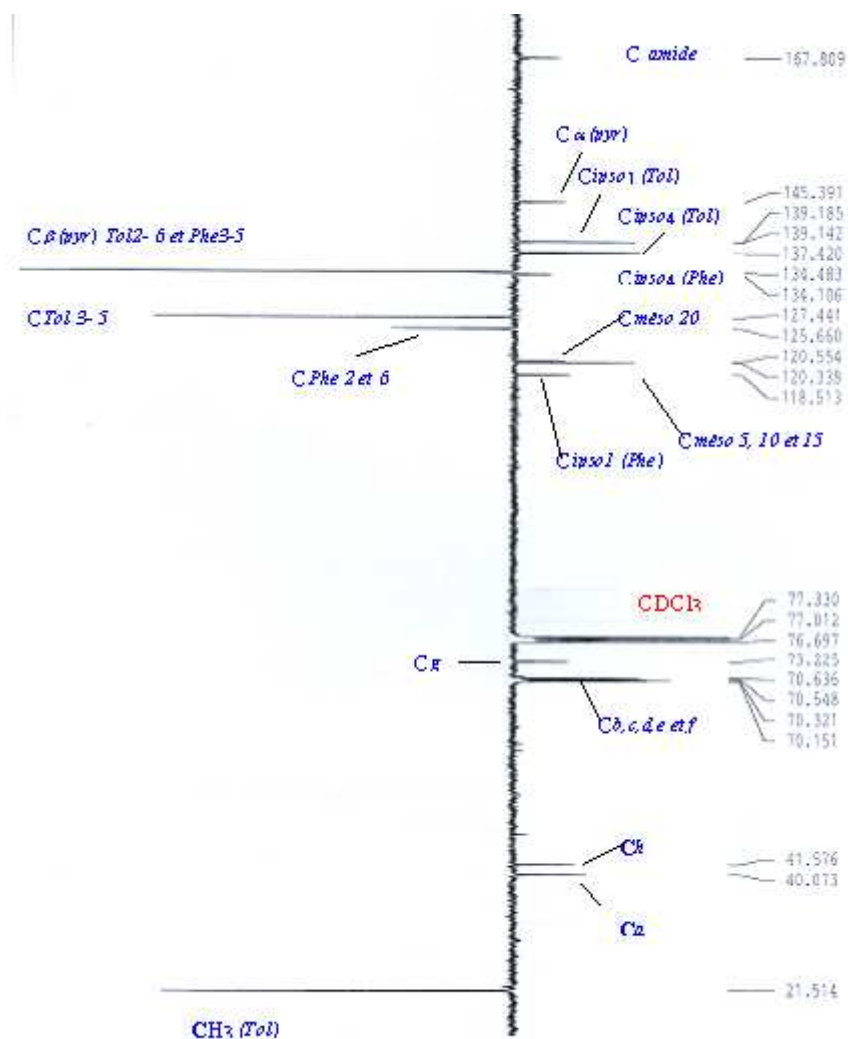
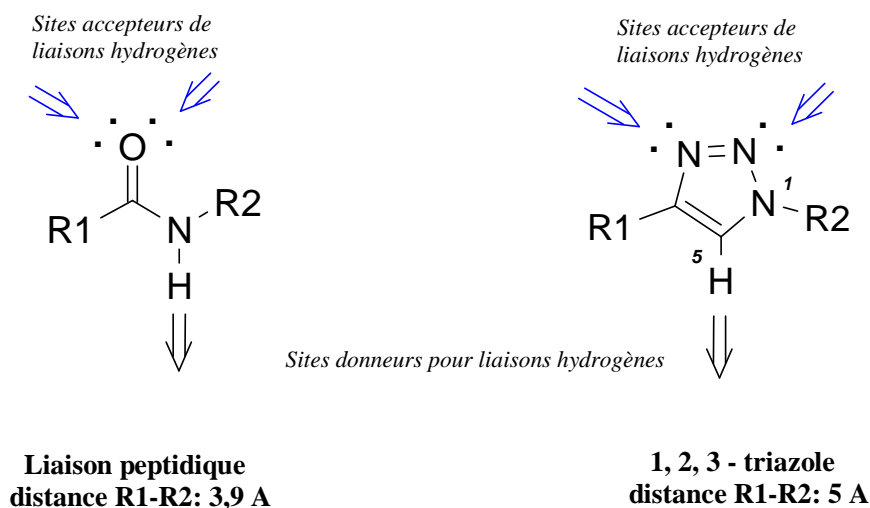


Figure II-24 : Spectre RMN ^{13}C (J-MOD) de la *mésoporphyrine 13*.

B- Couplage du bras espaceur 7 sur la porphyrine acétylénique 11 par réaction de « *Click-Chemistry* »

Une étude détaillée de la littérature montre l'intérêt de remplacer une liaison amide par un hétérocycle de type 1,2,3-triazole. En effet, ces hétérocycles présentent d'importantes similarités topologiques et électroniques qui en font d'excellents liens peptidomimétiques, insensibles à l'hydrolyse.¹³⁶

¹³⁶ a) W.S. Horne, C.D. Stout, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 9372-9376. b) W.S. Horne, M.K. Yada, C.D. Stout, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 15366-15367.



Du point de vue structural, le remplacement d'une liaison amide par un triazole se traduit par l'allongement de la distance R1-R2 (gain de 1,1 Å) et par l'augmentation de la polarité du lien covalent. L'important moment dipolaire de l'hétérocycle explique sa remarquable aptitude à établir des liaisons hydrogènes. En effet, les atomes N2 et N3 du triazole sont d'excellents sites accepteurs de liaisons hydrogènes, et ces dipôles permanents peuvent induire, la polarisation de la liaison C-H en position 5, qui devient alors un excellent site donneur de liaison hydrogène (dipôle induit). C'est pourquoi notre attention s'est portée sur le concept de « *Click-Chemistry* », né en 2001 grâce aux travaux de Sharpless et *coll.*¹³⁷ Dans un premier temps, nous proposons de faire une brève mise au point sur cette approche.

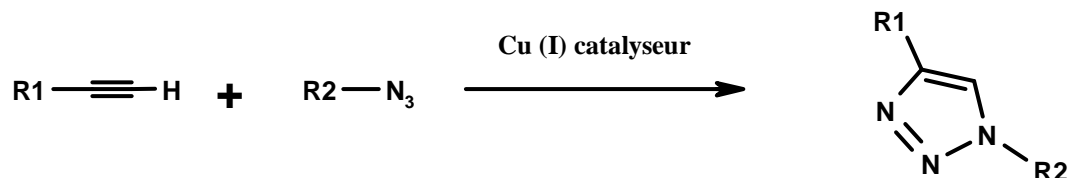
i- « *Click-Chemistry* », état de la question

Cette approche nouvelle vise la construction de manière fiable, simple et rapide d'une grande variété de composés en joignant de petites unités via des liaisons hétéroatomiques (C-X-C). Les réactions utilisées à cet effet supportent les conditions ambiantes et permettent d'obtenir les produits attendus après une procédure de purification efficace et simple à mettre en œuvre. Parmi les réactions de « *Click-Chemistry* », la plus efficace est une cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen catalysée par le cuivre (I). Optimisée par Sharpless¹³⁸ et Meldal¹³⁹, cette réaction conduit à la formation chimio- et régiosélective de 1,2,3-triazoles 1,4-disubstitué à partir d'un azide et d'un alcyne vrai :

¹³⁷ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2001**, 40, 2004–2021.

¹³⁸ Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 3057–3064.

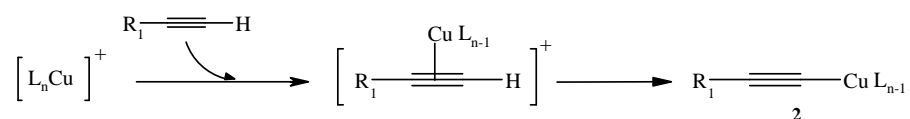
¹³⁹ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2002**, 41, 2596–2599;



Les alcynes et les azides sont des fonctions simples à introduire et possèdent une grande inertie aux conditions employées en synthèses organiques et vis-à-vis des molécules biologiques qui sont des macromolécules hautement fonctionnalisées.

Par voie thermique, en l'absence de catalyseur, le mécanisme de l'addition de l'azide sur le dérivé acétylénique est de type concerté, ce qui conduit à la formation d'un mélange de triazoles 1,4- et 1,5-disubstitués. En revanche, la cycloaddition catalysée par Cu^I passe par la formation de complexes "Cuivre-acétylure", selon un mécanisme par étapes. La figure II-25 décrit le mécanisme proposé par Sharpless et *coll.* de cette cycloaddition catalysée par le Cu^I .¹⁴⁰ La réaction peut se décomposer en quatre étapes et nécessite des ligands labiles autour de l'atome de cuivre, afin de permettre une compétition avec la fixation de l'azide :

- Dans un premier temps, l'alcyne (A) forme un complexe avec le cuivre nommé "Cu-acétylide" (B).



- L'atome de cuivre active alors la fonction azide, qui se substitue à un ligand pour former l'intermédiaire (C).

- Ce rapprochement spatial des deux parties réactives, face à face, rend possible l'attaque du C-2 de l'acétylide sur le N-3 de l'azide pour donner le métallacycle à 6 chaînons (D), avec le cuivre au degré d'oxydation +III.

- Par contraction du métallacycle (D) le dérivé cuivre-triazole (E) est formé.

- Enfin, la protonation du dérivé cuivre-triazole permet de récupérer le composé triazolé 1,4-disubstitué (F) en régénérant le catalyseur cuivreux.

¹⁴⁰ F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 210-216.

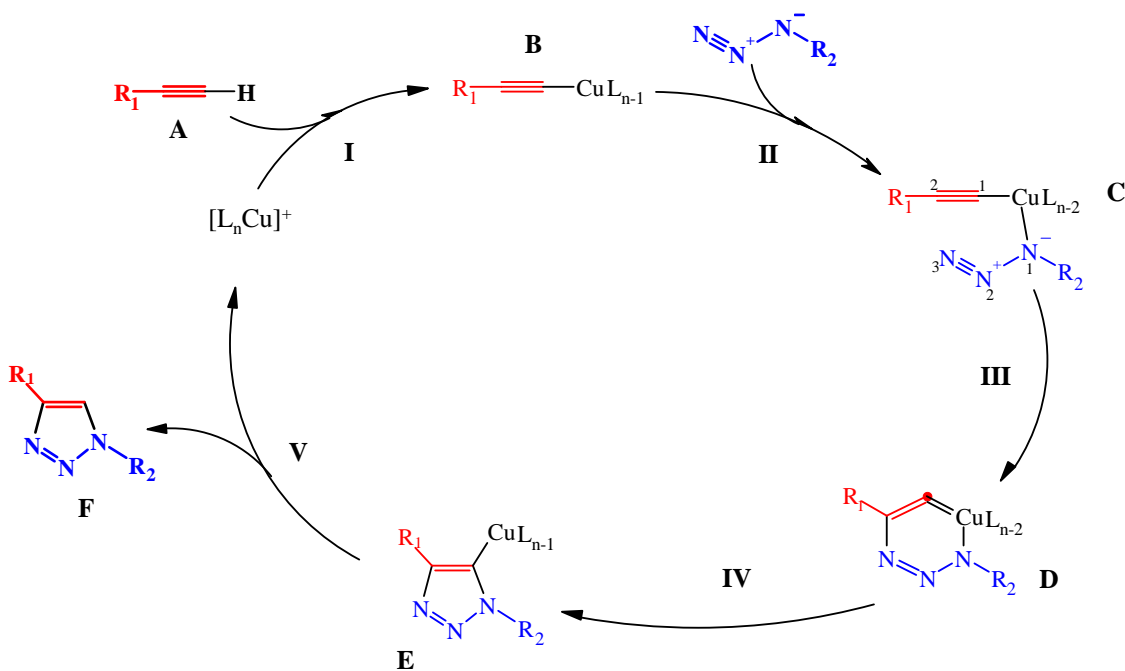


Figure II-25.: Mécanisme de cycloaddition 1,3 catalysée par le CuI.¹³⁹

Le profil réactionnel détaillé dans la figure II-26 met en évidence les intermédiaires issus du mécanisme précédent ainsi que plusieurs états de transition.¹⁴¹ Hautement exothermique, cette réaction cinétiquement contrôlée est conduite de préférence dans l'eau, et tolère néanmoins une large gamme de co-solvants organiques. Ainsi modifiée, la cycloaddition 1,3-dipolaire présente une excellente tolérance fonctionnelle, ce qui en fait une réaction utilisable en chimie biomédicale¹⁴², pour la synthèse de substances naturelles¹⁴³ ou encore en science des matériaux.¹⁴⁴

¹⁴¹ F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 210-216.

¹⁴² R. Mantesch, A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12809-12818

¹⁴³ M. Malkoch, R.J. Thibault, E. Drockenmuller, M. Messerschmidt, B. Voit, T.P. Russell, C.J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14942-14949.

¹⁴⁴ B. L. Wilkinson, Laurent F. Bornaghi, Sally-Ann Poulsen and Todd A. Houston *Tetrahedron* **2006**, 62, 8115-8125

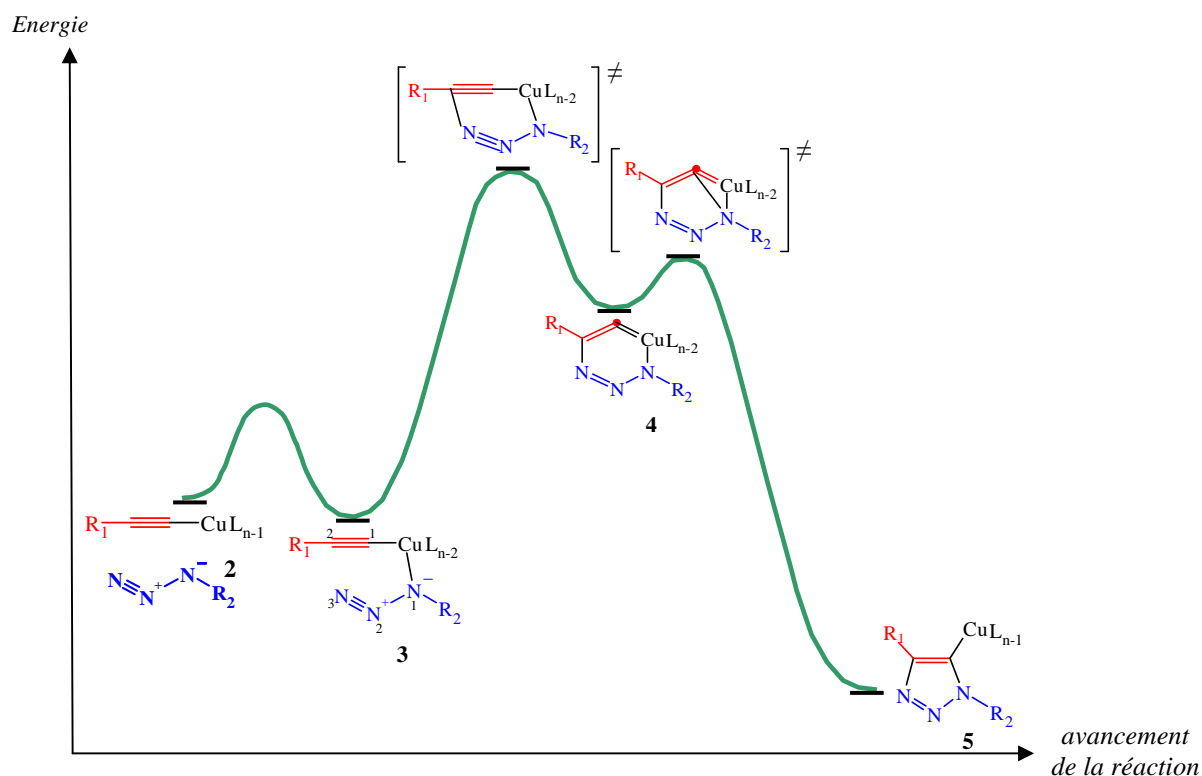


Figure II-26 : Profil réactionnel de la cycloaddition 1,3 catalysée par Cu^I .¹⁴⁰

Click-Chemistry assistée par micro-ondes

Pérez-Balderas et coll.¹⁴⁵ ont rapporté des réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire activées par micro-ondes (figure II-27) : les cinétiques sont alors raccourcis de façon significative (quelques minutes au lieu de quelques heures), sans diminution de rendement ni formation de produits secondaires.

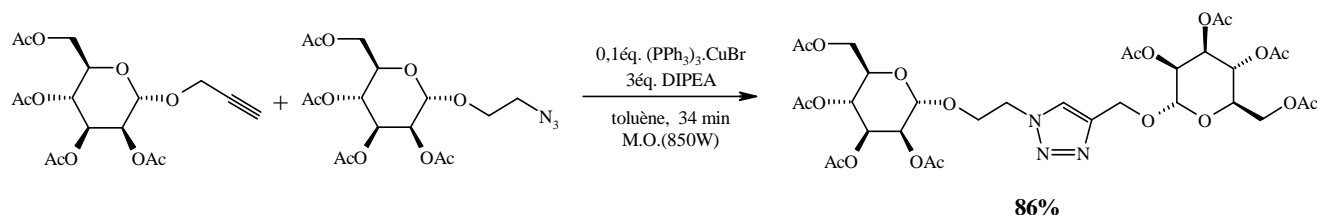


Figure II-27 : Exemple de synthèse de glycoconjugués par "Click-Chemistry" couplée à une activation micro-ondes proposé par Pérez-Balderas et coll.¹⁵²

L'utilisation des micro-ondes en synthèse organique représente incontestablement une source de progrès en synthèse organique, c'est pourquoi nous nous proposons de faire un rappel sur cette technique moderne en annexe I (page 181).

¹⁴⁵ F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, Julia Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F.G. Calvo-Flores, J.A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Org. Letters*, **2003**, 5, 11, 1951-1954.

ii- Cycloaddition 1,3- dipolaire catalysée par l'ion cuivreux et assistée par micro-ondes. Greffage covalent de l'espaceur azidé **7** sur la *méso*-porphyrine propargylée **11**.

La *méso*-tritolylporphyrine munie d'un bras espaceur aminé **15** a été préparée par activation micro-onde. Nous avons établi un lien covalent par engagement de l'azide du composé **7** et l'alcyne terminal de la *méso*-porphyrine propargylée **11** dans une cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par l'ion cuivreux. Ainsi, l'hétérocycle 1,2,3-triazole relie le bras tétraéthylène glycol et la *méso*-tritolylporphyrine, respectivement fixés sur ses positions 1 et 4 (figure II.28).

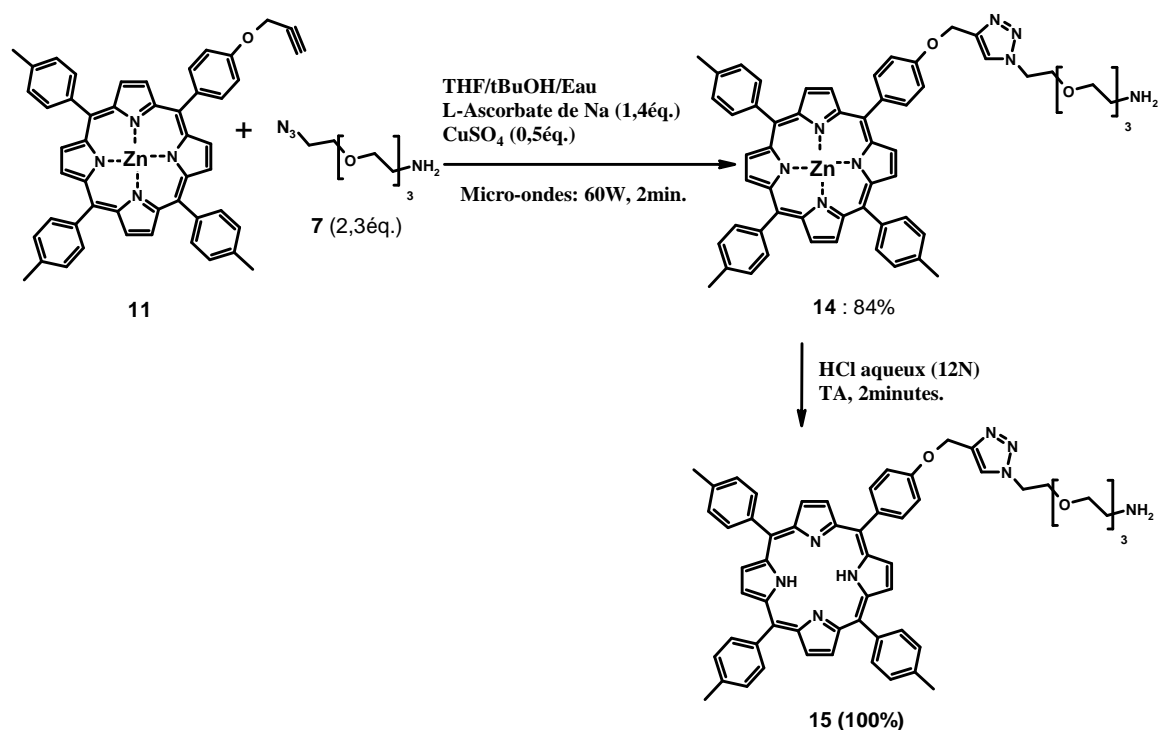


Figure II.28 : Synthèse du composé **15** par réaction de *Click-Chemistry*.

Le milieu réactionnel choisi est un mélange aqueux de co-solvants polaires (THF/ *t*BuOH / eau).¹⁴⁶ Le cation Cu^I est formé *in situ* par le système CuSO₄ / L-Ascorbate de sodium.¹⁴⁷ La porphyrine est préalablement métallée avec du zinc afin d'éviter sa complexation avec le cuivre au cours de la réaction.¹⁴⁸ Induite par micro-ondes de faible intensité (60W), la réaction est complète en deux minutes. L'addition d'eau provoque la précipitation du produit **14** qui

¹⁴⁶ V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41(14), 2596-2599.

¹⁴⁷ C.W. Tornøe, C. Christensen; M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064.

¹⁴⁸ R.A. Decréau, J.P. Collman, Y. Yang, Y. Yan, and Neal K. Devaraj *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2794-2802

est ainsi obtenu sous forme pure avec un rendement molaire de 84%. Le produit attendu **15** est finalement obtenu après un bref traitement en milieu acide. La protonation du macrocycle déplace le zinc, permettant de démétaller quantitativement la porphyrine, en seulement 2 minutes à température ambiante. Les analyses confirment la structure attendue pour le composé **15**.

La caractérisation UV-visible (tableau II-2) permet d'observer un spectre de type *étio* pour le composé **15**, ces modifications des bandes Q sont liées à la démétallation du produit, en contraste avec les spectres observés pour les composés **11** et **14**.

Tableau II-2 : Caractéristiques spectrales UV-Visible des *méso*-tritolyloporphyrines **15**, **14** et **11**, mesurées dans CHCl₃. λ_{\max} est donnée en nanomètres, (ϵ est le coefficient d'absorption, à 20°C, en L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Composés	Soret λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	Q _{IV} λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	Q _{III} λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	Q _{II} λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	Q _I λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)
15	420 (572,4)	517 (25,2)	553 (15,0)	592 (8,0)	648 (7,5)
14	430 (336,1)	562 (27,3) [bande β]		605 (23) [bande α]	
11	425 (460)	561 (15,6) [bande β]		601 (6,2) [bande α]	

Pour la RMN ¹H du composé **15**, on observe la présence des signaux correspondants aux protons -O-CH₂- sous la forme d'un triplet ($J=2,2$ Hz) à 4,98ppm. Le proton porté par le triazole résonne, quant à lui, sous la forme d'un singulet fortement déblindé (7,19ppm).

Enfin, la spectrométrie MALDI permet d'observer l'ion quasi-moléculaire attendu ($[M+H]^+=930,20$).

3) Couplages des précurseurs finaux

Après la fixation du bras espaceur sur le précurseur peptidique (synthèses de **4b** et **4c**) ou sur les précurseurs porphyriniques (synthèses de **13** et **15**) la dernière étape de synthèse consiste à greffer le troisième bloc moléculaire (porphyrines **8**, **11**, **13** ou **15**) sur nos constructions peptidiques (respectivement, les peptides cycliques **4b**, **4c** ou **4a**) par couplage peptidique ou par cycloaddition de « *Click-Chemistry* ».

A- Synthèse des molécules-cibles 16 et 17 par couplages peptidiques

i- Greffage de la porphyrine 8 sur le peptide 4b

Dans un premier temps, nous avons entrepris la synthèse du composé **16** par la voie I (figure II-2). Cette approche implique la formation d'une liaison amide par condensation de la fonction carboxylique de la porphyrine **8** avec l'azoture porté par le peptide azidé **4b** (figure II-29). Notre intérêt s'est porté sur cette réaction car elle est réputée efficace et chimiosélective.¹⁴⁹

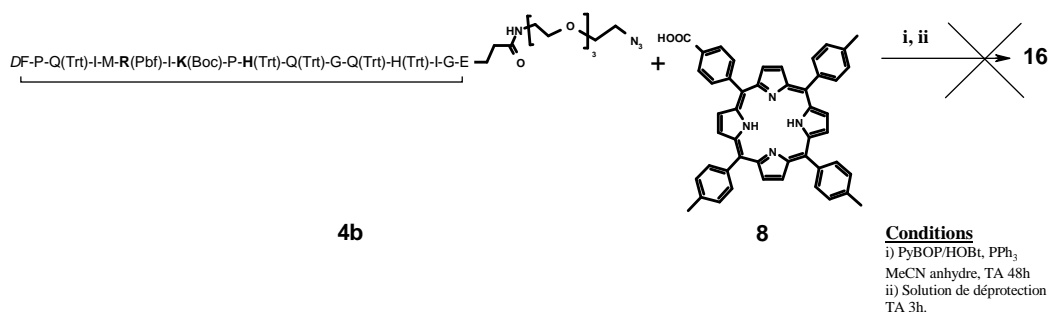


Figure II-29 : Réaction de couplage attendue entre un acyle et un azide activés.

Le mécanisme proposé pour cette réaction est présenté figure II-30. Dans l'acétonitrile anhydre, l'acyle activé est généré *in situ* grâce au système PyBOP/HOBt. En présence d'une trialkylphosphine, l'azide est converti en iminophosphorane (intermédiaire de Staudinger) qui réagit alors avec l'acyle activé pour former l'amide.¹⁵⁰

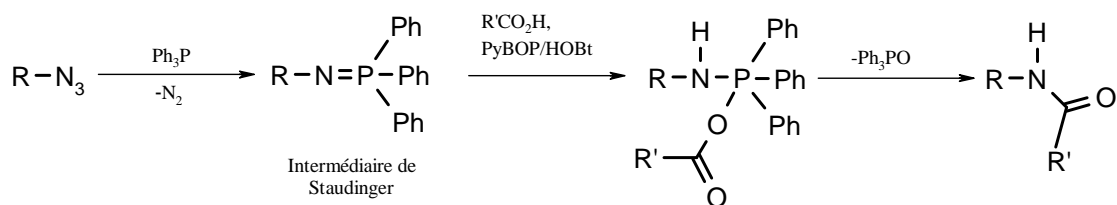


Figure II-30 : mécanisme proposé pour la formation d'une liaison amide.¹⁴⁹

Cependant, après 48 heures de réaction, nous n'avons pas pu obtenir le produit de couplage.

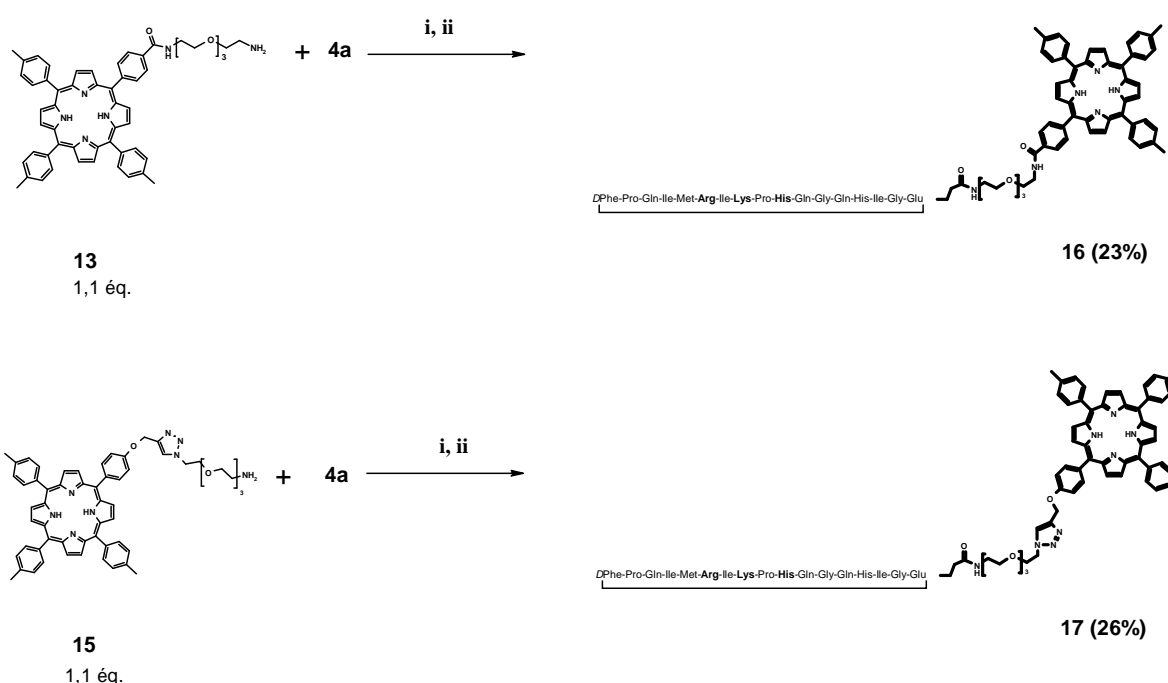
¹⁴⁹ a) P. Boullanger, V. Maunier, D. Lafont, *Carbohydr. Res.*, 324, **2000**, 97-106.

b) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* 287, **2000**, 2007-2010.

¹⁵⁰ S.-D. Park, J.-H. Oh, D. Lim, *Tetrahedron Lett.*, 43, **2002**, 6309- 6311.

ii- Greffage des porphyrines **13** et **15** sur le peptide **4a**

Rappelons que le peptide cyclique **4a** est le précurseur du *cyclo*VEGI. Cette molécule a été conçue dans le but d'établir un couplage « site-spécifiques » avec les chromophores **13** et **15**. En effet, sur le précurseur **4a**, les résidus imidazole, amino- et guanidino- qui constituent la séquence active du *cyclo*VEGI sont respectivement protégés par les groupements Trt, Boc et Pbf. Dans la séquence de **4a**, la seule fonction libre est l'acide carboxylique du résidu glutamate, que nous avons engagée pour établir une liaison peptidique avec les porphyrines aminées **13** ou **15**. Bien que le *cyclo*VEGI soit une molécule hydrophile, les groupes protecteurs sont à l'origine de l'hydrophobicité de **4a**. Le caractère hydrophobe des produits attendus nous a incité à conduire les greffages avec le système couplant EDC/NHS dans le chloroforme, selon le protocole discuté page 94.



Conditions:

i- Couplage:

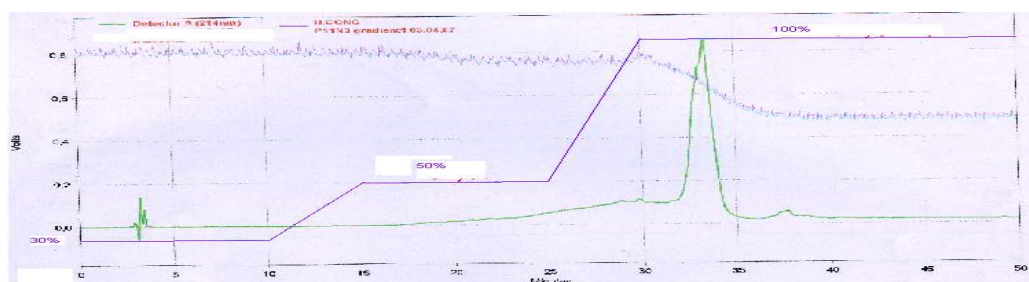
EDC (2éq.), NHS (1,5éq.), CHCl₃, TA 48h.

ii- Déprotection:

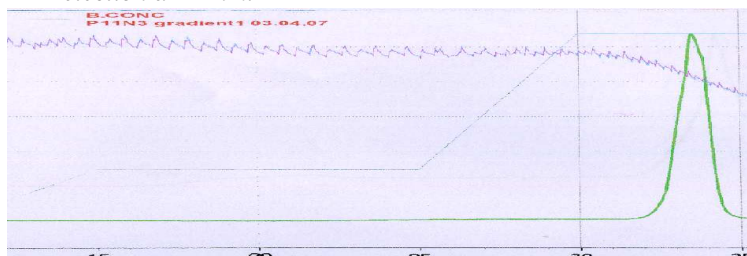
TFA (Thioanisole, TIS, Phénol et eau)

Figure II.31 : Condensation des porphyrines **13** et **15** sur le peptide VEGI protégé, puis déprotection.

Les molécules cibles **16** et **17**, sont finalement obtenues après déprotection de la séquence du peptide précurseur en milieu fortement acide. La purification des produits déprotégés a été réalisée par RP-HPLC préparative sur colonne C₁₈. L'efficacité de purification par HPLC préparative a été contrôlée par HPLC analytique, avec détections à 214nm et 438nm (figure II-32).



A- Détection à 214nm.



B- Détection à 438nm.

Figure II-32 : Chromatogrammes analytiques réalisés après RP-HPLC préparative du composé **16**.

Pour une même fraction, le chromatogramme **A** met en évidence la présence d'un peptide par détection à 214nm et l'analyse du chromatogramme **B** montre la présence du chromophore, détecté à 438nm pour le même temps de rétention (33-34 minutes). Cette fraction a ensuite été caractérisée par spectrométrie MALDI (tableau II-3).

Tableau II-3 : Spectrométrie MALDI.

Composé :	Masse molaire calculée (en uma)	Masse observée [M+H] ⁺ (en uma)
12	901,09	902,10
13	875,09	876,16
15	929,14	930,20
16	2854,28	2855,67
17	2908,14	2909,54

Les composés **16** et **17** sont obtenus avec des rendements respectifs de 23% et 26%. La pureté non contrôlée du précurseur peptidique **4a** pourrait expliquer ces faibles résultats. Les chromophores **16** et **17** présentent une excellente hydrosolubilité et sont également solubles dans le DMAc et le DMF.

Les spectres UV-visible de ces composés ont été réalisés dans l'eau, ils sont de type *étio* (tableau II-4).

Tableau II-4: caractéristiques spectrales UV- visible des porphyrines **16** et **17** dans l'eau.

λ_{\max} est donné en nm, ($\epsilon \cdot 10^{-3}$ en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)

Composés	Soret λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	QIV λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	QIII λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	QII λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	QI λ_{\max} ($\epsilon \cdot 10^{-3}$)	$\epsilon_I / \epsilon_{II}$
16	438 (181,1)	519 (6,7)	556 (3,0)	589 (1,9)	646 (1,4)	0,73
17	431 (334,3)	519 (19,8)	554 (12,4)	592 (6,7)	655 (6,0)	0,89

Nous pouvons cependant remarquer un fort déplacement de la bande de Soret vers le rouge (438nm pour **16** et 431nm pour **17**), ce qui est caractéristique d'une agrégation de type « *edge to edge* ». ¹⁵¹

Difficilement exploitables pour de telles structures, les spectres RMN de ces composés n'ont pas été réalisés. Le vecteur moléculaire est un peptide cyclique de 17 acides aminés, et sa séquence de reconnaissance pour les récepteurs de la *néo*-angiogenèse doit être préservée de toute modifications chimiques, ce qui implique la mise en place de groupes protecteurs semi permanents. Garantissant l'intégrité de l'activité biologique, cette protection est cependant gênante, car elle ne permet pas de purifier le peptide : jusqu'à la déprotection finale, nous avons été obligé de travailler « en aveugle ». Nous avons pourtant obtenu les molécules ciblées, avec des rendements de 23 à 26%, valeurs du même ordre que les rendements de synthèse du peptide lui-même. En ce sens, nous sommes satisfaits par ces résultats, obtenus après couplages et déprotections.

B- Couplage de la porphyrine 11 sur le peptide azidé 4c par réaction de « *Click-Chemistry* »

Hautement chimio- et régiosélective, la cycloaddition 1,3-dipolaire catalysée par le cuivre (I) est une approche de couplage particulièrement prometteuse qui permet d'envisager le greffage contrôlé d'une porphyrine sur peptide déprotégé et purifié. Devant l'intérêt que suscite cette cycloaddition, sa facilité de mise en œuvre et les très bons rendements généralement obtenus, nous avons appliqué cette méthodologie à la synthèse de **17**. Au regard de la nature peptidique du vecteur **4c**, l'activation par micro-ondes n'a pas été envisagée. Dans un premier temps, nos essais ont porté sur la composition du solvant à utiliser pour de cette réaction, en générant *in*

¹⁵¹ J. H. Furhop, C. Demoulin, C. Boettcher, J. Koning, U. Siggel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4159.

situ l'ion cuivreux par réduction du sulfate de cuivre avec l'ascorbate de sodium. Mais les mélanges *t*-butanol/eau/THF, DMF/eau et DMF/eau/acétone n'ont pas permis d'obtenir le produit de couplage après 72 heures à température ambiante. Nous avons donc essayé une autre méthode pour générer le catalyseur, consistant à oxyder du cuivre métal. Pour se faire, il suffit d'introduire un large excès de tournure de cuivre au mélange azide/alcyne. Encore une fois, le produit n'a pas été formé après 72 heures à température ambiante. Cette approche de couplage a donc été écartée.

IV- CONCLUSION

Deux photosensibilisateurs hybrides dits de troisième génération ont été conçus et synthétisés. Ils sont constitués de *méso*-tritolyloporphyrines monosubstituées par une chaîne tétraéthylène glycol fixant un vecteur d'adressage, le *cyclo*VEGI. Notre approche, réalisée selon deux méthodologies différentes, a fait respectivement appel à une construction moléculaire basée sur la création de liaison amide ou de triazole en utilisant le concept de « *Click-Chemistry* ».

Les réactions de couplages peptidiques réalisées au moyen du système EDC/NHS donnent de bons résultats, en conditions douces. La cycloaddition d'un azide sur un alcyne terminal, lorsqu'elle est catalysée par le cuivre (I) et assistée par micro-ondes, est une réaction de couplage remarquablement efficace et du plus grand intérêt. Cependant, cette réaction de « *Click-Chemistry* » n'a pas permis de coupler le peptide azidé à l'alcyne terminal d'une *méso*-tritolyloporphyrine. Cet échec peut s'expliquer par la forme déprotégée du peptide que nous avons engagé (nature des réactifs) et par l'absence d'activation micro-ondes (conditions de couplage).

Nos produits ont été obtenus avec des rendements de 23 et 26%. Bien que modestes, ces résultats sont satisfaisants au regard de la nature hybride des produits finaux. En effet, ces rendements sont limités par la construction d'une séquence cyclique de 17 acides aminés, qui reste difficile malgré les progrès de la synthèse peptidique en phase solide.

Les deux molécules cibles sont hydrosolubles et présentent toutes les caractéristiques faisant d'elles de bonnes candidates pour le photo-diagnostic ou la photothérapie dynamique des cancers.

- CHAPITRE III -

*Synthèses d'acides aminés
photosensibilisateurs originaux par
désymétrisation en phase solide
de la Protoporphyrine IX*

I- Les enjeux

Rappelons que le *cyclo*VEGI est un peptide dont la séquence cyclique mime la boucle A située à l'extrémité d'un feuillet β du VEGF naturel. Par modélisation moléculaire (figure III-1), nous constatons que la structure de la protoporphyrine IX (PpIX) est analogue à celle de molécules remarquables¹⁵²⁻¹⁵³, connues sous le nom de « β sheet nucleator ». Il s'agit de composés qui induisent la formation d'une structure secondaire en feuillet β lorsqu'ils sont incorporés dans la synthèse d'une séquence peptidique.

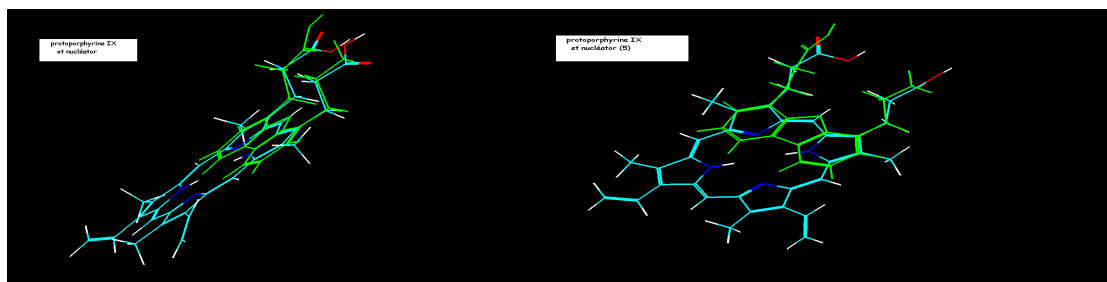


Figure III-1 : Modélisation moléculaire réalisée avec le logiciel HyperChem7.

Vues sous différents angles des structures superposées de la protoporphyrine IX et du β sheet nucleator.

La protoporphyrine IX est un photosensibilisateur naturel d'origine animale. Cette porphyrine (figure III-2) se compose d'un macrocycle substitué sur les positions β -pyrroliques par des groupements méthyles, vinyles et carboxyéthyles.

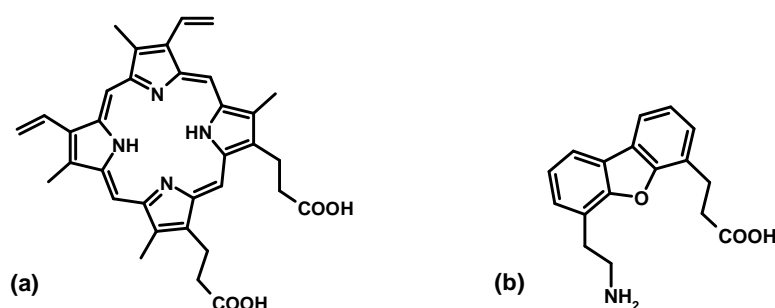


Figure III-2 : Protoporphyrine IX (a) et β sheet nucléator (b)

En raison de l'intérêt de la PpIX¹⁵⁴ pour la photothérapie dynamique et de son potentiel effet inducteur de structures peptidiques en feuillet β , structure observée dans le VEGF naturel, nous avons souhaité obtenir un composé original à ce jour¹⁵⁵ : la *nor*-protoporphyrinamine **22**, dont la fonction amine est protégée par le groupement Fmoc (figure III-3).

¹⁵² K. McWilliams, J. W. Kelly, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7408-7414

¹⁵³ J. S. Nowick, M. Pairish, I. Q. Lee, D. L. Holmes, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5413-5424.

¹⁵⁴ K. Kadish, K. M. Smith and R. Guilard, *The porphyrin Handbook*, Boston: Academic, **2000**, vol.6

¹⁵⁵ V.Yu. Pavlov, *Russian Journal of Organic Chemistry*, **2007**, Vol.43, No.1, p1-34

La préparation de cet acide aminé implique la désymétrisation des fonctions carboxyliques de la PpIX, c'est pourquoi il nous est apparu judicieux de développer une méthodologie de synthèse sur support.

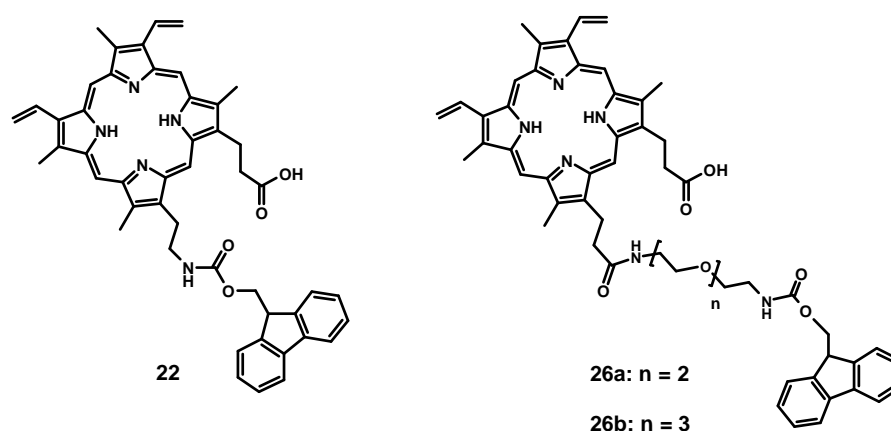


Figure III-3 : Acides aminés porphyriniques **22**, **26a** et **26b** synthétisés.

Enfin, il nous est apparu intéressant de fixer une chaîne carbonée hydrophile au sein de la structure *nor*-protoporphyrinamine **22**. Une chaîne de type tri- ou tétraéthylène glycol permettrait d'augmenter le caractère amphiphile et la biodisponibilité de telles structures. Nous avons donc développé la synthèse des homologues **26a** et **26b** dont la fonction NHFmoc est espacée du chromophore par un bras de type éthylène glycol.

II- Stratégies de synthèse des composés **22**, **26a** et **26b**.

1) Généralités

Dans le but de réaliser la désymétrisation de la PpIX, étape de synthèse commune à **22** et ses dérivés **26a** et **26b**, nous avons développé une stratégie de synthèse sur support, présentée figure III-4. La première étape consiste à greffer une des fonctions carboxyliques de la PpIX sur un support de synthèse. Le but de cette approche est double car la PpIX est simultanément désymétrisée et fixée sur un support solide, ce qui facilite les étapes suivantes qui visent à modifier la fonction carboxylique libre. En effet, la chimie supportée permet d'obtenir les molécules cibles plus facilement, plus rapidement avec de meilleurs rendements puisqu'il est possible de conduire les réactions avec de larges excès de réactifs, et de simples lavages remplacent les purifications par chromatographies.

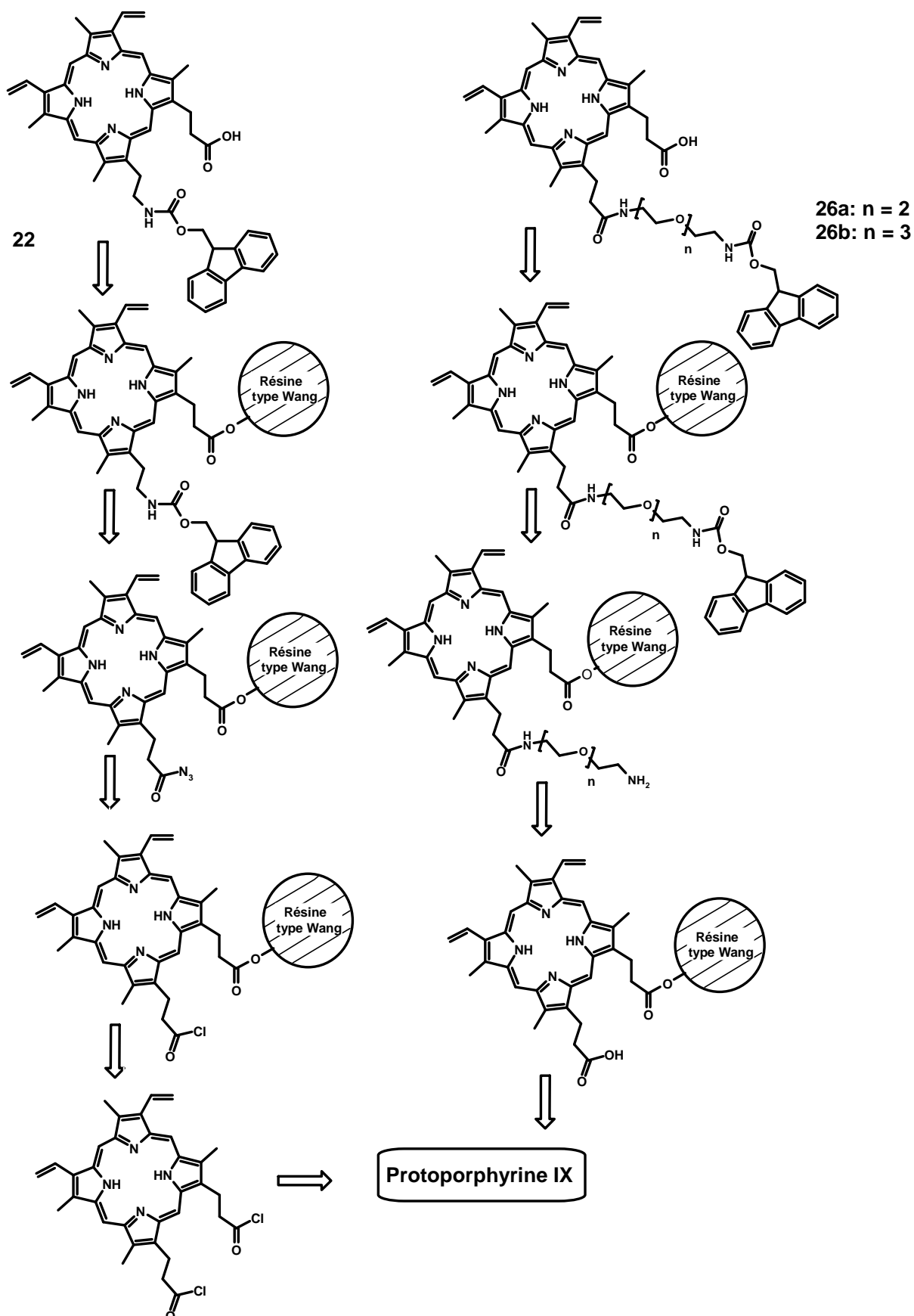


Figure III-4 : Schéma rétrosynthétique pour les composés 22, 26a et 26b.

2) Synthèse de la Fmoc-*nor*-protoporphyrinamine IX

22

La conversion la fonction carboxylique en azoture d'acyle permet ensuite de préparer, en une seule étape, la fonction carbamate attendue. En présence d'alcool 9-fluorène méthylique, l'azoture d'acyle donne, par réarrangement de Curtius, le *nor*-dérivé aminé protégé par le groupement Fmoc. Le composé **22** est finalement obtenu par clivage de son support de synthèse.

3) Synthèse des homologues 26a et 26b

La fonction carboxylique libre est engagée dans la formation d'une liaison amide avec un espaceur tri- ou tétraéthylène glycol diaminé. Les homologues aminés obtenus sont ensuite protégés : les fonctions amines sont converties en carbamates (NHFmoc) par le réactif adéquate (FmocOSu). Par clivages des supports de synthèses, les composés attendus **26a** et **26b** sont finalement libérés.

Choix du support de synthèse

Comme nous l'avons décrit au chapitre II (page 78), la méthode de synthèse en phase solide selon la « Chimie Boc » nécessite l'emploi d'acide fluorhydrique pour le décrochage du support. La « Chimie Fmoc » est la méthode la plus largement utilisée car elle évite la manipulation de cet acide dangereux. Ainsi, nous avons choisi de protéger les amines des produits finaux par le groupement Fmoc qui est enlevé en milieu basique mais qui est insensible aux conditions acides. A cet effet, un support acido-labile susceptible de former un lien covalent avec une fonction carboxylique a été utilisé. Les résines fonctionnalisées par le groupement *p*-hydroxy-méthylphénoxy-, appelées « résines de type Wang » (figure III-5) ou « résines HMP » constituent les supports standard pour l'immobilisation en phase solide des acides carboxyliques.¹⁵⁶⁻¹⁵⁷ Ce type de résine est beaucoup plus répandu que la résine de type 2-chloro-chlorotriyle (extrêmement acido-labile) utilisée lors des synthèses peptidiques du chapitre précédent. Ainsi, dans le cas d'une résine Wang, le greffage est réalisé par création d'une fonction ester, et la libération de la fonction carboxylique peut être effectuée par

¹⁵⁶ Shu. S. Wang *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 1328- 1333, **1973**.

¹⁵⁷ G. Lu, S. Molsov, *J. Org. Chem.*, 46, 3433, **1981**.

traitement avec une solution de 15 à 95% de TFA.¹⁵⁸⁻¹⁵⁹ Cette moindre susceptibilité aux acides permet d'éviter un décrochage précoce de la porphyrine du support de Wang.

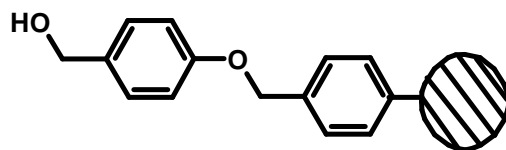


Figure III-5 : Résine de type Wang utilisée comme support de synthèse.

Ce support est utilisé sous forme de billes de dimension moyenne (100-200 mesh), constituées de polystyrène faiblement réticulé (avec 1% de divinylbenzène) ce qui nous assure leur gonflement satisfaisant dans les solvants organiques. La résine employée est fonctionnalisée à hauteur de 1,1 mmoles d'alcool 4-hydroxy-benzylique par gramme de résine. Pour ce taux de fonctionnalisation, plutôt élevé, l'introduction d'un excès de réactifs porphyriniques permet d'éviter la fixation de leurs deux extrémités.

III- Synthèse de la Fmoc-nor-protoporphyrinamine IX 22

Le composé **22** a été élaboré selon une voie de synthèse linéaire en cinq étapes, les deux premières étant réalisées au cours d'une réaction « one pot » (figure III-6).

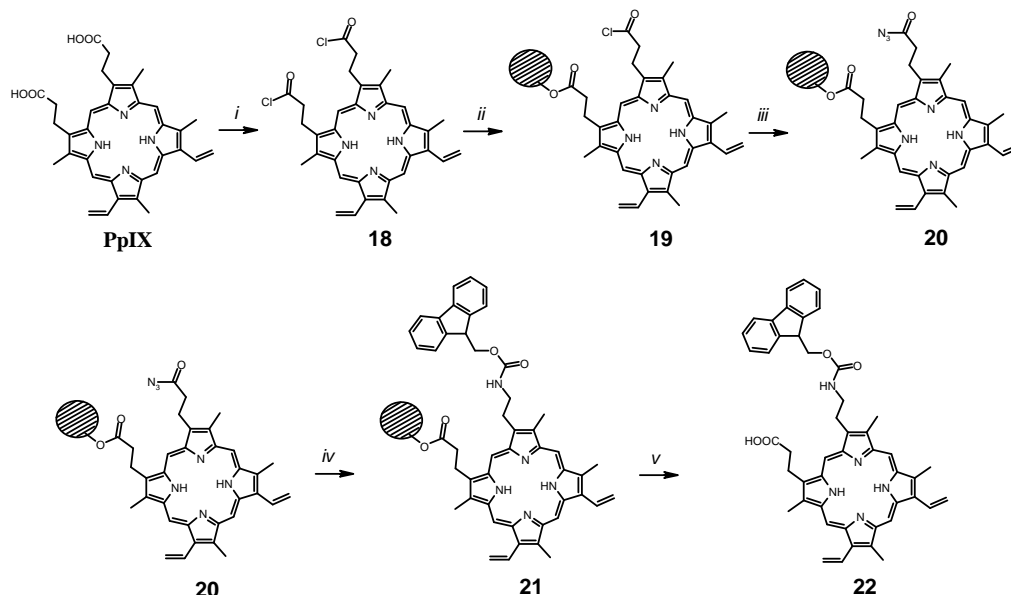


Figure III-6 : Synthèse du composé **22**.

i: SOCl₂ ; *ii*: Résine de Wang, pyridine ; *iii*: NaN₃ ; *iv*: alcool 9-fluorène méthylique ; *v*: TFA/TIS/eau.

¹⁵⁸ Y. Wang, S. R. Wilson *Tetrahedron Lett.*, 38, 4021, **1997**

¹⁵⁹ A.S. Kiselyov, R. W. Armstrong *Tetrahedron Lett.*, 38, 6163, **1997**

Les fonctions carboxyliques de la PpIX commerciale sont d'abord converties en chlorures d'acyles (i, composé **18**). L'addition de pyridine et l'introduction de la résine de type Wang (ii) permettent de former le dérivé protoporphyrinique supporté **19**. Traité ensuite par l'azoture de sodium (iii), le chlorure d'acyle libre forme l'azoture d'acyle **20**. Son chauffage au reflux dans du toluène provoque un réarrangement de Curtius : l'isocyanate que l'on forme *in situ* réagit en présence de 9-fluorène méthanol (iv) pour donner le composé **21**. Ce précurseur est finalement traité en milieu acide (v) pour libérer du support solide le produit attendu.

1) Synthèse du bis-chlorure de protoporphyrinoyle **18**

Nous avons réalisé la chloration de la PpIX avec le chlorure de thionyle, par solvolysé à température ambiante (figure III-7). Ce liquide volatil réagit en présence d'acide carboxylique pour fournir le composé attendu en 6 heures avec un rendement quantitatif. Les deux co-produits générés par la réaction sont le chlorure d'hydrogène et le dioxyde de soufre.

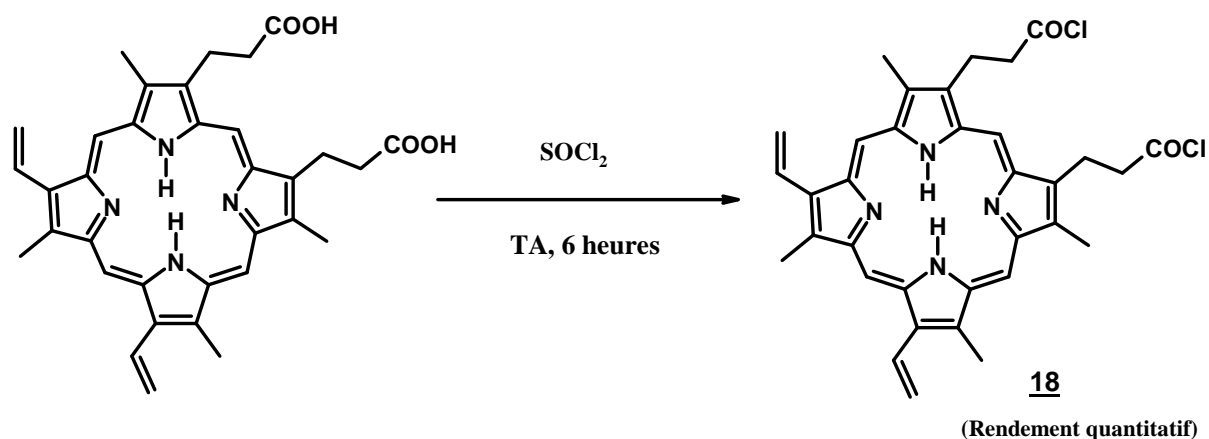


Figure III-7: Chloration de la protoporphyrine IX avec le chlorure de thionyle.

Par évaporation sous pression réduite, ce réactif et les sous-produits sont éliminés, ce qui simplifie la purification et permet d'engager l'agent chlorant en large excès en vue d'assurer un rendement quantitatif. Fortement sensible à la lumière et à l'humidité, cet intermédiaire est utilisé tel quel dans l'étape suivante.

2) Immobilisation du dérivé **18** sur résine de Wang

Le composé **18** est immobilisé par estérification des alcools benzyliques présents sur la résine de type Wang (figure III-8). Dans le but de favoriser statistiquement l'estérification d'une seule fonction chlorure d'acyle par molécule porphyrinique, la résine a été introduite en

défaut (0,25 équivalent) dans le but de former une seule liaison ester entre la porphyrine et le support.

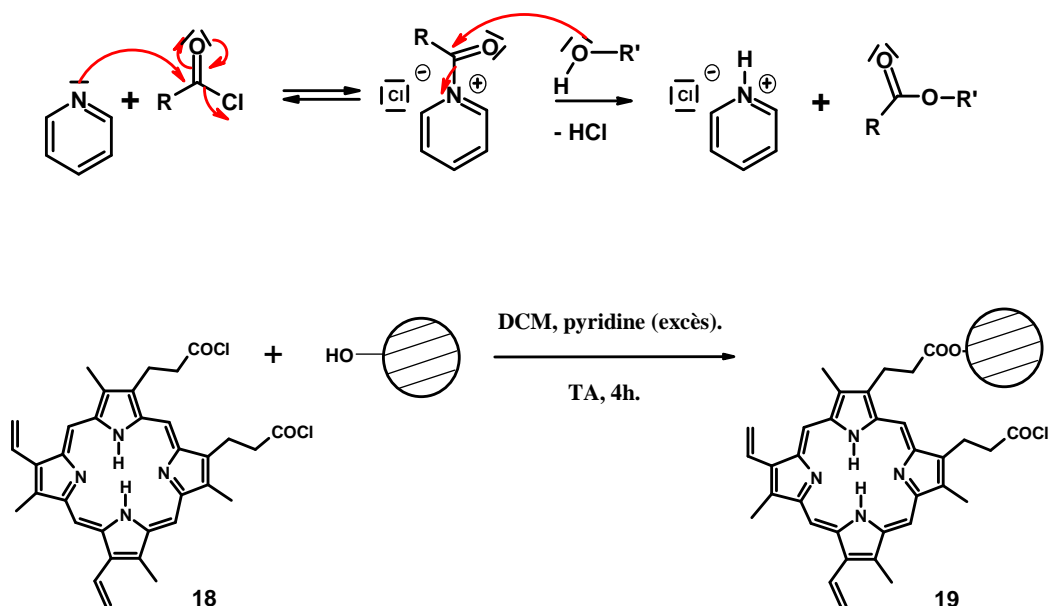


Figure III-8 : Greffage sur support de synthèse par estérification.

L'estérification d'un alcool par un chlorure d'acyle est réalisée en conditions anhydre, dans le DCM, en présence de pyridine en excès, qui piège le chlorure d'hydrogène formé et catalyse la réaction en exacerbant l'électrophilie des carbonyles par formation du chlorure d'acylpyridinium. Ainsi obtenu, le composé **19** est utilisé tel quel pour l'étape suivante.

3) Préparation d'un azoture d'acyle sur support de synthèse

Les azotures d'acyles, intermédiaires relativement stables, sont d'une grande utilité.¹⁶⁰ Ils forment, par décomposition thermique, des isocyanates à partir desquels il est possible de préparer, notamment, des amines, carbamates, urées et carbodiimides. Il existe de nombreuses méthodes de préparation, et la plupart d'entre elles consistent à faire réagir un chlorure d'acyle sur l'azoture de sodium, selon une addition-élimination.¹⁶¹⁻¹⁶²

Ainsi nous avons chauffé le chlorure d'acyle **19** avec un excès d'azoture de sodium dans le DMF, à 85°C durant 7 heures (figure III-9).

¹⁶⁰ S. Patai, , *Chem.Halides Pseudo-halides and Azides*, Z. Rappoport Eds., Wiley, Chichester, UK, **1983**, Vol. 1, p. 321.

¹⁶¹ G. K. Surya Prakash, M. Arvanaghi, G.A. Olah, *J.Org. Chem.* **1983**, 48, 3358.

¹⁶² P. Laszlo, E. Polla, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3701.

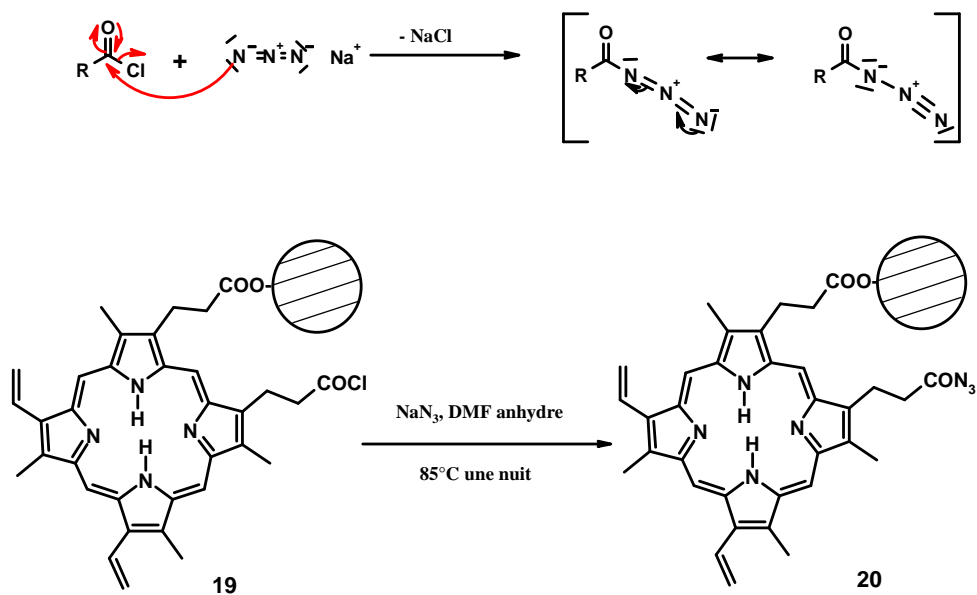


Figure III-9 : Synthèse de l'azoture d'acyle 20.

Le composé **20** est ensuite purifié par une simple filtration suivie de plusieurs lavages avec du DMF, du DCM et du méthanol.

4) Conversion d'un azoture d'acyle en carbamate par réarrangement de Curtius

Le réarrangement de Curtius est la dégradation thermique des azotures d'acyles en isocyanates. Le mécanisme de cette réaction est présenté (figure III-10).

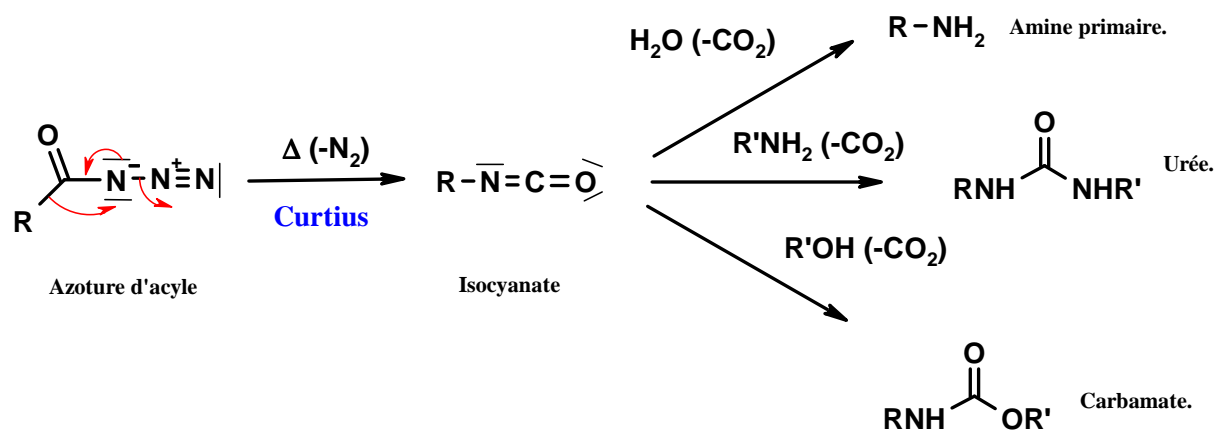


Figure III-10 : Réactivité des isocyanates générés par le réarrangement de Curtius.

Hautement électrophiles, les isocyanates ainsi générés peuvent réagir sur l'eau, pour former l'acide carbamique qui se décarboxyle spontanément, conduisant à la formation de l'amine primaire. En présence d'amines, les isocyanates forment des urées et, en présence d'alcools,

ils forment des carbamates. Ces derniers sont souvent utilisés en tant que groupements protecteurs (ex : *Boc*, *Cbz* et *Fmoc*) car ils réduisent très fortement la nucléophilie des amines. Le réarrangement de Curtius représente donc une alternative pour la synthèse des carbamates, classiquement préparés en traitant l'amine avec le chloroformiate souhaité. Ainsi nous avons préparé le carbamate du 9-méthylène-fluorényle **21** (noté NHFmoc) en traitant l'azoture d'acyle **20** par une solution d'alcool 9-fluorène méthanolique dans le toluène rigoureusement anhydre, portée au reflux pendant 10 heures (figure III-11).

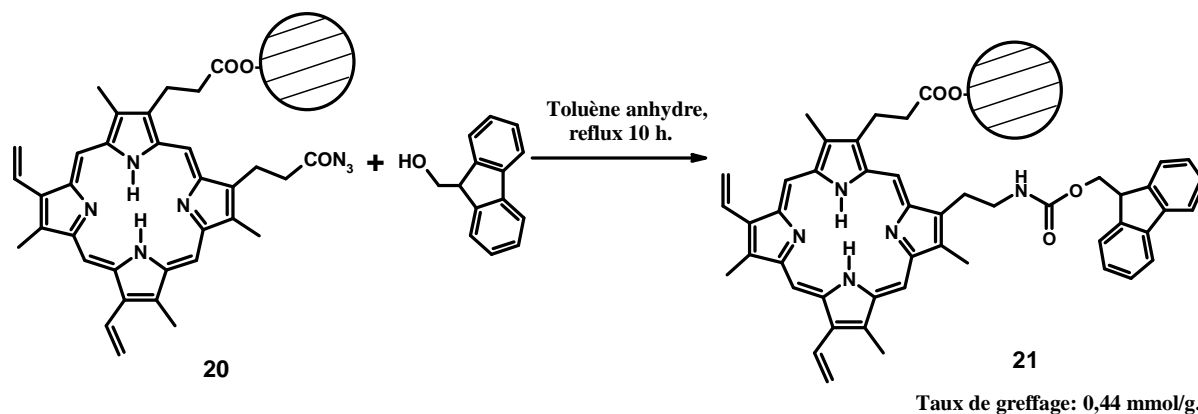


Figure III-11 : Préparation du carbamate **21** par réarrangement de Curtius.

Après lavages au toluène et séchage sous vide, un échantillon de résine est prélevé afin de déterminer le taux de greffage de la résine **21**. La méthode de dosage spectro-photométrique précédemment détaillée (pages 80-81) a ainsi permis d'établir la présence de groupements Fmoc à hauteur de 0,44 millimole par gramme de résine, ce qui correspond à un rendement global de 40% sur quatre étapes. Remarquons qu'avec un tel taux de greffage, la résine **21** est directement utilisable comme support de synthèse peptidique.

5) Libération du support

Le produit final **22** est obtenu après décrochage de la résine par traitement en milieu acide (figure III-12) avec un rendement de 27% pour cette dernière étape. A cet effet, le composé **21** est agité 3 heures à température ambiante dans de l'acide trifluoroacétique additionné de scavengers tels que l'eau et le TIS.¹⁶³

La synthèse du composé **22** est réalisée en cinq étapes à partir de la PpIX, avec un rendement global de 11%.

¹⁶³ E. Biron, N. Voyer, *Chem. Commun.*, **2005**, 4652-4654.

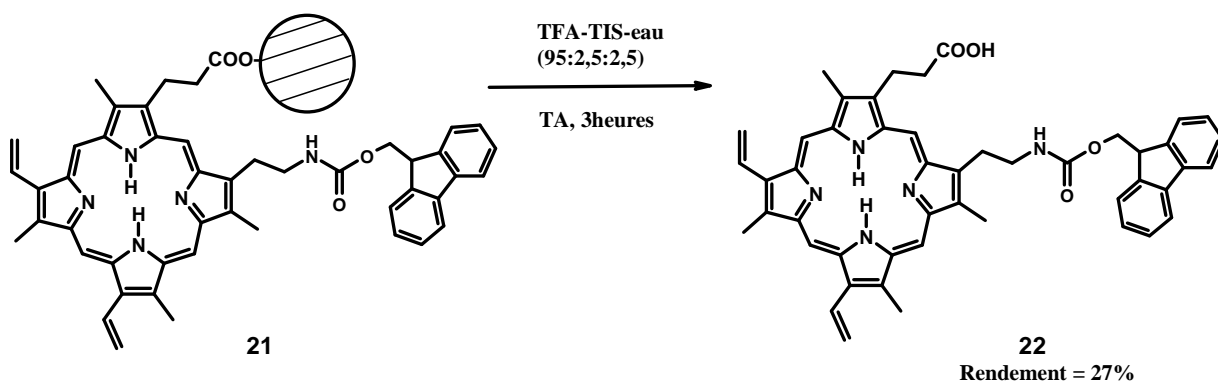


Figure III-12 : Clivage du support solide pour l'obtention de la molécule cible **22**.

Le spectre UV-visible du composé **22** est de type *étio*, il est conforme aux spectres généralement attendus pour les dérivés de la PpIX. Le spectre MALDI met en évidence la présence de l'ion quasi-moléculaire à 756,81 [M+H]⁺.

Les attributions détaillées du spectre RMN ¹H de ce composé mettent en évidence les principaux signaux attendus. Une des caractéristiques principales du chromophore **22** est qu'il existe sous forme de deux isomères (figure III-13) ce qui rend l'attribution des protons difficile.

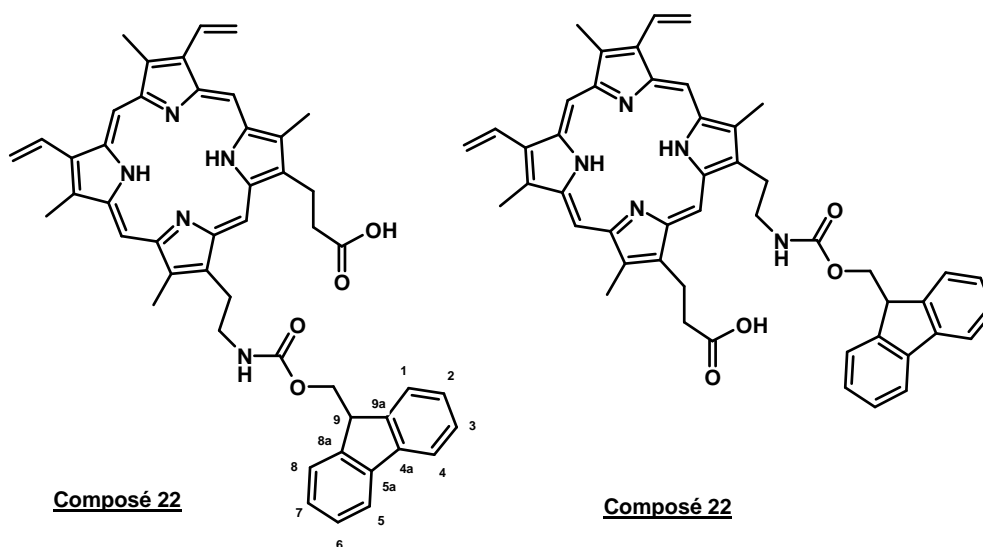


Figure III-13 : Isomères du composé **22**.

D'une manière générale, la RMN du proton de ces acides aminés comprend les familles de signaux suivants :

- les protons *méso* vers 10 ppm,
- les protons alkyle du bras portant les fonctions carbonylées, entre 3 et 4 ppm,
- les protons des méthyles β pyrroliques vers 3,6 ppm,
- et les protons NH pyrroliques à -3,8 ppm.

On observe un singulet élargi à -3,8ppm, correspondant au signal des protons NH pyrroliques. Les signaux des protons *méso*, des protons β -pyrroliques et des protons CH_2 vinyliques sont dédoublés. Pour chaque isomère, les protons *méso* résonnent sous la forme de quatre singulets vers 10 ppm. Les protons CH vinyliques résonnent à 8,05ppm sous la forme d'un double doublet ($J=11,5$ et $17,8$ Hz). Les protons CH_2 vinyliques se présentent sous la forme de doubles doublets à 6,19ppm ($J=11,5-1,5$ Hz) et 6,37ppm ($J=17,8-1,5$ Hz) pour l'un des isomères ; à 6,17ppm ($J=11,5-1,5$ Hz) et 6,36ppm ($J=17,8-1,5$ Hz) pour l'autre. Les protons des chaînes alkyles résonnent sous la forme de multiplets compris entre 4,3 et 3,5ppm. Les protons aryliques 1,8 ; 2,7 et 3,6 résonnent à 7,66ppm sous forme de doublets ($J=7,5$ Hz), tandis que les protons aryliques 4 et 5 résonnent sous la forme d'un doublet (même constante de couplage) à 7,86ppm. Enfin, nous observons les protons méthyliques qui résonnent sous forme singulet vers 3,6ppm.

En ce qui concerne le spectre du carbone 13, le spectre J-MOD du composé **22** permet d'observer les signaux attendus. *Pour le cycle porphyrinique*, les carbones quaternaires α et β pyrroliques résonnent dans une zone élargie vers 140ppm (136-148ppm) du fait de la tautomérie des protons NH. Les carbones secondaires des bras alkyles (porteurs des fonctions carboxylique et uréthane) résonnent à 21,8 et 36,9ppm. Les carbones tertiaires *méso* résonnent vers 97ppm sous la forme de quatre signaux, et sont nettement moins déblindés que ceux des *méso*-porphyrines analysées dans le précédent chapitre. Enfin, nous trouvons à 11,5ppm les quatre signaux des carbones primaires correspondant aux méthyles β -pyrroliques. *Pour le groupement Fmoc*, le carbone quaternaire du carbamate résonne à 157,2ppm. Les autres carbones quaternaires du groupement Fmoc résonnent à 144,1ppm pour C 8a, 9a, et à 140,8ppm pour les C 4a, 5a. L'unique carbone secondaire du groupement Fmoc résonne à 65,6ppm. Les carbones tertiaires aryliques du groupement Fmoc résonnent à 127,7ppm pour C 3 et 6 ; à 127,0ppm pour C 2 et 7 ; à 125,4ppm pour C 4 et 5 et à 120,4ppm pour C 1 et 8. Le carbone tertiaire C9 résonnant, quant à lui, à 46,6ppm.

Cette méthode d'hétéro-bi-fonctionnalisation en phase solide a permis d'élaborer de manière simple la *nor*-protoporphyrinamine IX **22** à partir de la PpIX Ce composé original est obtenu en cinq étapes de synthèse, avec un rendement global de 11%. La formation d'une liaison amide entre l'acide libre et un espaceur diaminé est une autre approche que nous avons envisagé pour la préparation des homologues aminés **26a** et **26b**, davantage amphiphiles et biodisponibles.

IV- Synthèse des acides aminés homologues 26a et 26b par activation micro-ondes

1) Stratégie de synthèse

Ces synthèses sont menées en phase solide, et consistent à établir une liaison amide à partir de la porphyrine fixée. En opposition avec la préparation du composé **22** (figure III-5), les synthèses de **26a** et **26b** n'impliquent pas la formation d'un azoture d'acyle et donc la chloration préalable par le chlorure de thionyle. Le bis- chlorure de protoporphyrinoyl IX étant un intermédiaire relativement instable, nous avons retenu un autre mode d'activation des fonctions carboxyliques de la protoporphyrine IX.

Comme précédemment, la première étape consiste à greffer la protoporphyrine IX sur support et nous avons poursuivi nos synthèses avec la même résine de Wang (billes de 100-200mesh) qui est faiblement réticulée (par 1% de DVB) et modérément fonctionnalisée (1,1 mmoles par gramme).

La littérature détaille des méthodes d'estérifications caractérisées par de bons rendements à partir de l'acide carboxylique activé dans divers solvants anhydres (DCM, DMF ou NMP), en présence de DIEA, par le PyBrOP¹⁶⁴, ou bien par le système PyBrOP/ DMAP.¹⁶⁵ Par ailleurs, les supports de synthèse tels que la résine de Wang sont résistants à des chauffages (150-180°C) réalisés par micro-ondes.¹⁶⁶

La figure III-14 présente le schéma de synthèse adopté. Les deux premières étapes sont réalisées *one pot*. Le greffage de la PpIX sur résine est suivi du couplage avec un bras espaceur diaminé. Nous avons réalisé ces étapes avec l'agent de couplage PyBrOP et la DMAP utilisée comme catalyseur. Sous activation micro-ondes, les couplages sont réalisés en quelques minutes. La fonction amine libre de l'espaceur est ensuite convertie en carbamate, par traitement, dans le chloroforme, à température ambiante, avec l'ester activé FmocOSu. Les molécules cibles sont finalement récupérées par décrochage du support de synthèse.

¹⁶⁴ V. Stratos, G. Ioannis, K. Voyagi, P. Mamosb, D. Papaioannou *Tetrahedron Letters* 43 (2002) 2597-2600.

¹⁶⁵ a) J. S. Davies, J. Howe, J. Jayatilake, T. Riley, *Letters in Peptide Science*, 4 (1997), 441-445.

b) R. T. Pon, S. Yu, *Bioconjugate Chemistry*, 10, 6, 1051-1057 (1999).

¹⁶⁶ a) H. Yang, Y. Peng, G. Song, X. Qian, *Tetrahedron Letters* 42 (2001) 9043-9046.

b) A. Stalder, C.O. Kappe, *Tetrahedron* 57 (2001) 3915-3920.

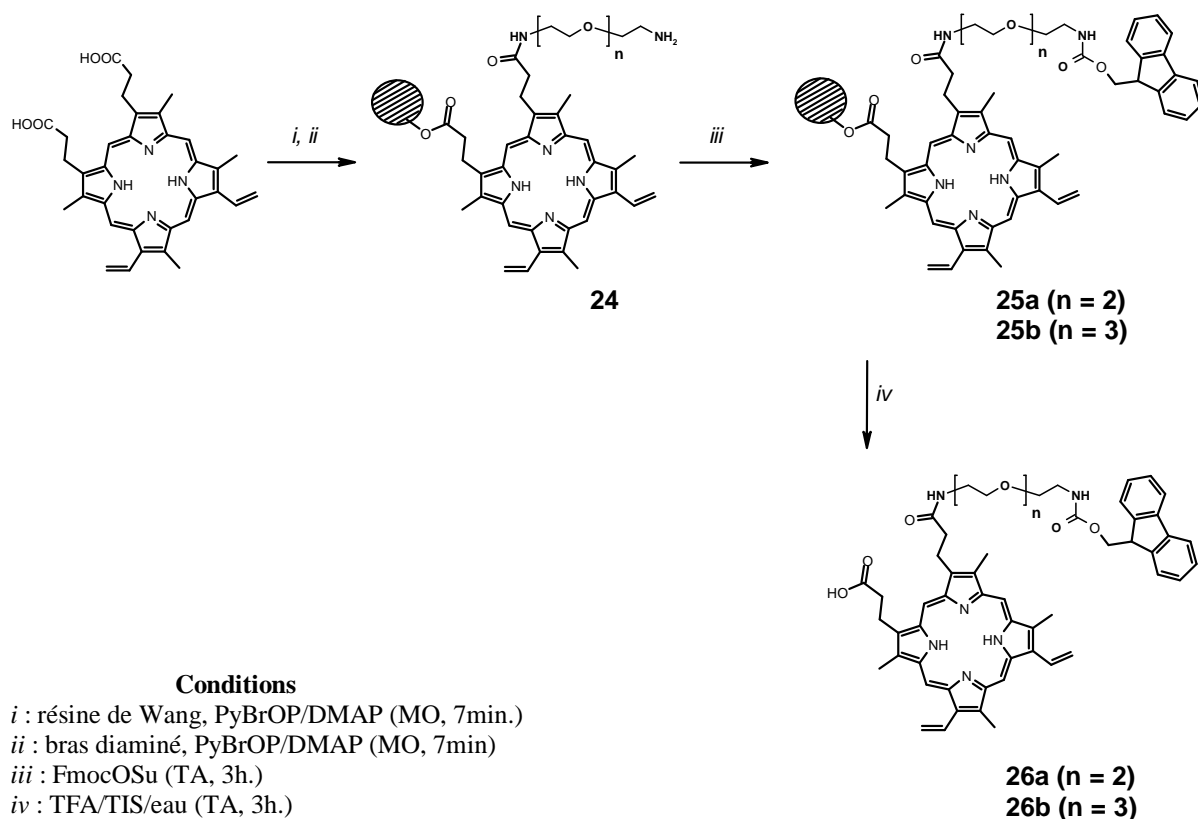


Figure III-14 : Synthèses « one pot » des composés **26a** et **26b**.

2) Immobilisation de la protoporphyrine IX sur résine de Wang.

Comme pour la synthèse de **22**, nous avons introduit les alcools benzyliques en minorité (0,25 équivalent molaire d'alcool par fonction COOH) afin de favoriser le greffage sur la résine d'une seule fonction acide par molécule de dérivé porphyrinique. Sous irradiation par micro-ondes nous utilisons le système activant PyBrOP /DMAP en présence de DIEA afin de remplacer la chloration par SOCl₂. qui conduit à un intermédiaire beaucoup moins stable.

A- Les agents de couplages constituant le système le plus efficace

Le PyBrOP est un puissant agent d'activation des acides carboxyliques, indifféremment utilisé pour les couplages peptidiques difficiles et les estérifications. Ce composé est un phosphonium qui forme un intermédiaire activé en présence de carboxylates (figure III-15).

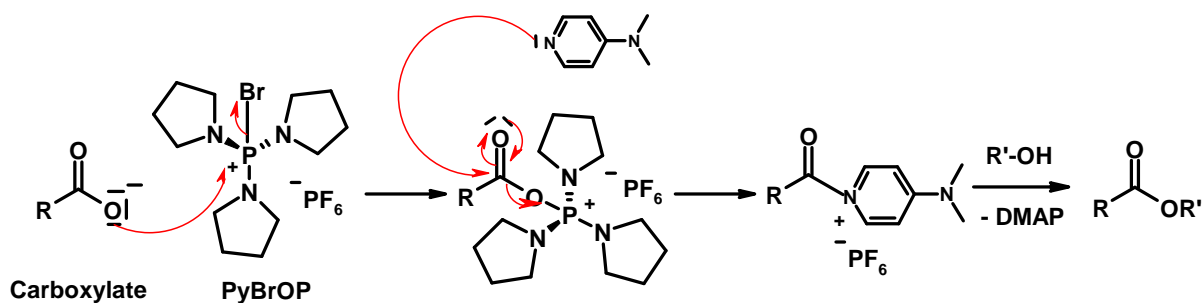


Figure III-15 : Mécanisme de l'estérification de la PpIX avec le couple PyBrOP/DMAP.

La DMAP, quant à elle, est essentiellement utilisée pour l'estérification des alcools avec des anhydrides. Il s'agit d'un catalyseur d'acylation formant un cation de type acylpyridinium.

B- L'estérification assistée par irradiation micro-ondes

En solution dans le DMF anhydre, la protoporphyrine IX est immobilisée sur support avec les réactifs de couplage PyBrOP/DMAP sous activation micro-ondes (figure III-16).

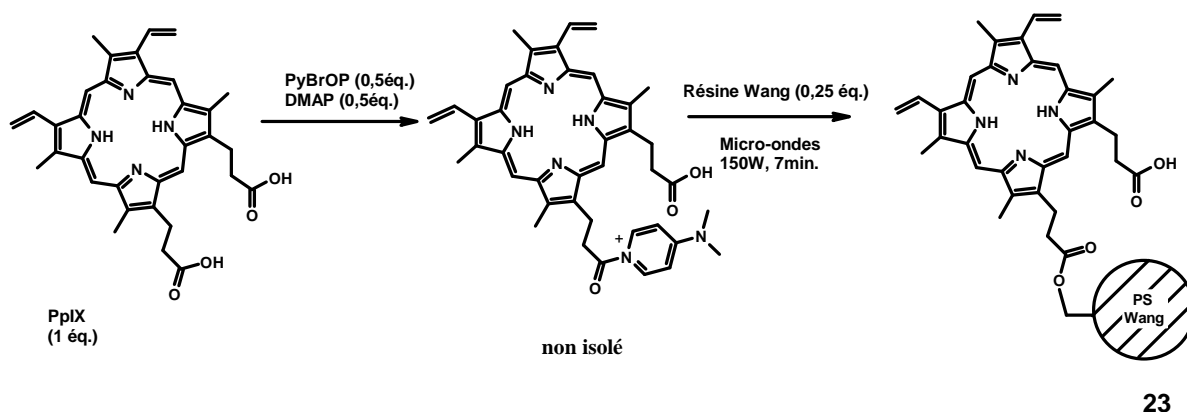


Figure III-16 : Greffage de la PpIX sur résine de type Wang.

Nous avons fixé les conditions d'activation par micro-ondes (7 minutes à 150W) en nous appuyant sur celles décrites pour l'estérification d'acides sur résine de type Wang.¹⁶⁷ L'assistance par micro-ondes a permis le greffage sur résine de type Wang et la désymétrisation rapide des fonctions carboxyliques de la protoporphyrine IX.

¹⁶⁷ A. Stadler, C. O. Kappe, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 919-925

3) Couplage de bras espaceurs diaminés

Ce couplage peptidique est assuré par le système PyBrOP/DMAP utilisé en excès (2 équivalents de chaque réactif par fonction carboxylique) dans du DMF anhydre, avec les mêmes conditions opératoires que celles décrites dans l'étape précédente. Pour la synthèse du chromophore **24a**, l'introduction du 1,8-diamino-3,6-dioxaoctane précède le chauffage par micro-ondes à 150W, pendant 7 minutes (figure III-17).

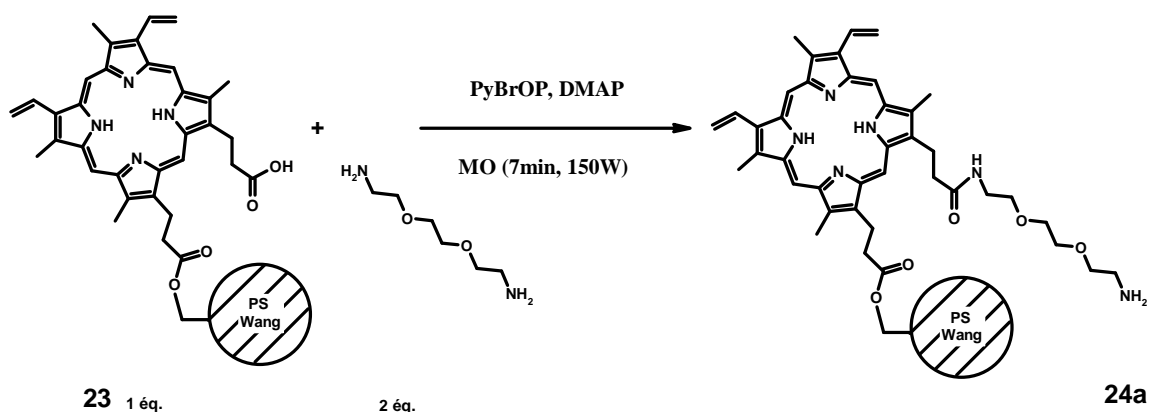


Figure III-17 : Couplage peptidique avec le système PyBrOP/DMAP, assisté par micro-ondes.

Par la même méthode, l'utilisation du 1,11-diamino-3,6,9-trioxaundécane a permis d'obtenir le composé **24b**.

4) Protection des dérivés aminés

Les amines **24a** et **24b** sont ensuite protégées sous forme de carbamates NHFmoc, par traitement avec l'agent FmocOSu (figure III-18).

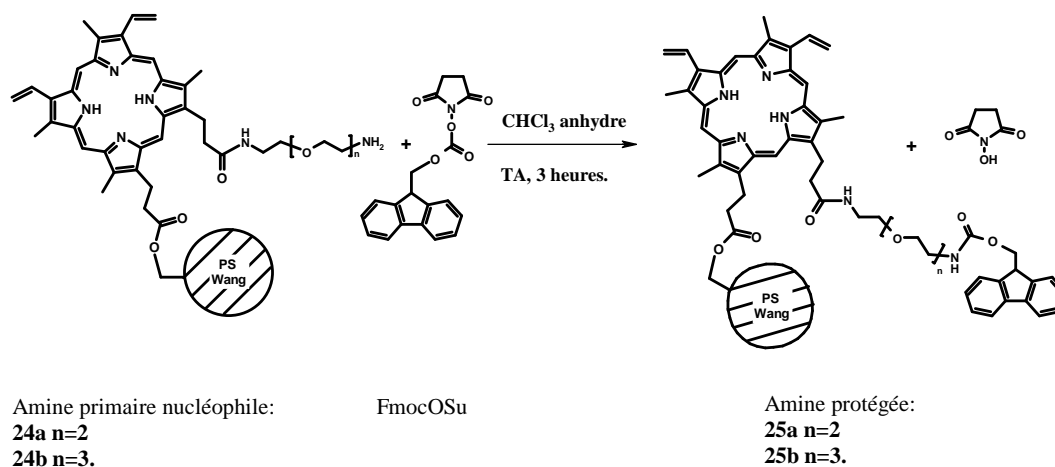


Figure III-18 : Protection d'une amine primaire par le groupement Fmoc.

Cette substitution nucléophile de type 2 a lieu dans le chloroforme, et le seul produit secondaire est le NHS, hydrosoluble. La méthode de dosage spectro-photométrique (détaillée

pages 80-81) a permis d'établir la présence de groupements Fmoc à hauteur de 0,71 millimole par gramme de résine pour le composé **25a** et 0,76mmol./g. pour **25b**, ce qui correspond à des rendements globaux respectifs de 65% et 69% sur trois étapes. Avec de tels taux de greffages, ces résines sont utilisables comme support de synthèse peptidique.

5) Libération des molécules cibles des supports de synthèse

Finalement, les molécules cibles sont obtenues après décrochage des supports solides : traités en milieu acide (TFA) en présence de scavengers (eau et TIS) les résines **25a** et **25b** donnent respectivement les composés **26a** et **26b** (figure III-19) avec des rendements globaux de 6,4% et 8,1%.

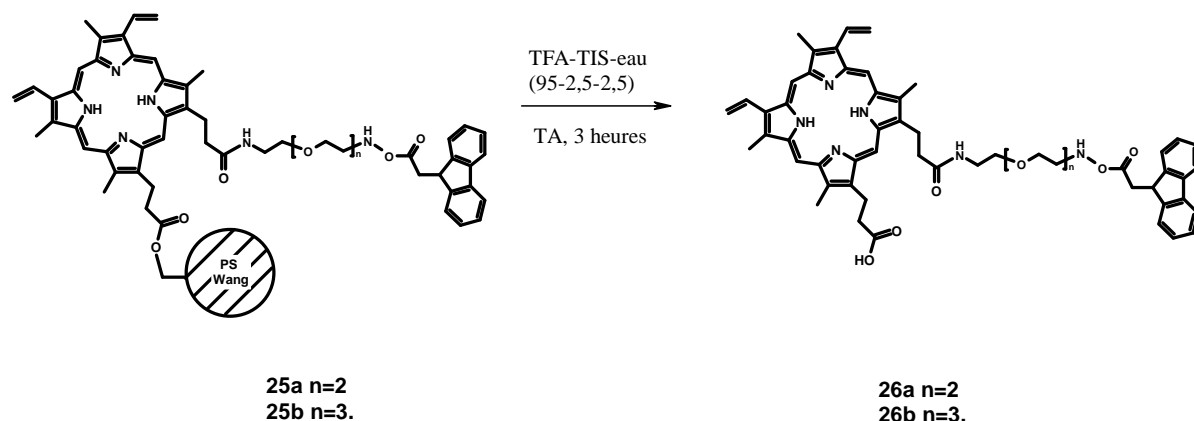


Figure III-19 : Obtention des produits finaux **26a** et **26b** par décrochage de leur support de synthèse.

Réalisés dans le DMF, les spectres UV-visible des composés **26a** et **26b** (tableau III-1) sont de type *étio*. La bande de Soret présente un déplacement vers le bleu (390nm), traduisant des phénomènes d'agrégation de type « *face to face* » qui sont à l'origine de l'insolubilité de ces composés dans l'eau.

Tableau III-1 : Spectres UV-Visible, réalisés le DMF, à 20°C, pour les composés **26a** et **26b**.

λ_{\max} est donnée en nanomètres, (ϵ est le coefficient d'absorption, à 20°C, en L.mol⁻¹.cm⁻¹).

Composés	Soret	IV	III	II	I
26a	390,5 (111,8)	490,9 (5,5)	523,3 (4,9)	569,8 (4,3)	621,0 (2,0)
26b	390,5 (109,7)	490,9 (5,2)	523,3 (4,8)	569,8 (4,8)	621,0 (2,6)

La masse molaire de nos produits a été confirmée par spectrométrie MALDI, dont les résultats sont résumés dans le tableau III-2.

Tableau III-2 : Spectrométrie de masse par la méthode MALDI

Composés	Masse molaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire observé (uma)
26a	915,11	916,09
26b	959,17	960,10

Les spectres RMN ^1H des composés **26a** et **26b** comportent les signaux attendus pour ces structures. En particulier, aux signaux précédemment décrits pour **22** s'ajoutent le proton de la liaison amide, résonnant sous la forme d'un singulet à 4,1ppm, ainsi que les signaux des protons des bras éthylène glycol, qui résonnent sous la forme de multiplets, à 3,39ppm pour *Ha* ; 3,48ppm pour *Hf* (composé **26a**) ou 3,49ppm pour *Hh* (composé **26b**). Les protons *Hb*, *c*, *d*, *e* du composé **26a** résonnant, quant à eux, entre 3,68 et 3,85ppm. Ces signaux se retrouvent sur le spectre du composé **26b**, intégrant pour quatre protons de plus (*Hf* et *Hg*).

Les spectres RMN du ^{13}C (J-MOD) présentent également les signaux attendus pour ces structures. En plus des signaux décrits pour **22**, on observe le signal du carbone quaternaire de la liaison amide qui résonne à 170,3ppm. Les carbones *Ca* et *Cf* (**26a**) (*Ch* pour **26b**) des bras éthylène glycol résonnent respectivement à 40,1 et 41,6ppm ; Les autres carbones secondaires résonnent, quant à eux, à 70,61ppm (*Cb*, *c*, *d* pour **26a** ; *Cb*, *c*, *d*, *e* pour **26b**) et 73,2ppm (*Ce* pour **26a** et *Cg* pour **26b**).

La synthèse des homologues **26a** et **26b** est un développement et une optimisation de la méthode qui nous a permis de préparer le composé **22**. En effet, les étapes de couplages sont réalisées sous micro-ondes, ce qui réduit les temps réactionnels au minimum et permet de disposer d'une approche dont la rapidité d'exécution est remarquable puisque l'ensemble des étapes peut être réalisé en une journée. Bien que les synthèses de **26a** et **26b** comportent une étape de moins que celle de **22**, nous remarquons cependant que les rendements finaux sont comparables.

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons élaboré pour la première fois des photosensibilisateurs hybrides constituées de *méso*-tritolylporphyrines portant le peptide *cyclo*VEGI, véritable vecteur moléculaire assurant une fixation spécifique au niveau des *néo*-vaisseaux, formés par et pour les tumeurs cancéreuses. Nous avons réalisé ces synthèses selon une approche convergente, en couplant des constructions moléculaires par l'établissement de liaisons amide, ou par formation d'un triazole 1,4-disubstitué, grâce à une cycloaddition 2+3 de « *Click-Chemistry* ». Ces molécules hydrosolubles suscitent un grand intérêt en tant qu'agents photosensibilisateurs de troisième génération, pouvant être utilisés pour diagnostiquer ou traiter les tumeurs cancéreuses. Dans le but d'établir la sélectivité et la spécificité de ces composés, des essais *in vivo* sont actuellement en cours de réalisation par le docteur Muriel Barberi-Heyob, du centre anti-cancer Alexis Ventrin, laboratoire CRAN, UMR 7039 du CNRS, à l'université de Nancy.

Dans un second temps, nous avons mis au point une méthode de synthèse originale pour la préparation de dérivés mono-aminés de la protoporphyrine IX naturelle. Pour préparer ces acides aminés porphyriniques, nous avons développé une approche de synthèse multi-étapes sur support solide, qui peut être mise en œuvre de manière simple et rapide. Grâce au chauffage par micro-ondes, il est possible de réaliser l'ensemble du processus en un temps raisonnable. Ces acides aminés porphyriniques ont été obtenus sous formes protégées (NH₂Fmoc), supportées ou non, ce qui en fait des synthons fort utiles car ces composés sont facilement intégrables dans la séquence d'une synthèse peptidique en phase solide. En outre, ces molécules constituent des réactifs de choix pour l'élaboration contrôlée d'oligomères photosensibilisateurs composés de motifs porphyriniques reliés entre eux par des liaisons peptidiques.

Nous envisageons dans la continuité de ce travail, d'utiliser ces nouveaux synthons porphyriniques pour la préparation d'autres photosensibilisateurs hybrides porteurs du peptide *cyclo*VEGI. En effet, il serait intéressant de comparer la spécificité de ces agents en fonction de la longueur du bras espaceur et de la position du chromophore, puisque nos synthons permettent la synthèse de peptides incluant une (ou plusieurs) porphyrine(s) au sein de leur séquence cyclique.

Enfin, l'activité photodynamique de tous ces composés sera à établir et à comparer en fonction de la nature du chromophore. A ce titre, l'élaboration de photosensibilisateurs dérivés des chlorines ou des benzoporphyrines est envisagée car ces chromophores absorbent davantage la lumière dans le domaine du rouge. En effet, avec cette longueur d'onde excitatrice qui pénètre davantage les tissus, une augmentation de l'efficacité anti-cancéreuse pourraient être obtenue.

BIBLIOGRAPHIE

- ¹ Sanders J.K.M., *The Porphyrins Handbook*, vol.III (Inorganic, organometallic and coordination chemistry), Kadish, K.M.,Smith K.M.,Guilard R. (Eds), **1999**.
- ² H. Fischer, H. Orth ; *Die Chemie des Pyrrols*, vol. I-III, **1934-1940**.
- ³ H. B. F. Dixon, A. Cornish-Bowden, C. Liebecq, K. L. Loening, G. P. Moss, J. Reedijk, S. F. Velick, P. Venetianer, J. F. G. Vliegthart ; *Pure Appl. Chem.*, **1987**, 59, 779-832.
- ⁴ W. Jentzen, M. C. Simpson, J. D. Hobbs, X. Song, T. Ema, N. Y. Nelson, C. J. Medforth, K. M. Smith, M. Veyrat, M. Mazzanti, R. Ramasseul, J.-C. Marchon, T. Takeuchi, W. A. Goddard, J. A. Shelmutt ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 11085-11097.
- ⁵ M. Perutz ; *Pour la science*, **1979**, 16, 71-85.
- ⁶ L. R. Milgrom ; *The Colors of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford Univ. Press, UK, **1997**, 249-260.
- ⁷ M. Gouterman, *J. Mol. Spectrosc.*, **1961**, 6, 138-163.
- ⁸ K. M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, **1975**, p 910, Elsevier Amsterdam.
- ⁹ H. Fischer, H. Orth; *Die Chemie des Pyrrols*, **1934-1940**, vol. I-III, Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig..
- ¹⁰ E. D. Becker, R. B. Bradley ; *J. Chem. Phys.*, **1959**, 31, 1413-1414.
- ¹¹ T.R. Janson, J.J. Katz *The Porphyrins Handbook*, vol. IV, Ed. D. Dolphin,academic Press,**1979**
- ¹² J. M. Craig ; *The Porphyrins Handbook*, vol. V, Ed. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, **1999**.
- ¹³ T. R. Janson, J. J. Katz, *The Porphyrins*, vol. IV, Eds D.Dolphin, Accademic Press, **1979**.
- ¹⁴ F. A. Walker, Proton NMR and EPR Spectroscopy of Paramagnetic Metalloporphyrins, in *The Porphyrin Handbook* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, p. 81.
- ¹⁵ G. N. La Mar, J. D. Satterlee, J. S. De Ropp, Nuclear Magnetic Resonance of Hemoproteins, in *The Porphyrin Handbook* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, p. 185.
- ¹⁶ a) G. N. La Mar, J. D. Satterlee, J. S. De Ropp, Nuclear Magnetic Resonance of Hemoproteins, in *The Porphyrin Handbook* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, p. 185.
b) L. Banci, I. Bertini, C. Luchinat, P. Turano, Solution Structures of Hemoproteins, in *The Porphyrin Handbook* (Eds.: K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard), Academic Press, San Diego, CA, **2000**, p. 323.
- ¹⁷ E. Pacholska-Dudziak, L. Latos-Grazynski, *Eur. J. Inorg.Chem.*, **2007**, 2594-2608.
- ¹⁸ R. J. Abraham, G. E. Hawkes, M. F. Hudson, K. M. Smith ; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1975**, 3, 204-211
- ¹⁹ F. Rusconi, J. M. Schmitter ; *Analisis Magazine*, **1998**, 26, 13-17.
- ²⁰ M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp ; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 78, 53-68.
- ²¹ P. J. Rothmund ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 61, 2912-2915.
- ²² P. J. Rothmund, A. R. Menotti ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 267-270.
- ²³ A. D. Adler, F. R. Longo, J. D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff ; *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476.
- ²⁴ R. G. Little, J. A. Anton, P. A. Loach, J. A. Ibers ; *J. Heterocycl. Chem.*, **1975**, 12, 343-349.
- ²⁵ A. M. A. R. Gonzalves, M. M. Pereira ; *J. Heterocycl. Chem.*, **1985**, 22, 931-933.
- ²⁶ J. S. Lindsey, H. C. Hsu, I. C. Schreiman ; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969-4970.
- ²⁷ J. S. Lindsey, *The Porphyrins Handbook*, vol. I (Synthesis and Organic Chemistry), K.M. Kadish, K.M. Smith, R. Guillard (Eds.) **1999** .

- ²⁸ J.S. Lindsey, S. Prathapan, T.E. Johnson, R.W. Wagner, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 8941-8968.
- ²⁹ D. Oulmi, P. Maillard, J.-L. Guerquin-Kern, C. Huel, M. Momenteau, *J. Org. Chem.*, **1995**, 60, 1554-1560.
- ³⁰ Y. Vignaud, R. Granet, P. Krausz, *J. Porphyrins phthalocyanines*, 10(7), **2006**, 937-941.
- ³¹ W. Siedel, F. Winkler ; *Liebigs Ann. Chem.*, **1943**, 54, 162-201.
- ³² L. T. Nguyen, M. O. Senge, K. M. Smith ; *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 998-1003.
- ³³ H. Fischer, H. Friedrich, W. Lamatsch, K. Morgenroth ; *Techn. Hochschule, Munchen. Ann.*, **1928**, 466, 147-178.
- ³⁴ H. Fischer, R. Zeile, *Ann. Chem*, **1929**, 98, 468
- ³⁵ a) G.P. Arsenaault, E. Bullock, S.F. MacDonald ; *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4384-4389.
b) R. B. Woodward ; *Angew. Chem.*, **1960**, 72, 651-662.
- ³⁶ R. B. Woodward ; *Pure Appl. Chem.*, **1961**, 2, 383-404.
- ³⁷ J.L. Sessler, M.R. Johnson, S.E. Creager, J.C. Fettinger, J.A. Ibers, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 9310, **1990**.
- ³⁸ J.S. Lindsey, *The Porphyrin Handbook*, K.M. Smith, R. Guilard (Eds), Academic Press Burlington, MA, **1999**.
- ³⁹ C.-H. Lee, J. S. Lindsey, *Tetrahedron*, 50, 11427, **1994**.
- ⁴⁰ D.M. Wallace, K. Smith, *Tetrahedron Lett.*, 31, 7265, **1990**.
- ⁴¹ T. Ema, Y. Kurroda, H. Ogoshi, *Tetrahedron Lett.*, 32, 4529, **1991**.
- ⁴² B. J. Littler, Y. Ciringh, J. S. Lindsey *J. Org. Chem.*, **1999**, 64 (8), 2864-2872.
- ⁴³ G. R. Geier, J.B. Callinan, P. D. Rao and J. S. Lindsey ; *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**; 5, 810-823
- ⁴⁴ J. L. Sessler, J. W. Genge, A. Urbach, P. Sansom ; *Synlett*, **1996**, 2, 187-188.
- ⁴⁵ a) K.M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, K.M. Smith (Ed.), Elsevier, Amsterdam, **1975**, 29-58.
b) P.S. Clezy, *Aust. J.Chem*, **1991**, 44, 1163.
- ⁴⁶ H. Fischer, *Org. Synth. Coll. Vol. III*, 442-443, **1955**.
- ⁴⁷ R. F. Labbe, G. Nishida, *Biochem. Biophys. Acta*, 26, 437, **1957**.
- ⁴⁸ H.H. Inhoffen, *Naturwissenschaften* (**1968**), 55(10), 457-462.
- ⁴⁹ R. Willstatter, M. Utzinger, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (**1911**), 382, 129-94.
- ⁵⁰ H. Fischer, W. Seidel, L. Le Thierry. *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (**1933**), 500, 137-202.
- ⁵¹ R. Willstatter, Y. Asahina, *Justus Liebigs Annalen der Chemie* (**1910**), 373, 227-238.
- ⁵² G. Jori, J. D. Spikes, *Photobiochemistry of porphyrins. Topics in photomedicine*. K.C. Smith Ed., Plenum Press, New York **1984**.
- ⁵³ G.O. Schenck, *Angew. Chem.*, 69, 579, **1957**.
- ⁵⁴ E.M.K. Mansour, P. Maillard, P. Krausz, S. Gaspard, C. Giannotti, *J. Mol. Cat.*, 41, 361, **1987**.
- ⁵⁵ D. Mansuy, J.M. Berg, *Bioinorganic catalysis*, J. Reedijk Ed., M. Dekker, Inc., New York, **1993**, 395-468.
- ⁵⁶ D. Mansuy, *Pure and Appl. Chem.*, **1987**, 59, 759-770.
- ⁵⁷ F. Montanari, L. Casella, *Metalloporphyrins Catalysed Oxydations*, Kluwer Accademic, Dordrecht, **1994**.

- ⁵⁸ J. T. Groves, T. E. Nemo, R. S. Myers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101 (4), 1032-1033.
- ⁵⁹ J. T. Groves, R. S. Myers, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 5786.
- ⁶⁰ M. Filatov, N. Harris, S. Shaik, *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, No. 23, 3510-3512
- ⁶¹ J. T. Groves, T. E. Nemo, *J. Am. Chem. Soc.*, **1983**, 105, 6243.
- ⁶² J.T. Groves, P.Viski, *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111(22), 8537-8538.
- ⁶³ D. Mansuy, P. Battioni, *Bioinorganic catalysis*, J. Reedijk Ed., Marcel Dekker, Inc., **1993**, 395-468.
- ⁶⁴ D. Mansuy, P. Battioni, J.P. Renaud, P. Guerin, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 155, **1985**.
- ⁶⁵ P. Maillard, J.L. Guerin-Kern, M. Momenteau, *Tetrahedron Lett.*, 32, 4901, **1991**.
- ⁶⁶ a) P.A. Grieco, T.L. Stuk, *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 7799, **1990**.
b) T.L. Stuk, P.A. Grieco, M.M. March, *J. Org. Chem.*, 56, 2957, **1991**.
- ⁶⁷ a) G.L. Labat, J.L. Seris, B. Meunier, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 29, 1471, **1990**.
b) B. Meunier, *Chem. Rev.*, 92, 1411, **1992**.
- ⁶⁸ J. Haber, M. Kosowski, J. Potowicz, *J. Mol. Cat. A: Chem.*, 201, 1-2, **2003**, 167-178.
- ⁶⁹ J. M. Lehn, M. Kirch, J.-P. Sauvage, R. Ziessel, *La Recherche*, **1980**, 11, 205.
- ⁷⁰ L. R. Milgrom ; *The Colors of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford Univ. Press, UK, **1997**, 151.
- ⁷¹ A. Jesionek, H. von Tappeiner, *Munch. Med. Wochenschr.*, **1903**, 41, 2042-2051.
- ⁷² F. Meyer-Betz, *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, **1913**, 112, 476-503.
- ⁷³ A. Policard, A. Leulier, *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **1924**, 91, 1422-1433.
- ⁷⁴ F. H. J. Figge, G. S. Weiland, L. O. J. Manganiello, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, 68, 640-641.
- ⁷⁵ R. L. Lipson, E. J. Baldes, *Arch. Dermatol.*, **1960**, 82, 508-516.
- ⁷⁶ R.L. Lipson, E.J. Blades, A.M. Olsen, *J. Natl. Cancer.I.*, **1961**, 26, 1-12.
- ⁷⁷ T. J. Dougherty, *J. Natl. Cancer Inst.*, **1974**, 52, 1133-1136.
- ⁷⁸ T. J. Dougherty, J. Kaufman, *Cancer Res.*, **1978**, 38(8), 2628-2655.
- ⁷⁹ K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty, *Cancer Res.*, **1976**, 36, 2326-2329.
- ⁸⁰ G. Jori, J. D. Spikes, *Photobiochemistry of porphyrins. Topics in photomedicine*. K.C. Smith Ed., Plenum Press, New York **1984**.
- ⁸¹ R. Bonnett, *New Scientist*, 55, **1989**.
- ⁸² E. D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brückner ; *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151-4202.
- ⁸³ J. Moan ; *Photochem. Photobiol.*, **1990**, 6, 343-347.
- ⁸⁴ T. J. Dougherty; W. R. Potter, K. R. Weishaupt, *Progress in Clinical and Biological Research*, **1984**, 170, 301-314.
- ⁸⁵ M. M. Ressler, R. K. Pandey ; *CHEMTECH*, **1998**, 28, 39-45.
- ⁸⁶ R. Bonnett, B. D. Djelal, A. Nguyen, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5, 652-661.

- ⁸⁷ T. R. Nathan, D. E. Whitelaw, S. C. Chang, W. R. Lees, P. M. Ripley, H. Payne, M. C. Parkinson, M. Emberton, A. R. Gilliams, A. R. Mundy, S. G. Bown, *J. Urology*, **2002**, 168, 1427-1432.
- ⁸⁸ S. G. Bown, A. Z. Rogowska, D. E. Whitelaw, W. R. Lees, L. B. Lovat, P. Ripley, L. Jones, P. Wyld, A. Gilliams, A. W. R. Hatfield, *Gut*, **2002**, 50, 549-557.
- ⁸⁹ G. A. Kostenich, I. N. Zhuravkin, E. A. Zhavrid, *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 22, 211-217.
- ⁹⁰ T. J. Dougherty, *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 58, 895-900.
- ⁹¹ S. H. Selman, D. Albrecht, R. W. Keck, P. Brennan, S. Kond, *J. Urology*, **2001**, 165, 1795-1801.
- ⁹² J. L. Sessler, R. A. Miller, *Biochem. Pharm.*, **2000**, 59, 733-739.
- ⁹³ R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C. J. H. Childs, C. H. Sibata ; *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2004**, 1, 27-42
- ⁹⁴ D. James, N. Swamy, N. Paz, R. Hanson, R. Ray, *Bioorganic & Medical Chemistry Letters* (**1999**), 9 (16), 2379-2384.
- ⁹⁵ N. Swamy, D. James, S.C. Mhor, R. Hanson, R. Ray ; *Bioorganic & Medical Chemistry* (**2002**), 10(10), 3237-3243.
- ⁹⁶ R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J.-F. Müller, M. Barberi-Heyob, *Bioorg. Med. Chem.*, 13, (**2005**), 2799-2808.
- ⁹⁷ C. Kaldapa, J. C. Blais, V. Carré, R. Granet, V. Sol, M. Guilloton, M. Spiro, and P. Krausz, *Tetrahedron Lett.*, 41, 331-335, **2000**.
- ⁹⁸ a) N. Ono, M. Bougauchi, K. Maruyama, *Tetrahedron Lett.*, 33, 1629, **1992**.
b) G. Gasiraghi, M. Cornia, R. Bortolini, *J. Org. Chem.*, 59, 1801, **1994**.
- ⁹⁹ D. Oulmi, P. Maillard, J.-L. Guerquin-Kern, *J. Org. Chem.*, 60, 1554, **1995**.
- ¹⁰⁰ a) O. Gaud, R. Granet, M. Kaouadji, P. Krausz, J.C. Blais, G. Bolbach, *Can. J. Chem.* 74, 481, **1996**.
b) M. Momenteau, P. Maillard, M.-A. De Bélinay, D. Carrez, A. Croisy, *J. Biomed. Optics*, 4, 298, **1999**.
- ¹⁰¹ V. Sol, F. Lamarche, G. Garcia, M. Enache, R. Granet, M. Guilloton, J.C. Blais and Pierre Krausz, *Bioorg. Med. Chem.*, 14, **2006**, 1364-1377.
- ¹⁰² R.A. Casero, P.M. Woster, *J. Med. Chem.*, 4, **2001**, 1-25.
- ¹⁰³ V. Sol, J. C. Blais, V. Carre, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 4431-4444.
- ¹⁰⁴ C. Frochot, B. Distasio, R. Vandresse, J.M. Belgy, M. Dodeller, F. Guillemin, M. L. Viriot, M. Barberi-Heyod, *Bioorg.Chem.*, 35 (**2007**) 205-220.
- ¹⁰⁵ V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1486-1493
- ¹⁰⁶ V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, *Tetrahedron Lett.* 45 (**2004**) 5295-5299
- ¹⁰⁷ G. Bergers and L. E. Benjamin., *Nat. Rev. Cancer*, 3, 401-410 (**2003**).
- ¹⁰⁸ R. Kalluri., *Nat. Rev. Cancer*, 3, 422-433 (**2003**).
- ¹⁰⁹ L. P. Reynolds, A. T. Grazul-Bilska, and D. A. Redmer, *Int. J. Exp. Pathol.*, 83, 151 (**2002**).
- ¹¹⁰ J. Li, Y.-P. Zang, and R. Kirsner, *Micros. Res. Tech.*, vol. 60, 107-114 (**2003**).
- ¹¹¹ J. Folkman, *Nat. Med.*, 1, 27-31 (**1995**).
- ¹¹² J. Folkman, *New England Journal of Medicine*, **1971**, 285, 1182-1186.
- ¹¹³ G.-H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein, and M. L. Breitman, *Nature* 376:66-74 (**1997**).

- ¹¹⁴ a) N. Ferrara, K. Houck, L. Jakeman, and D. W. Leung, *Endocr. Rev.*, 13, 18-32 (1992).
b) N. Ferrara, *Kidney Int.*, 56, 794-814 (1999).
c) A. Bikfalvi, R. Bicknell, *Trends Pharmacol. Sci.*, 23, 576-582 (2002).
- ¹¹⁵ K. J. Kim, B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips, and N. Ferrara, *Nature* 362, 841-844 (1993).
- ¹¹⁶ Y. M. Muller, *Proceeding of National Academy of Sciences USA*, 94, 7192-7197 (1997).
- ¹¹⁷ B. A. Keyt, H. V. Nguyen, L. T. Berleau, C. M. Duarte, J. Parke, H. Chen, and N. Ferrara, *J. Biol. Chem.*, 271, 5638-5646 (1996).
- ¹¹⁸ L. Bello, V. Lucini, F. Costa, M. Pluderi, C. Giussani, F. Acerbi, G. Carrabba, M. Pannacci, D. Caronzolo, S. Grosso, S. Shinkaruk, F. Colleoni, X. Canron, G. Tomei, G. Délérís, and A. Bikfalvi, *Clin. Cancer Res.*, 10, 4527-4537 (2004).
- ¹¹⁹ A. Bikfalvi, *Biochem. Pharmacol.*, 68, 1017-1021 (2004).
- ¹²⁰ L. Zilberberg, S. Shinkaruk, O. Lequin, B. Rousseau, M. Hagedorn, F. Costa, D. Caronzolo, M. Balke, X. Canron, O. Convert, G. Lain, K. Gionnet, M. Goncalves, M. Bayle, L. Bello, G. Chassaing, G. Délérís, and A. Bikfalvi, *J. Biol. Chem.*, 278, 35564-35573 (2003).
- ¹²¹ M. Goncalves, K. Estieu-Gionnet, T. Berthelot, G. Laïn, M. Bayle, X. Canron, N. Betz, A. Bikfalvi, and G. Délérís, *Pharma. Res.*, 22, 7, 2005.
- ¹²² R.B. Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85 (14), 2149-2154, 1963
- ¹²³ T.C. Blundell, G.G. Dodson, E. Dodson, D.C. Hodgkin, M. Vijayan, *Recent. Prog. Horm. Res.*, (1971), 27, 1.
- ¹²⁴ S.A. Kates, *Peptides, Chemistry, Structure, Biology, Proc. 13th American Peptide Symposium, ESCOM Leiden*, 1994.
- ¹²⁵ H. Staüding, J. Meyer, *Helv. Chim. Acta*, 2, 635-646, 1919
- ¹²⁶ V. Chaleix, V. Sol, Y.-M. Huang, M. Guilloton, R. Granet, J.-C. Blais, P. Krausz, *Eur. J. Org. Chem.* 2003, 1486-1493.
- ¹²⁷ R.A. Decréau, J. P. Collman, Y. Yang, Y. Yan, and N. K. Devaraj, *J. Org. Chem.* 2007, 72, 2794-2802
- ¹²⁸ J. C. Bagley, K. Barlos, *Int. J. Peptide Protein. Res.*, 36, 356 (1990).
- ¹²⁹ T. Høeg-Jensen, M. H. Jakobsen, C. E. Olsen, A. Holm, *Tetrahedron Lett.*, 32, 7617-7620 (1991).
- ¹³⁰ M. S. Bernatowicz, S. B. Daniels, Hubert Köster, *Tetrahedron Lett.*, 30, 4645-4648 (1989).
- ¹³¹ C.G. Fields, D.H. Lloyd, R.L. Macdonald, K.M. Otteson, R.L. Noble, *Pept.Res.*, 4, 95 (1991).
- ¹³² G.E. Reid, R.J. Simpson, *Anal. Biochem.*, 200, 301 (1992).
- ¹³³ J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro, *Tetrahedron Lett*, 31, 205-208 (1990).
- ¹³⁴ L. Carpino, E.-F. Ayman, *Chem. Commun.*, 2, 201-203 (1994).
- ¹³⁵ L. Carpino, E.-F. Ayman, F. Albericio, *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 11, 3561-3564.
- ¹³⁶ a) W.S. Horne, C.D. Stout, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 9372-9376. b) W.S. Horne, M.K. Yada, C.D. Stout, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 15366-15367.
- ¹³⁷ H. C. Kolb, M. G. Finn, K. B. Sharpless, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2001, 40, 2004-2021.
- ¹³⁸ Tornøe, C.W.; Christensen, C.; Meldal, M. *J. Org. Chem.* 2002, 67, 3057-3064.
- ¹³⁹ Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2002, 41, 2596-2599;
- ¹⁴⁰ F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 210-216.
- ¹⁴¹ F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovtsev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, 127, 210-216.

- ¹⁴² R. Mantesch, A. Krasinski, Z. Radic, J. Raushel, P. Taylor, K. B. Sharpless, H. C. Kolb, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, 126, 12809–12818
- ¹⁴³ M. Malkoch, R.J. Thibault, E. Drockenmuller, M. Messerschmidt, B. Voit, T.P. Russell, C.J. Hawker, *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 14942–14949.
- ¹⁴⁴ B. L. Wilkinson, Laurent F. Bornaghi, Sally-Ann Poulsen and Todd A. Houston *Tetrahedron* **2006**, 62, 8115–8125
- ¹⁴⁵ F. Pérez-Balderas, M. Ortega-Muñoz, Julia Morales-Sanfrutos, F. Hernández-Mateo, F.G. Calvo-Flores, J.A. Calvo-Asín, J. Isac-García, F. Santoyo-González, *Org. Letters*, **2003**, 5, 11, 1951-1954.
- ¹⁴⁶ V.V. Rostovtsev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41(14), 2596-2599.
- ¹⁴⁷ C.W. Tornøe, C. Christensen; M. Meldal, *J. Org. Chem.*, **2002**, 67, 3057-3064.
- ¹⁴⁸ R.A. Decréau, J.P. Collman, Y. Yang, Y. Yan, and Neal K. Devaraj *J. Org. Chem.* **2007**, 72, 2794-2802
- ¹⁴⁹ a) P. Boullanger, V. Maunier, D. Lafont, *Carbohydr. Res.*, 324, **2000**, 97-106.
b) E. Saxon, C. R. Bertozzi, *Science* 287, **2000**, 2007-2010.
- ¹⁵⁰ S.-D. Park, J.-H. Oh, D. Lim, *Tetrahedron Lett.*, 43, **2002**, 6309- 6311.
- ¹⁵¹ J. H. Furhop, C. Demoulin, C. Boettcher, J. Koning, U. Siggel, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4159.
- ¹⁵² K. McWilliams, J. W. Kelly, *J. Org. Chem.* **1996**, 61, 7408-7414
- ¹⁵³ J. S. Nowick, M. Pairish, I. Q. Lee, D. L. Holmes, J. W. Ziller, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, 119, 5413-5424.
- ¹⁵⁴ K. Kadish, K. M. Smith and R. Guilard, *The porphyrin Handbook*, Boston: Academic, **2000**, vol.6
- ¹⁵⁵ V. Yu. Pavlov, *Russian Journal of Organic Chemistry*, **2007**, Vol.43, No.1, p1-34
- ¹⁵⁶ Shu. S. Wang *J. Am. Chem. Soc.*, 95, 1328- 1333, **1973**.
- ¹⁵⁷ G. Lu, S. Molsov, *J. Org. Chem.*, 46, 3433, **1981**.
- ¹⁵⁸ Y. Wang, S. R. Wilson *Tetrahedron Lett.*, 38, 4021, **1997**
- ¹⁵⁹ A.S. Kiselyov, R. W. Armstrong *Tetrahedron Lett.*, 38, 6163, **1997**
- ¹⁶⁰ S. Patai, , *Chem. Halides Pseudo-halides and Azides*, Z. Rappoport Eds., Wiley, Chichester, UK, **1983**, Vol. 1, p. 321.
- ¹⁶¹ G. K. Surya Prakash, M. Arvanaghi, G.A. Olah, *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 3358.
- ¹⁶² P. Laszlo, E. Polla, *Tetrahedron Lett.* **1984**, 25, 3701.
- ¹⁶³ E. Biron, N. Voyer, *Chem. Commun.*, **2005**, 4652-4654.
- ¹⁶⁴ V. Stratos, G. Ioannis, K. Voyagi, P. Mamosb, D. Papaioannou *Tetrahedron Letters* 43 (**2002**) 2597-2600.
- ¹⁶⁵ a) J. S. Davies, J. Howe, J. Jayatilake, T. Riley, *Letters in Peptide Science*, 4 (**1997**), 441-445.
b) R. T. Pon, S. Yu, *Bioconjugate Chemistry*, 10, 6, 1051-1057 (**1999**).
- ¹⁶⁶ a) H. Yang, Y. Peng, G. Song, X. Qian, *Tetrahedron Letters* 42 (**2001**) 9043-9046.
b) A. Stadler, C.O. Kappe, *Tetrahedron* 57 (**2001**) 3915-3920.
- ¹⁶⁷ A. Stadler, C. O. Kappe, *Eur. J. Org. Chem.* **2001**, 919-925
- ¹⁶⁸ E. Kaiser *Anal. Biochem.*, 34, 595, (1970).
- ¹⁶⁹ A. Loupy, A. Haudrechy, *Méthodes et Techniques de la Chimie Organique*, Grenoble Sciences Eds. (**1999**).
- ¹⁷⁰ L. Perreux; A. Loupy; *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9199-9223.

*PARTIE
EXPERIMENTALE*

I- REACTIFS ET SOLVANTS

Concernant la synthèse peptidique en phase solide, le support utilisé est une résine 2-chloro-chlorotriyle fonctionnalisée à 1,6mmole/gramme : elle provient de chez Advanced Chemtech, tout comme les acides aminés N-(9-fluorènylméthoxycarbone, Fmoc) qui constituent le *cyclo*VEGI. A la seule exception de la *D*-phénylalanine, les autres acides aminés utilisés sont de configuration naturelle (*L*). Les acides aminés trifonctionnels ont été utilisés sous formes protégées à savoir :

- La fonction α -carboxylique de l'acide glutamique est protégée sous forme d'ester allylique (All).

- L'amine primaire de la chaîne latérale de la lysine est protégée sous forme de carbamate (*tert*butoxycarbone, Boc).

- L'hétérocycle imidazole de l'histidine, ainsi que l'amide primaire de la glutamine sont protégés avec un groupement trityle (triphénylméthyle, Trt).

- La fonction guanidino portée par l'arginine est protégée par le groupement 2,2,4,6,7-pentaméthyl-5-sulfonyldihydrobenzofurane (Pbf).

Les couplages peptidiques ont été réalisés au moyen de solutions commercialisées à cet effet par Applied Biosystems : il s'agit du mélange équimolaire HBTU/HOBt à 0,5M dans la NMP, et de la solution de DIEA à 2M dans la NMP.

Les autres réactifs et solvants utilisés au cours de ce travail sont recensés dans le tableau suivant. Ces composés sont utilisés en l'état de réception, après avoir contrôlé leur pureté (essentiellement par CCM, et spectrométrie IR). Leurs éventuels traitements y sont également mentionnés : ils ont été réalisés selon les procédures classiques, décrites notamment dans le *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry* (5^{ème} édition, 1989).

RÉACTIFS & SOLVANTS (pureté)	Origines	Abréviations communes	Traitements éventuels
Acétonitrile (solvant de qualité HPLC: +99,9%)	VWR	MeCN	Dégazé à l'Hélium puis filtré sur membrane (0,2 μ m)
Acide acétique glacial [99-100%] (PA)	Fisher Labosi	AcOH	-
Acide chlorhydrique fumant [37% en poids] (PA)	Fisher Labosi	HCl concentré	-
Acide propanoïque (99%)	Acros	EtCO ₂ H	-

RÉACTIFS & SOLVANTS (pureté)	Origines	Abréviations communes	Traitements éventuels
Acide trifluoroacétique (99%)	Acros	TFA	-
Alcool 9-fluorène méthylique (99%)	Acros	Fmoc-OH	-
Anhydride acétique (+99%)	Aldrich	-	-
Anisole [méthoxy-benzène] (PA)	Prolabo	Anisole	-
(+)-L-Ascorbate de sodium (PA)	Sigma	-	-
Azoture de sodium (+99%)	Fluka	-	-
Bromure de propargyle En solution (à 80% en poids) dans du toluène	Aldrich	-	-
Carbonate de potassium anhydre (PA)	Acros	K ₂ CO ₃	Etuvé à 100°C 24 heures
4-carboxy-benzaldéhyde	Acros	-	-
Chlorhydrate de N,N'-diméthylaminopropyl-éthyl-carbodiimide (+98%)	Acros	EDC	-
Chloroforme (99,9%)	SDS	CHCl ₃	
Chloroforme anhydre	-		Distillé sur P ₂ O ₅ puis CaH ₂
Chlorure de méthanesulfonyle [chlorure de mésyle] (+99%)	Aldrich	MsCl	-
Chlorure de sodium (PA)	Acros	NaCl	Utilisé en solution aqueuse saturée
Chlorure de thionyle [SOCl ₂] (99,5%)	Aldrich	SOCl ₂	-
Diacétate de Zinc, dihydrate (98%)	Prolabo	-	-
Dichlorométhane (99,8%)	SDS	DCM	-
Dichlorométhane anhydre.	-		Distillé sur P ₂ O ₅ puis CaH ₂
N,N-diisopropyl-éthylamine (+99%)	Sigma	DIEA	-
4,4-diméthylaminopyridine (99%)	Acros	DMAP	-
Diméthylacétamide (99%)	Acros	DMAc	-
Diméthylformamide (+99%)	Acros	DMF	-
Diméthylformamide anhydre [50ppm ≥ eau] (99,5%)	Acros		-
Ethanol (absolu)	Elvetec	EtOH abs.	-
Ether de pétrole [Fraction _{40-65°C}] (+99%)	SDS	EP	-

RÉACTIFS & SOLVANTS (pureté)	Origines	Abréviations communes	Traitements éventuels
Ether diéthylique (PA)	VWR	Et ₂ O	-
N-(9H-Fluorèn-2-ylméthoxycarboxyloxy)succinimide (98%)	Acros	FmocOSu	-
Hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazolyl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium	Fluka	HBTU	-
Hexafluorophosphate de <i>tris</i> -pyrrolidino-bromo-phosphonium	Novabiochem	PyBrOP	-
Hexafluorophosphate de <i>tris</i> -pyrrolidino-phosphonium	Novabiochem	PyBOP	-
Hydrogénocarbonate de sodium (99%)	Acros	NaHCO ₃	Utilisé en solution aqueuse saturée
4-hydroxybenzaldéhyde (99%)	Acros	-	-
1-hydroxybenzotriazole	Acros	HOBt	-
N-hydroxysuccinimide (+98%)	Acros	NHS	-
Méthanol (pour HPLC)	Fisher	MeOH	-
N-méthylpyrrolidone anhydre [50ppm ≥ eau] (99,5%)	Acros	NMP	-
Phénol (99%)	Acros	PhOH	-
Protoporphyrine IX (#95%)	Sigma	Pp IX	-
Pyridine anhydre (99,75%)	Sigma	-	-
Pyrrole	Acros	-	Distillé sous pression réduite
Résine Wang (1,1mmoles/g) réticulée à 1%DVB	Fluka	-	-
Sulfate de Cuivre, pentahydraté (PA)	Prolabo	CuSO ₄	-
Sulfate de Magnésium, trihydraté (99%)	SDS	MgSO ₄	-
<i>Tertiobutanol</i>	Prolabo	<i>t</i> BuOH	-
Tétraéthylène glycol (99,5%)	Acros	-	-
Tetrahydrofurane (+99%)	VWR	THF	-
Tetrahydrofurane anhydre	-		Distillé sur Potassium.
Thioanisole (99%)	Acros	-	-
<i>para</i> -Tolualdéhyde	Acros	-	Distillé sous pression réduite
Toluène (+99%)	SDS	-	-
Toluène anhydre	Aldrich	-	-

RÉACTIFS & SOLVANTS (pureté)	Origines	Abréviations communes	Traitements éventuels
Triéthylamine (+99,5%)	Fluka	Et ₃ N	-
Tri-isopropylsilane (98%)	Acros	TIS	-
Tri- <i>n</i> butylphosphine (95%)	Acros	P <i>n</i> Bu ₃	-
Triphénylphosphine (99%)	Aldrich	PPh ₃	-

II- ANALYSES ET PURIFICATIONS PAR CHROMATOGRAPHIES

1) Chromatographies analytiques

Chromatographie sur Couche Mince (CCM analytique)

La pureté des réactifs et des produits ainsi que l'évolution des réactions sont contrôlées par CCM, sur gel de silice. A cet effet, les plaques d'aluminium recouvertes par 0,2mm de silice 60F₂₅₄ sont utilisées. Pour l'analyse des composés aminés, ces plaques sont préalablement traitées par migration d'un mélange DCM / Et₃N (90/10) puis séchage.

La révélation est ensuite obtenue par une ou plusieurs des méthodes suivantes.

- Observation directe, pour les chromophores,
- Observation sous lampe UV (254nm), pour les composés aromatiques.
- Pulvérisation d'une solution révélatrice, choisie parmi celles indiquées ci-dessous, puis chauffage.
 - Solution aqueuse de permanganate de potassium (1g de KMnO₄ dans 100mL d'eau) pour révéler notamment les alcènes et les éthers.
 - Solution d'orcinol (0,1g d'orcinol dans 80mL d'eau et 20mL d'acide sulfurique concentré) pour révéler notamment les éthers, esters et les amides.
 - Solution de ninhydrine (0,1g de ninhydrine dans 80mL de *tert*-butanol et 1mL d'acide acétique glacial) pour révéler les amines primaires et secondaires.
 - Solution de triphénylphosphine (0,5g de PPh₃ dans 100mL de THF et 1mL d'eau distillée) pour révéler les azotures. La plaque est trempée dans cette solution, puis séchée à l'air libre. Les amines primaires ainsi formées sont alors révélées avec la solution de ninhydrine.

Chromatographie Liquide Haute Pression (RP-HPLC analytique)

Les peptides sous formes déprotégées ainsi que leurs dérivés porphyriniques sont analysés par chromatographie liquide haute pression, en phase stationnaire inverse (RP-HPLC), au moyen d'une colonne analytique C18 Hibar Purosphere (250 x 4,6mm) de chez Merck. Au débit de 1mL/min, l'élution est réalisée par gradient de polarité, en utilisant deux éluants : le mélange

A (0,1% de TFA dans l'eau) et le mélange B (0,1% de TFA dans un mélange acétonitrile/eau en 70/30). La détection des peptides est réalisée à 214nm ; une détection supplémentaire est pratiquée vers 430nm (λ_{max}) pour les peptides porphyriniques **16** et **17**.

2) Chromatographies préparatives

Chromatographie Liquide Haute Pression (RP-HPLC semi-préparative)

Les peptides porphyriniques déprotégés **4b**, **16** et **17** sont purifiés sur une colonne préparative C18 Hibar Purosphere de chez Merck. Les mélanges A et B sont utilisés pour réaliser l'élution, au débit de 4mL/min, selon les gradients de polarité déterminés pour des RP-HPLC analytiques.

Chromatographie sur colonne de silice

Les purifications sont réalisées avec des colonnes de 2 à 5cm de diamètre, conditionnées sur 20 cm de hauteur avec de la silice (gel de silice Merck MCL-CHROM, granulométrie : 15-40 μm) dispersée dans le mélange éluant choisi.

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

Chromatographie sur Couche Mince de silice (CCM préparative)

Un gel de silice (80g de silice Merck 60PF254 dispersée dans 220mL d'eau) est étalé en une couche épaisse de 2mm sur six plaques de verre (20x20cm) alignées sur un banc. Après séchage à l'air libre, les plaques sont étuvées (100°C pendant 2 heures) avant usage.

III – ANALYSES PHYSIQUES

Les spectres RMN ont été enregistrés au sein du laboratoire du groupe de Chimie Bio-Organique de Bordeaux sur un appareil Bruker Advance 300, à 300,13MHz pour le proton et 75,46 MHz pour le carbone 13; ou bien sur l'appareil Bruker DPX-400 du Service Commun de l'Université de Limoges, respectivement à 400,13 MHz et 100,62 MHz. Les déplacements chimiques (δ) sont exprimés en ppm, en prenant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence interne. Les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. Les abréviations utilisées pour nommer les figures sont: s (singulet), d (doublet), dd (double doublet), ddd (double double doublet), t (triplet), dt (double triplet), ddt (double double triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet), m (multiplet). Les figures élargies comportent un « él » en indice.

Les spectres UV-Visible ont été réalisés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 25. Dilués à des concentrations de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-6} M, les échantillons sont placés dans des cuves en quartz dont le trajet optique est de 1cm. Les longueurs d'ondes correspondant aux absorbances maximales sont exprimées en nanomètres (nm) et les coefficients d'absorption molaire (ϵ) en $M^{-1}.cm^{-1}$.

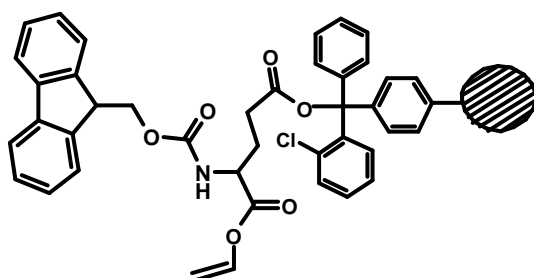
Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer 310 FT-IR Spectrometer SPECTRUM 1000. L'analyse est réalisée après échantillonnage en pastille de KBr. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} .

Les spectres de masse MALDI ont été effectués au Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique de l'Université Pierre et Marie Curie - Paris VI par les Dr. Jean-Claude Blais et Sandra Alves par désorption laser avec un spectromètre à temps de vol Voyager Elite. Les spectres de masse haute résolution, quant à eux, ont été réalisés sur un appareil Micromas Autospec-Q.

IV- SYNTHÈSES

Les précurseurs du *cyclo*VEGI : Synthèse Peptidique en Phase Solide

I - Chargement du premier acide aminé sur résine 2-chloro-chlorotrityle 1



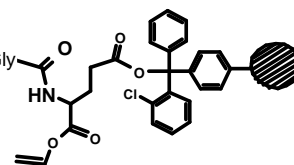
Dans 10mL de DCM anhydre contenant 1mL (6,29mmoles ; 20 éq.) de DIEA, 638mg (1,56mmoles ; 5éq.) de Fmoc-Glu-OAll sont solubilisés. Cette solution est additionnée à 240mg (0,312mmoles ; 1éq.) de résine 2-chloro-chlorotrityle. Après 2 heures d'agitation à température ambiante, la résine est isolée par filtration sur fritté (porosité 4) puis lavée successivement avec 3x10mL d'un mélange DCM/MeOH/DIEA (17 : 2 : 1), puis 3x10mL de DCM, 2x10mL de DMF et 3x10mL de DCM.

Après une nuit de séchage sous le vide d'une pompe à palettes (sur KOH), le taux de greffage est déterminé en pesant deux échantillons de résine dans des fioles jaugées de 50mL (4,9mg pour E1 ; 5,1mg pour E2). 500 μ L d'une solution de pipéridine à 20% dans le DMF sont additionnés dans E1, E2, ainsi que dans une fiole vide afin de préparer un blanc. Durant les 15 minutes qui suivent l'addition, les fioles sont agitées pour garantir un bon contact entre les billes de résine et la solution de pipéridine. Puis chaque fiole est remplie jusqu'au trait de jauge avec du DMF, et les mélanges sont homogénéisés par agitation. Le blanc est utilisé pour faire le zéro du spectrophotomètre à la longueur d'onde de 301nm, puis les absorbances sont mesurées pour les solutions E1 (0,481) et E2 (0,500). La formule $T=(Abs_{301} \times Vol)/(7800 \times M)$ permet de déterminer le taux de greffage de **1** qui est de 0,63mmole/gramme de résine.

Abs₃₀₁ étant l'absorbance de la solution mesurée à 301nm, Vol (en mL) le volume de la solution, ϵ : coefficient d'extinction molaire de l'adduit formé : sa valeur est de 7800 M⁻¹cm⁻¹ (dans le DMF pour $\lambda=301$ nm) ; et M, la masse (en gramme) de l'échantillon de résine.

II - VEGI supporté, sous forme linéaire protégée 2

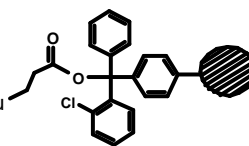
FmocNH DPhe-Pro-Gln(Trt)-Ile-Met-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Pro-His(Trt)-Gln(Trt)-Gly-Gln(Trt)-His(Trt)-Ile-Gly



Dans le réacteur en téflon du synthétiseur *Applied Biosystems 433A* sont introduites 0,25mmoles de **1**. La synthèse peptidique en phase solide est réalisée selon la méthode « Fastmoc 0,25mmole » pour laquelle nous avons programmé des doubles couplages conditionnels. L'itération des cycles de déprotection-lavages et couplage-lavages permet d'obtenir le peptide souhaité sur résine, sous forme linéaire protégée.

III – CycloVEGI supporté, sous forme protégée 3

DPhe-Pro-Gln(Trt)-Ile-Met-Arg(Pbf)-Ile-Lys(Boc)-Pro-His(Trt)-Gln(Trt)-Gly-Gln(Trt)-His(Trt)-Ile-Gly-Glu



Clivage de l'ester allylique : Sur un bain d'huile chauffé à 40°C sont disposés deux ballons de 50mL. 1,59g (0,25mmoles ; 1éq.) de résine **2** sont introduits dans un ballon, le second étant chargé avec 966mg (0,83mmole ; 3éq.) de Pd(PPh₃)₄. Les réactifs sont alors soumis au vide d'une pompe à palettes pendant 4 heures avant leur utilisation. Sous Argon, 20mL d'un mélange CHCl₃/AcOH/NMM (37/2/1) sont ensuite agités avec Pd(PPh₃)₄. La suspension obtenue est transférée dans le ballon contenant **2** puis ce mélange est agité manuellement, toutes les 15 minutes pendant 3 heures. La résine est ensuite isolée par filtration (sur fritté porosité 4) et lavée successivement avec 50mL d'une solution à 0,5% (en volume) de DIEA dans la NMP, suivis par 50mL d'une solution 0,5% (en masse) de diéthyl-dithio-carbamate de sodium dans la NMP, puis 50mL de DCM, 50mL d'une solution à 1M de HOBt dans la NMP, 50mL de NMP et 50mL de DCM pour finir.

Clivage du groupement Fmoc N-terminal : Séchée une nuit sous le vide d'une pompe à palettes, la résine est alors traitée avec 50mL d'une solution à 20% (en volume) de pipéridine dans la NMP. Après 3 heures à température ambiante, la résine est récupérée par filtration, puis successivement lavée avec 50mL d'une solution à 1M de HOBt dans la NMP,

50mL de NMP, puis avec 50mL de DCM. La résine est séchée en une nuit sous le vide d'une pompe à palettes (sur KOH).

Cyclisation : Sous Argon, à température ambiante, 1,11g de résine sont agités dans 20mL de NMP. 210 μ L (1,2mmoles ; 6 éq.) de DIEA, 313mg (0,60mmoles ; 3 éq.) de PyBOP et 80mg (0,60mmoles ; 3 éq.) de HOBt sont successivement introduits. Le milieu réactionnel est agité tant que la présence d'amines primaires sur le support de synthèse est mise en évidence par le test de Kaiser*. Après 48 heures, la cyclisation est complète (Test de Kaiser négatif). La résine est alors lavée avec 50mL de NMP, 50mL de DCM et 50mL de MeOH puis séchée une nuit sous le vide d'une pompe à palettes (sur KOH) : 1,05g de **3** sont ainsi obtenus.

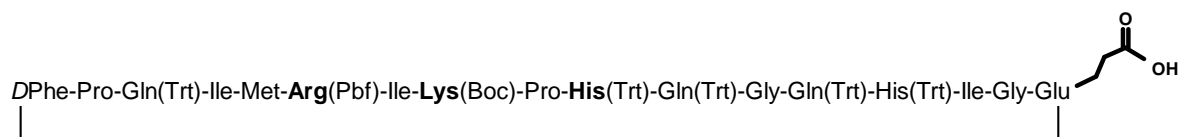
* Le test qualitatif proposé par Kaiser¹⁶⁸ permet de rapidement caractériser rapidement la présence d'amines primaires sur la résine. Pour cela, quelques billes de résine sont prélevées au milieu réactionnel et sont abondamment lavées à l'éthanol : l'échantillon est séché puis transféré dans un tube en verre. Deux gouttes de chaque solution révélatrice** sont additionnées et le tube à essai est mis à l'étuve (120°C, 5 minutes). Si les billes de résines deviennent rouges, le test est positif.

**Trois solutions de révélateur sont préparées pour le test de Kaiser :

- Solution A : solution éthanolique de ninhydrine (50mg/mL).
- Solution B : solution éthanolique de phénol (4g/mL).
- Solution C : mélange de 2mL d'une solution aqueuse de KCN (1mM) avec 98mL de pyridine.

¹⁶⁸ E. Kaiser *Anal. Biochem.*, 34, 595, (1970).

IV – *Cyclo*VEGI sous forme libre protégée **4a**



Dans un réacteur spécial (présenté page suivante) le composé **3** (1,02g) est agité pendant 2 minutes avec 10mL de DCM contenant 0,1% de TFA. La suspension est alors filtrée et le filtrat est collecté dans un ballon contenant 20mL d'une solution à 10% de pyridine dans MeOH. Cette opération est répétée dix fois, la résine est finalement rincée avec du DCM (3x30mL) puis du MeOH (2x30mL). Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif : lorsque son volume est réduit à 5%, 40mL d'eau glacée sont alors ajoutés provoquant la précipitation d'un solide blanc qui est isolé par filtration (sur fritté porosité 4). Après lavages à l'eau glacée (3 x 15mL), le solide est séché sous le vide d'une pompe à palettes (sur KOH). 580mg de **4a** sont ainsi obtenus (solide blanc, rendement massique : 65%). Afin d'analyser ce composé par spectrométrie de masse (MALDI), un échantillon est déprotégé en utilisant la méthode présentée ci- dessous. La masse obtenue est bien celle attendue pour le *cyclo*VEGI déprotégé.

SM (MALDI) : 1998.01 (valeur calculée :1998.36)

Procédure utilisée pour la déprotection des peptides.

Les clivages des groupements protecteurs des fonctions portées par les chaînes latérales des molécules peptidiques **4a**, **4b**, **16** et **17** sont réalisés à température ambiante, en traitant le composé avec une solution préparée en dissolvant 0,75g de phénol dans un mélange de TFA (10,0mL), de thioanisole (0,50mL), d'eau (0,50mL) et de TIS (0,25mL). Après trois heures d'agitation, le mélange est concentré à l'évaporateur rotatif. Lorsque le volume est réduit de 95%, l'addition de 50mL d'éther diéthylique (préalablement refroidi sur un bain de glace) provoque la formation d'un précipité. Le solide ainsi formé est recueilli par filtration (sous ciel d'Argon, sur fritté porosité 4), puis lavé à l'éther froid (3 x 20mL). Puis il est séché une nuit, à température ambiante, sous le vide d'une pompe à palettes (sur KOH).

Réacteur utilisé pour les synthèses sur support solide

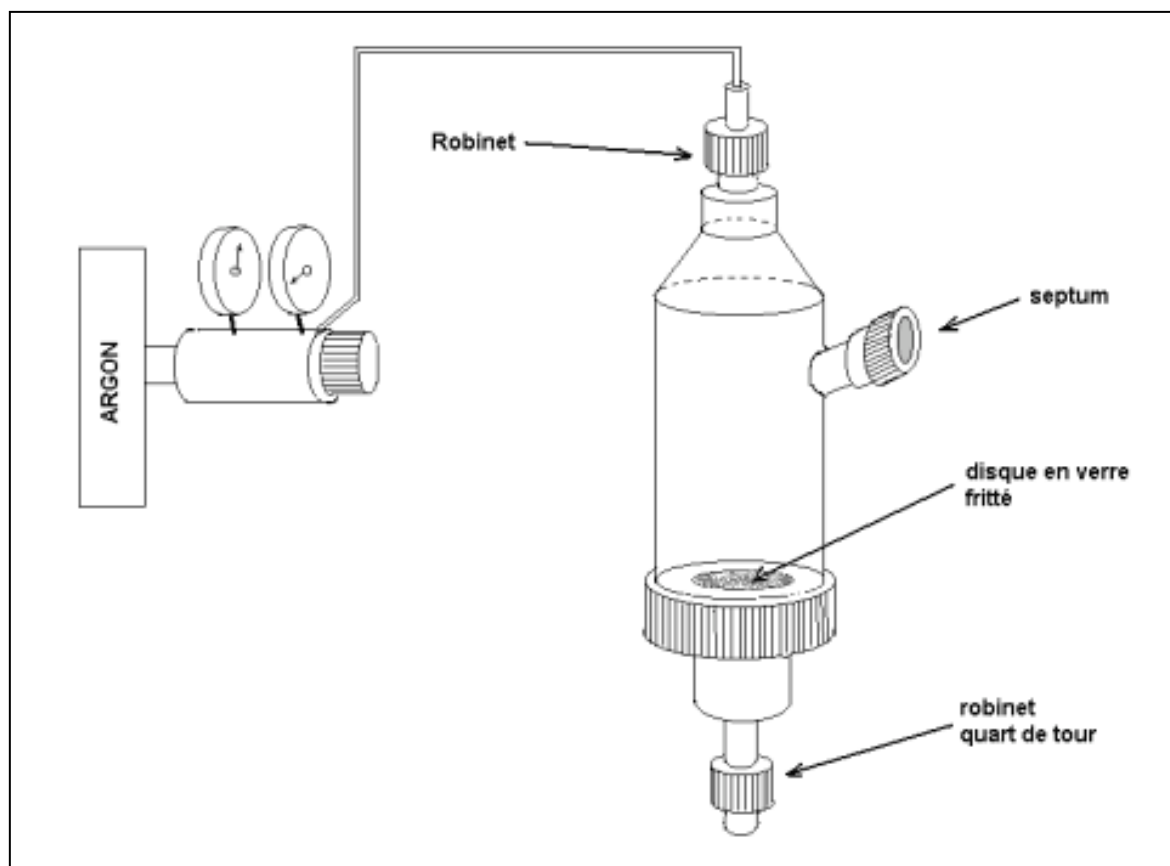
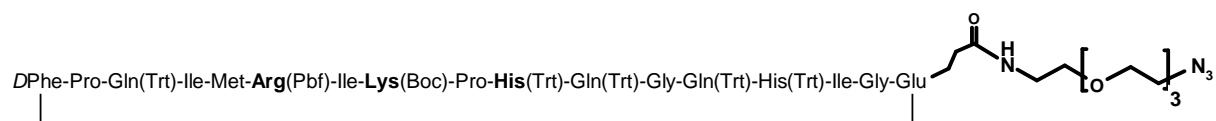


Schéma du réacteur Système 45[®] utilisé pour les étapes de synthèses peptidiques réalisées manuellement.

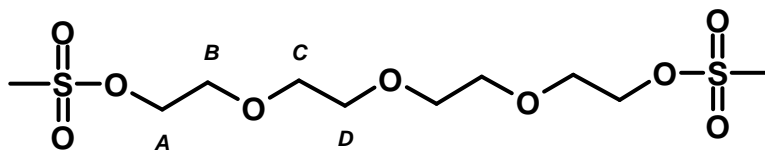
Le réacteur utilisé pour les synthèses sur support solide est constitué d'une enceinte en verre passivé de 20 mL munie à sa base d'un disque en verre fritté associé à un robinet quart de tour. En fonction des besoins, cette ouverture sert à mélanger les réactifs ou à séparer le filtrat. Le mélange étant assuré par bullage d'argon, la filtration se fait sous poussée de ce même gaz, *via* l'ouverture située à l'apex du montage. Le réacteur comporte également une ouverture latérale équipée d'un septum, permettant l'introduction des réactifs.

CycloVEGI protégé et modifié **4b**



Sous Argon, sont additionnés 20,9mg (55,2 μ moles; 0,99 éq.) de HBTU et 23,7mg de HOBt (175,3 μ moles; 3,1 éq.) à une solution de 199,1mg (55,8 μ moles; 1 éq.) de **4a** dans 5mL de NMP anhydre. Lorsque la dissolution des réactifs est complète, 62 μ L (355,9 μ moles ; 6,3 éq.) de DIEA sont introduits. Après 5 minutes d'agitation à température ambiante, 19,9mg (91,0 μ moles; 1,6 éq.) de **7** sont additionnés. Après 48 heures d'agitation à TA, le milieu est concentré à l'évaporateur rotatif. L'addition d'eau froide précipite le produit qui est recueilli par filtration sur fritté (porosité 4). Après une nuit de séchage (sur KOH) sous pression réduite, 194mg de **4b** sont obtenus sous forme d'un solide blanc (94% de la masse théorique). Un échantillon est déprotégé pour analyse MALDI selon le mode opératoire décrit page 153 : la masse trouvée est de 2198,20 ce qui correspond à la masse attendu (2198,60) pour la forme déprotégée du peptide cyclique (**4c**).

1,11-dimésylate de 3,6,9-trioxaundecane 5



Dans un bicol de 500mL, sous vive agitation magnétique, 19,5g (100mmoles; 1éq.) de tétraéthylène glycol, 90mL (646mmoles; 6,46éq.) de triéthylamine et 100mL de DCM sont refroidis à -5°C par un mélange glace/sel (3:1). Au moyen d'une ampoule isobare (surmontée d'une garde de CaCl₂), une solution de 17,0mL (220mmoles; 1,1éq.) de chlorure de mésyle dans 10mL de DCM est additionnée, en goutte à goutte, de manière à ce que la température du mélange ne dépasse pas 10°C. Lorsque l'addition est terminée, le bain réfrigérant est retiré. Après 90 minutes à température ambiante, le mélange est versé (sous vive agitation) dans un erlenmeyer contenant 1 litre d'eau distillée. La phase aqueuse est éliminée par décantation, la phase organique est d'abord lavée avec une solution aqueuse d'HCl à 1M, puis avec une solution aqueuse saturée de NaHCO₃ (3 x 400mL). Après séchage (sur MgSO₄) et filtration sur fritté (porosité 4), le filtrat est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur colonne de silice (20 x 4cm, élution isocratique avec le mélange DCM/MeOH en 95/5). 34,3g du composé **5** sont ainsi obtenus (rendement molaire 98%, huile marron fortement lacrymogène).

R_f = 0,60 (DCM/MeOH: 95/5).

RMN ¹H (400,13MHz, CDCl₃, 25°C) δ en ppm :

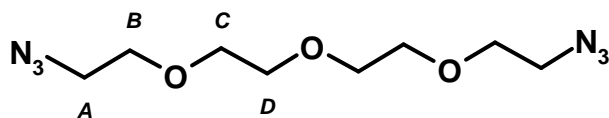
3,08 (s, 6H, **CH**₃), 3,62-3,68 (m, 8H, **H**_C et **H**_D), 3,76 (t, 4H, ³J=4,6 Hz, **H**_B), 4,37 (t, 4H, ³J=4,4 Hz, **H**_A).

RMN ¹³C (100,62MHz, CDCl₃, 25°C) δ en ppm :

37,59 (**CH**₃), 68,94(**C**_A), 69,47(**C**_B), 70,42(**C**_C), 70,55 (**C**_D).

IR (cm⁻¹): 2912, 2873, 1678, 1134.

1,11-diazido- 3,6,9-trioxaundecane 6



Dans un ballon de 500mL équipé d'un réfrigérant surmonté d'une garde à CaCl₂, 34,3g (98mmoles; 1éq.) de **5** sont solubilisés par vive agitation magnétique dans 200mL d'EtOH absolu et 50mL de DMAc. 26,0g (400mmoles, 4éq.) d'azoture de sodium sont alors additionnés, puis le mélange réactionnel est porté au reflux pendant 6 heures. Après refroidissement à température ambiante, le mélange est versé dans un erlenmeyer contenant 200mL d'eau distillée et 200mL de DCM. Après 15 minutes d'agitation, la phase aqueuse est éliminée par décantation. La phase organique est lavée à l'eau distillée (3 x 200mL), puis avec une solution aqueuse saturée de Na₂CO₃ (3 x 200mL). Après séchage (sur MgSO₄) et filtration (sur papier plissé) le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est séché une nuit sous le vide d'une pompe à palettes, sur KOH. 23,90g du composé **6** sont ainsi obtenus (rendement quantitatif, huile translucide).

Rf = 0,67 (DCM/MeOH: 95/5).

RMN ¹H (400,13MHz, CDCl₃, 25°C) δ en ppm :

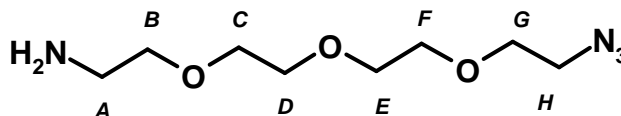
3,39 (t, 4H, ³J=5,16Hz, **H_A**), 3,65-3,69 (m, 12H, **H_B** **H_C** et **H_D**).

RMN ¹³C (100,62MHz, CDCl₃, 25°C) δ en ppm :

50,30 (**C_A**), 69,95(**C_B**) et 70,49 (**C_{C,D}**).

IR (cm⁻¹): 2912, 2873, 2106, 1678, 1134.

1-amino-11-azido- 3,6,9-trioxaundecane 7



Dans un erlenmeyer de 500mL, 10,98g (45mmoles; 1éq.) de **6** sont solubilisés par 150mL d'Et₂O et 20mL de THF sous vive agitation magnétique, puis 200mL d'une solution aqueuse d'HCl à 1M sont introduits. Au moyen d'une ampoule isobare, une solution de 11,84g (45mmoles ; 1éq.) de PPh₃ dans 100mL d'Et₂O est additionnée goutte à goutte sur 60 minutes. L'agitation est maintenue jusqu'à l'arrêt du dégagement d'Azote (environ 120 minutes), puis le mélange est décanté : la phase organique est extraite avec 2x50mL d'HCl 1M. Les phases aqueuses acides réunies sont saturées avec du NaCl, puis rendues basiques (pH=14) par addition de NaOH en pastilles. La phase organique surnageante est récupérée par décantation, puis la phase aqueuse est extraite avec de toluène (3 x 70mL). Les phases organiques réunies sont lavées avec une solution aqueuse saturée de NaCl (2x100mL), puis séchées sur pastilles de KOH. Après élimination du solvant sous pression réduite, le résidu obtenu est purifié par chromatographie éclair sur colonne (20 x 4cm) de silice (*). L'élution est réalisée selon un gradient de polarité, en utilisant le mélange DCM/MeOH (100/0-90/10). Sont ainsi obtenus 6,57g du composé **7** (rendement 67%, huile translucide jaune)

Rf (*) = 0,35 (DCM/méthanol : 90/10).

(*) Silice préalablement neutralisée par migration d'un mélange DCM/Et₃N en 90/10.

RMN ¹H (400,13MHz, CDCl₃, 25°C) δ en ppm :

2.71 (t, 2H, **H_A**); 3.25 (t, 2H, **H_H**); 3.37 (t, 2H, **H_B**); 3.48-3.72 (m, 10H, **H_{C-D-E-F-G}**).

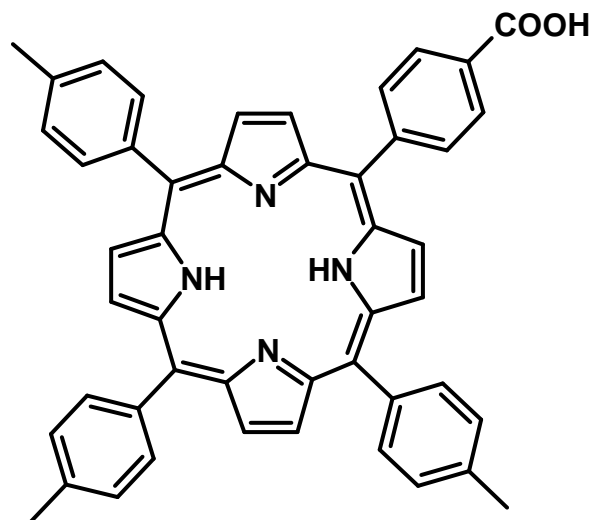
RMN ¹³C (100,62MHz, CDCl₃, 25°C) δ en ppm :

41.2 (**C_A**), 50.3(**C_H**), 69.9-70.3 (**C_{C-D-E-F-G}**), 72.8(**C_B**).

IR (cm⁻¹): 3360; 2909; 2870; 1774; 2110; 1124.

SM (haute résolution): calculée pour C₈H₁₉N₄O₃ (M+H) 219.1457. Trouvée : 219.1462.

5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-tritolylporphyrine **8**



Dans un bicol de 500mL, muni d'un réfrigérant surmonté d'une garde à CaCl₂ et équipé d'une ampoule isobare de 10mL, sont solubilisés 9,73g (9,6mL; 81mmoles; 3éq.) de *para*-tolualdéhyde fraîchement distillé et 4,06g (27mmoles; 1éq.) de 4-carboxybenzaldéhyde dans 300mL d'acide propanoïque par chauffage sous vive agitation magnétique. L'ampoule est alors chargée avec 7,5mL (108mmoles; 4éq.) de pyrrole fraîchement distillé. L'addition est réalisée à l'abri de la lumière, goutte à goutte, en 15 minutes. Le reflux est maintenu pendant encore 90 minutes, puis le mélange réactionnel est refroidi. Après une nuit à +4°C, les porphyrines cristallisées (3,60g) sont recueillies par filtration sur Büchner et lavages à l'éthanol absolu (3x20mL). La purification est réalisée par chromatographie sur colonne de silice (20 x 5cm) éluée selon un gradient de polarité (mélange chloroforme/éthanol absolu : 100/0 - 90/10). Sont ainsi obtenus 800mg du composé **8** (4,2%, cristaux violets).

R_f = 0,53 (chloroforme/éthanol absolu: 90/10).

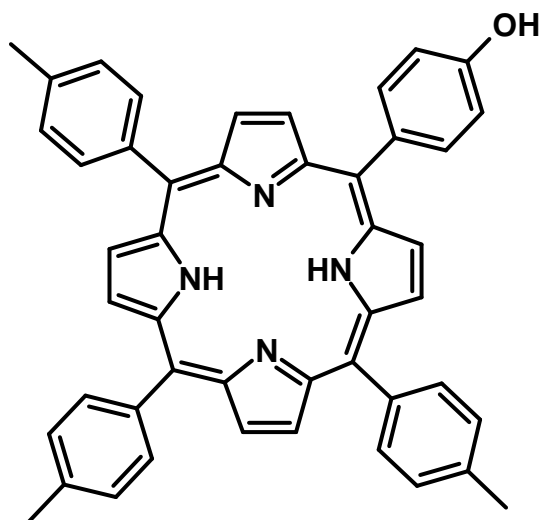
UV-visible [CHCl₃] λ (ε x 10⁻³) : 420(689,3); 517(23,2); 553(10,6); 592(5,1); 648(4,7).

RMN ¹H (400,13 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ (ppm):

-2.77 (br. s, 2 H, NH), 2.71 (s, 9 H, CH₃), 7.55 (d, ³J=7.8 Hz, 2 H, H_{Ar 3,5}), 7.53 (d, ³J= 7.4 Hz, 6 H, 3,5-H_{Tol 3,5}), 8.33 (d, ³J= 7.8 Hz, 2 H, H_{Ar 2,6}), 8.48 (d, ³J= 7.4 Hz, 6 H, H_{Tol 2,6}), 8.78 (d, ³J=4.5 Hz, 2 H, H_{β pyr}), 8.89 (br. s, 6 H, H_{β pyr}).

SM (MALDI): m/z = 701.6 [M + H]⁺.

5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-tritolylporphyrine **9**



Dans un bicol de 500mL muni d'un réfrigérant surmonté d'une garde à CaCl₂, et équipé d'une ampoule isobare de 10mL, 2,8g (22,6mmoles; 1éq.) de 4-hydroxybenzaldéhyde et 8,0mL (68mmoles, 3éq.) de *para*-tolualdéhyde sont solubilisés dans 300mL d'acide propanoïque par chauffage au reflux et vive agitation magnétique. A l'abri de la lumière, 6,3mL (90,6mmoles, 4 éq.) de pyrrole (fraîchement distillé) sont alors additionnés goutte à goutte, sur 15 minutes. Le reflux est maintenu pendant encore 90 minutes, et l'agitation magnétique est poursuivie jusqu'à ce que le mélange soit revenu à température ambiante. Après une nuit à +4°C, les porphyrines cristallisées sont recueillies après filtration sur Büchner et lavées à l'éthanol absolu (3x20mL). La purification est réalisée sur colonne de silice (20 x 5cm, élution isocratique avec le mélange chloroforme/éther de pétrole en 80/20). Sont ainsi obtenus 913mg du composé **9** (5,0%, cristaux violets).

R_f = 0,51 (toluène/acétone: 93/7).

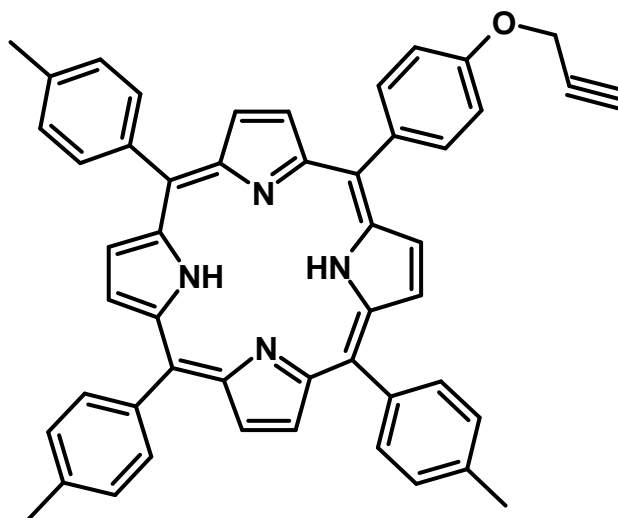
UV-visible [CHCl₃] λ (ε x 10⁻³) : 416(363,0); 516(13,5); 552(7,4); 592(4,0); 648(4,2).

RMN ¹H (400,13 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ (ppm):

-2.76 (br. s, 2 H, NH), 2.69 (s, 9 H, CH₃), 7.15 (d, ³J=8.2 Hz, 2 H, H_{Ar 3,5}), 7.53 (d, ³J=7.7 Hz, 6 H, H_{Tol 3,5}), 8.03 (d, ³J=8.2 Hz, 2 H, H_{Ar 2,6}), 8.08 (d, ³J=7.7 Hz, 6 H, H_{Tol 2,6}), 8.84 (br. s, 6 H, H_{β pyr}), 8.93 (d, ³J=4.4 Hz, 2 H, H_{β pyr}).

SM (MALDI): m/z = 673.6 [M + H]⁺.

5-[4-(3-propynyloxy)-phényl-]-10,15,20-tritolylporphyrine **10**



A l'abri de la lumière, dans un ballon de 10mL muni d'une garde de CaCl₂ 130mg (193μmoles ; 1éq.) de **9** et 140mg (970μmoles; 5éq.) de K₂CO₃ anhydre sont additionnés à 8mL de DMF anhydre sous agitation magnétique. Sont ensuite introduits 110μL (970μmoles; 5éq.) de bromure de propargyle (en solution à 80% dans du toluène). Après 24 heures à température ambiante, le milieu est dilué avec 50mL de chloroforme, lavé à l'eau distillée (3x75mL), puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl (75mL). Après séchage sur MgSO₄ et filtration sur papier, la phase organique est évaporée sous pression réduite pour donner un solide violet. Après chromatographie sur colonne de silice (20 x 5cm, élution isocratique: chloroforme/éther de pétrole en 80/20), 133mg de **10** sont obtenus (rendement molaire 97%, cristaux violets).

R_f = 0,78 (chloroforme).

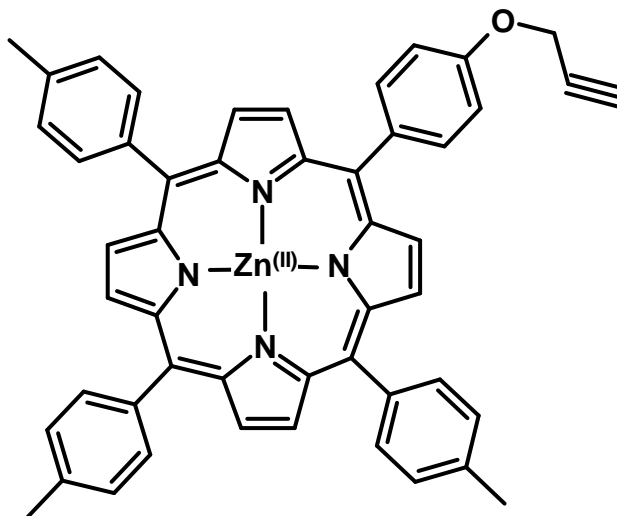
UV-visible [CHCl₃] λ (ε x 10⁻³) : 427(380,2); 526(14,7); 562(8,2); 603(4,8); 659(4,8).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ (ppm):

-2.77 (br. s, 2 H, NH), 2.68 (s, 9 H, CH₃), 4.98 (t, ³J=2,2Hz, O-CH₂ propargyle), 2.68(t, ³J= 2,5Hz, C-H propargyle), 7.15 (d, ³J=8.2 Hz, 2 H, H_{Ar 3,5}), 7.53 (d, ³J=7.7 Hz, 6 H, 3,5-H_{Tol 3,5}), 8.03 (d, ³J=8.2 Hz, 2 H, H_{Ar 2,6}), 8.08 (d, ³J=7.7 Hz, 6 H, H_{Tol 2,6}), 8.84 (br. s, 6 H, H_{β pyr}), 8.93 (d, ³J=4.4 Hz, 2 H, H_{β pyr}).

MALDI : 711,9[M+H]⁺

5-[4-(3-propynyloxyphényl)]-10,15,20-tritolylporphyrinato Zinc **11**

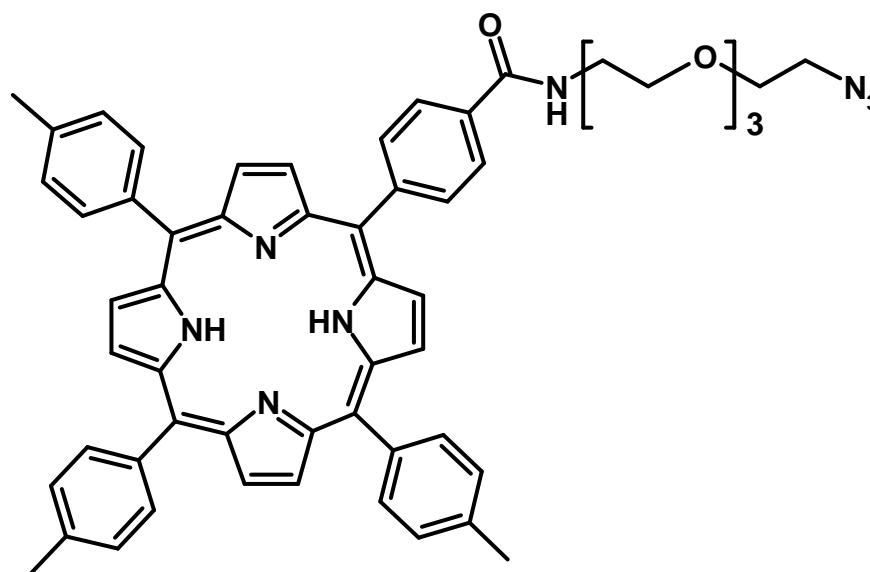


A l'abri de la lumière, dans un ballon de 50mL équipé d'un réfrigérant, 50mg (70 μ moles) de **10** et 56mg (255 μ moles; 3,6 éq.) de diacétate de zinc sont solubilisés dans 25mL de THF sous agitation magnétique. Le mélange est porté au reflux pendant 2 heures, puis évaporé sous pression réduite : le solide obtenu est repris avec du chloroforme (2x20mL). La phase organique est lavée à l'eau distillée (3 x 30mL) puis séchée sur MgSO₄. Après filtration sur papier, et évaporation sous pression réduite, 54mg de **11** sont obtenus (rendement quantitatif, cristaux violets).

R_f =0,77 (chloroforme)

UV-visible [CHCl₃] λ ($\epsilon \times 10^{-3}$) : 425(460,0); 554(15,6); 596(6,2).

5-[4-(amido-3,6,9-trioxaundeca-11-azido)-phényl]-10,15,20-tritolyl-porphyrine **12**



A l'abri de la lumière et sous Argon, dans un ballon de 10mL sont introduits 155mg (221 μ moles ; 1 \acute{e} q.) de **8**, 90mg (442 μ moles ; 2 \acute{e} q.) d'EDC, 38mg (331 μ moles ; 1,5 \acute{e} q.) de NHS et 5mL de chloroforme anhydre. Apr \acute{e} s 45 minutes d'agitation, 100mg (459 μ moles; 2 \acute{e} q.) de **7** sont additionn \acute{e} s au m \acute{e} lange. Le milieu r \acute{e} actionnel est agit \acute{e} pendant 6 heures, dilu \acute{e} avec 15mL de chloroforme, lav \acute{e} \grave{a} l'eau distill \acute{e} e (3 x 20mL), puis avec une solution aqueuse satur \acute{e} e de NaCl (20mL). Apr \acute{e} s s \acute{e} chage sur MgSO $_4$ et filtration sur papier, la phase organique est \acute{e} vacor \acute{e} e sous pression r \acute{e} duite. Le r \acute{e} sidu obtenu est alors purifi \acute{e} sur colonne de silice (20 x 3cm), avec le m \acute{e} lange DCM/MeOH selon un gradient de polarit \acute{e} (99/1 - 90/10). 195mg du compos \acute{e} **12** sont ainsi obtenus (rendement 98%, cristaux violets).

R $_f$ = 0,54 (dichlorom \acute{e} thane/m \acute{e} thanol: 95/5).

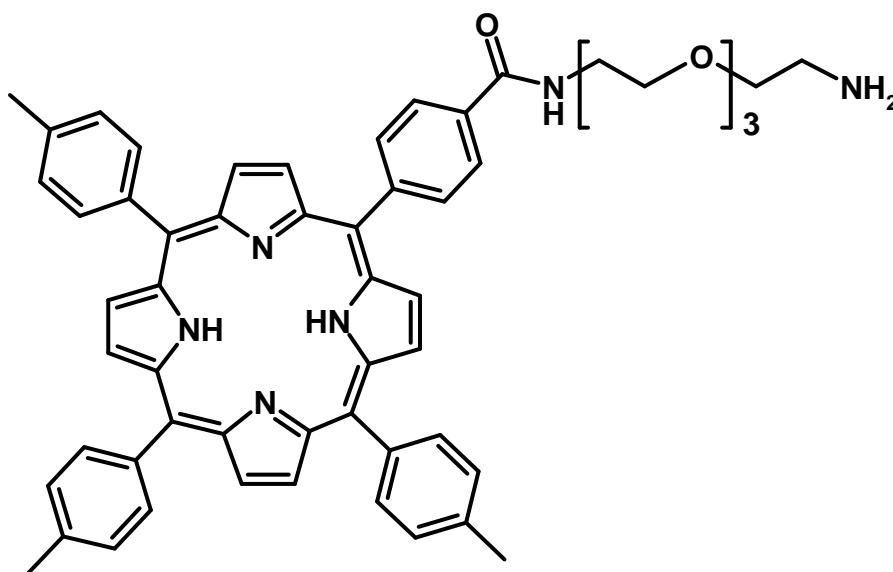
UV-visible [CHCl $_3$] λ ($\epsilon \times 10^{-3}$) : 420 (189.4), 517 (7.6), 552 (4.1), 591 (2.4), 647 (2.3).

RMN 1 H (400 MHz, CDCl $_3$, 25 $^{\circ}$ C) δ (ppm):

-2.77 (br. s, 2 H, NH), 2.70 (s, 9 H, CH $_3$), 3.39 (t, $^3J=5.2$ Hz), 3.48 (t, $^3J=5.2$ Hz), 3.62-3.65 (m, 2H), 3.68-3.70 (m, 2H), 3.72-3.76 (m, 4H), 3.79-3.85 (m, 4H), 7.55 (d, $^3J=7.8$ Hz, 6 H, H $_{\text{Tol } 3,5}$), 8.08 (d, $^3J=7.8$ Hz, 6 H, H $_{\text{Tol } 2,6}$), 8.25 (d, $^3J=8.3$ Hz, 2 H, H $_{\text{Ar } 2,6}$), 8.78 (d, $^3J=4.7$ Hz, 2 H, H $_{\beta \text{ pyr}}$), 8.86 (br. s, 6 H, H $_{\beta \text{ pyr}}$).

SM (MALDI): m/z = 902.10 [M + H] $^+$.

5-[4-(amido-3,6,9-trioxaundeca-11-amino)-phényl]-10,15,20-tritolyl-porphyrine **13**



A l'abri de la lumière, dans un ballon de 10mL, 195mg (216 μ moles; 1 éq.) de **12** et 170mg (650 μ moles; 3 éq.) de triphénylphosphine sont solubilisés par agitation magnétique dans 5mL de chloroforme. Sont ensuite introduits 100 μ L (5,5mmoles) d'eau dans 1mL de THF. Après 6heures d'agitation à température ambiante, le milieu réactionnel est évaporé sous pression réduite. Le résidu solide obtenu est purifié sur une colonne de silice*(20 x 3cm) éluée selon un gradient de polarité, avec le mélange DCM/MeOH (100/0 - 90/10). Sont ainsi obtenus 89mg du composé **13** (rendement de 47%, solide violet).

Rf* = 0,50 (dichlorométhane/méthanol: 90/10).

*Silice préalablement neutralisée par migration d'un mélange DCM/Et₃N en 90/10.

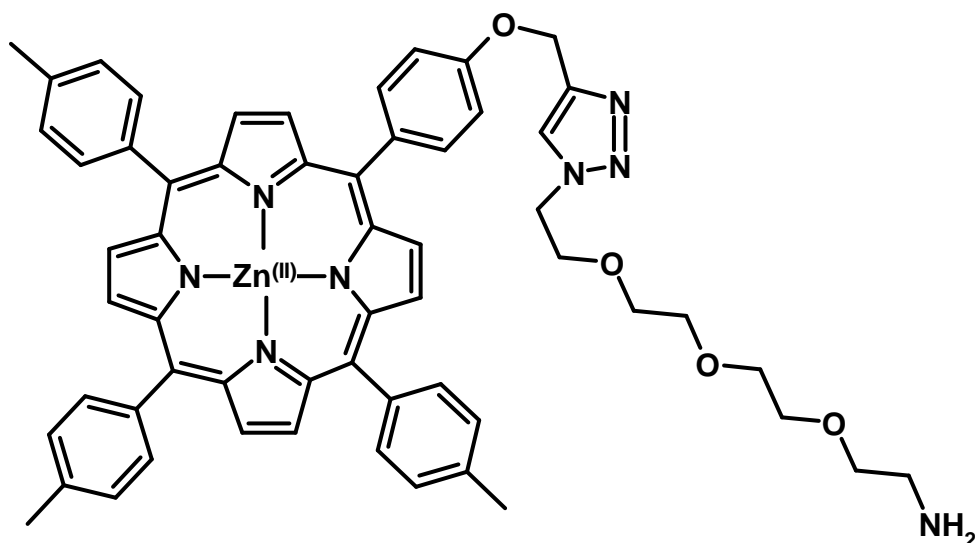
UV-visible [CHCl₃] λ ($\epsilon \times 10^{-3}$) : 420 (185.8), 517 (7.8), 552 (3.8), 591 (2.1), 647 (1.9).

RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃, 25 °C) δ :

-2.77 (br. s, 2 H, NH), 2.70 (s, 9 H, CH₃), 2.81 (br. s, 2H), 3.48 (t, ³J=5.2Hz, 2H), 3.62-3.65 (m, 2H), 3.68-3.70 (m, 2H), 3.72-3.76 (m, 4H), 3.79-3.85 (m, 4H), 4.86 (br. s, 2H) 7.55 (d, ³J=7.8 Hz, 6 H, H_{Tol 3,5}), 8.08 (d, ³J=7.8 Hz, 6 H, H_{Tol 2,6}), 8.25 (d, ³J=8.3 Hz, 2 H, H_{Ar 2,6}), 8.78 (d, ³J=4.7 Hz, 2 H, H _{β pyr}), 8.86 (br. s, 6 H, H _{β pyr}).

SM (MALDI): m/z = 902.10 [M + H]⁺.

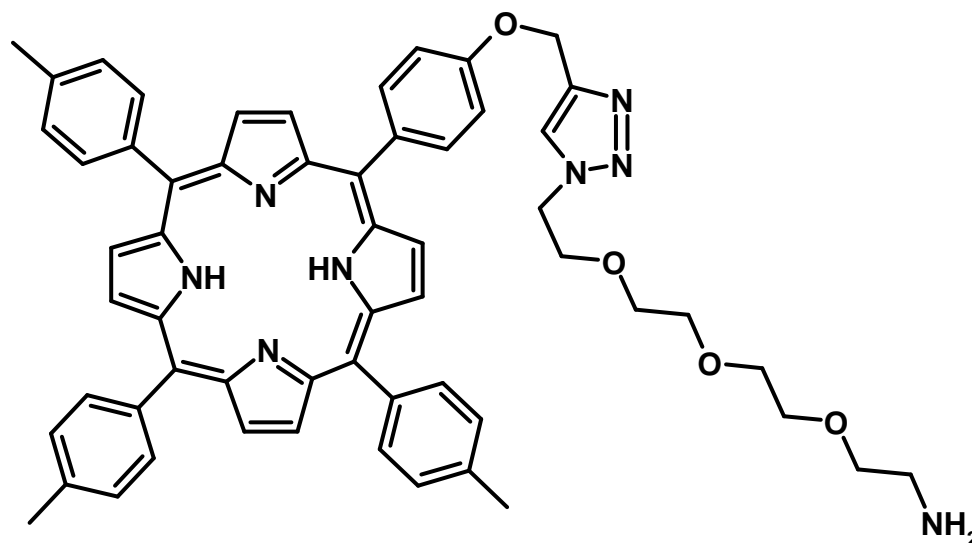
**5-(4[4-méthylènetriazolyl]-3,6,9-trioxa-11-amino-undécaphényl)-
10,15,20-tritolyl-porphyrinato Zinc 14**



Dans le petit réacteur cylindrique de l'appareil *Synthewave 402* sont successivement introduites 70 μ moles de **7** dans 2mL de THF, 35mg (161 μ moles; 2,3 éq.) de **11** dans 1mL de *tert*-butanol, 20mg (98 μ moles; 1,4 éq.) de L-ascorbate de sodium dans 0,2mL d'eau distillée, et enfin, 10mg (40 μ moles; 0,5 éq.) de sulfate de cuivre dans 0,3mL d'eau. Le mélange est alors soumis 2 minutes aux micro-ondes (puissance fixée à 60 Watts). Lorsque le milieu est revenu à température ambiante, 50mL d'eau distillée y sont additionnés, ce qui engendre la précipitation d'un solide violet. Récupéré par filtration (sur fritté porosité 4), le solide est d'abord lavé à l'eau distillée (3 x 20mL), puis avec du méthanol (3 x 20mL), et finalement, avec de l'éther éthylique (3 x 20mL). Après une nuit de séchage sous le vide d'une pompe à palettes (sur KOH), sont obtenus 59mg de **14** (rendement 84%, solide violet).

UV-visible [CHCl_3] λ ($\epsilon \times 10^{-3}$) : 430 (336.1), 562 (27.3), 605 (23.0).

**5-(4[4-méthylènetriazolyl]-3,6,9-trioxa-11-amino-undécaphényl)-
10,15,20-tritolylporphyrine 15**



A température ambiante, une solution de 45mg (45,3 μ moles) de **14** dans 80mL de DCM est vigoureusement agitée avec 16mL d'HCl concentré (12N) pendant deux minutes. Après décantation, la phase organique est lavée, d'abord à l'eau distillée (2 x 80mL) puis avec 50mL d'eau saturée en NaHCO₃. Après séchage sur Na₂SO₄ et évaporation sous pression réduite, 42mg de **15** sont obtenus (rendement quantitatif, solide violet).

Rf = 0,69 (plaque désactivée; éluant : DCM/MeOH 90/10).

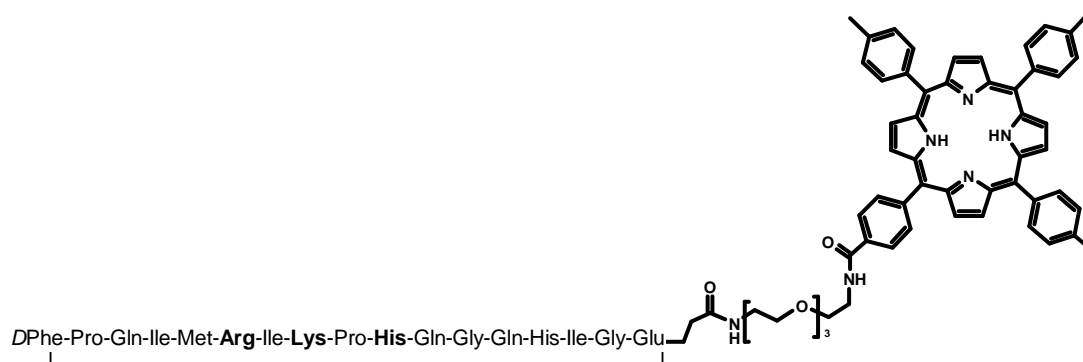
UV-visible [CDCl₃] λ ($\epsilon \times 10^{-3}$) : 420 (572.4), 517 (25.2), 553 (15.0), 592 (8.0), 648 nm (7.5).

RMN ¹H (CDCl₃, 25 °C) δ (ppm):

-2.77 (s. él., 2 H, NH), 2.70 (s, 9 H, CH₃), 2.81 (s. él., 2H), 3.48 (t, ³J=5.0Hz, 2H), 3.62-3.65 (m, 2H), 3.68-3.70 (m, 2H), 3.72-3.76 (m, 4H), 3.79-3.85 (m, 4H), 4.36 (s, 2H), 4.88 (s. él., 2H), 4.98 (t, ³J=2,2Hz, 2H, -O-CH₂-), 7.19 (s, 1H_{triazole}), 7.38 (d, ³J=8.5 Hz, 2 H, H_{Ar 3,5}), 7.55 (d, ³J=7.8 Hz, 6 H, H_{Tol 3,5}), 8.09 (d, ³J=8.5 Hz, 2 H, H_{Ar 2,6}), 8.13 (d, ³J=7.8 Hz, 6 H, H_{Tol 2,6}), 8.84 (s. él., 6 H, H _{β pyr}), 8.92 (d, ³J=4.4 Hz, 2 H, H _{β pyr}).

SM (MALDI): m/z = 930.20 [M + H]⁺.

“TTP.Am.cycloVEGI” (pour TTP.Amido-cycloVEGI) **16**

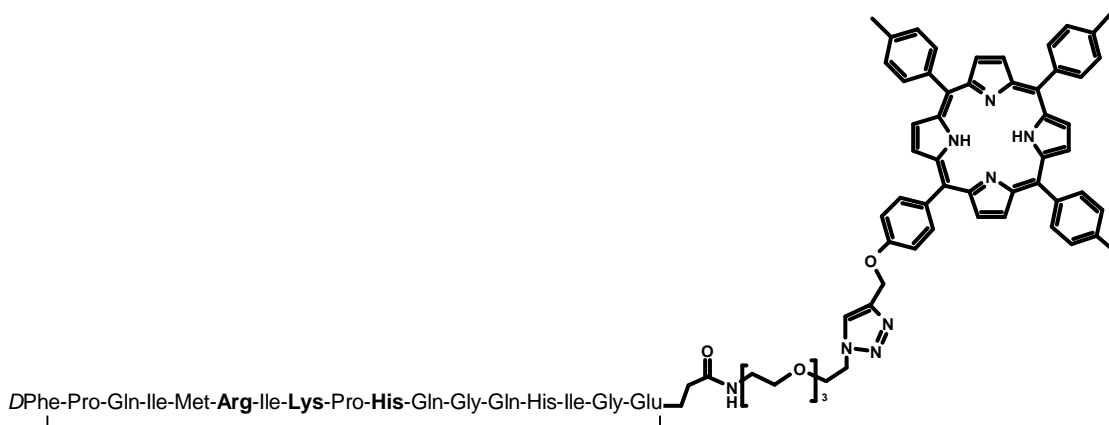


Dans un ballon de 10mL équipé d'une garde de CaCl₂, sous agitation magnétique, sont solubilisés 77mg (21μmoles ; 1éq.) de **4a**, 20mg (110μmoles ; 5éq.) d'EDC et 12mg (110μmoles ; 5éq.) de NHS dans 6mL de CHCl₃ anhydre. Après 30 minutes une solution de 20mg (24μmoles ; 1,1éq.) de **13** dans 3mL de CHCl₃ anhydre est additionnée au mélange, à l'abri de la lumière. L'avancement de la réaction est suivi par CCM : après 36 heures, la réaction est achevée. Le mélange est alors dilué avec 30mL de CHCl₃, lavé avec de l'eau (3x30mL) puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl (2x30mL). Après séchage sur K₂CO₃ et filtration sur papier, l'évaporation du chloroforme (sous pression réduite) permet d'obtenir 96mg d'un solide pourpre. Ce résidu est déprotégé selon la procédure décrite page 153, puis purifié par RP-HPLC. Au débit de 4mL/min, l'élution est réalisée selon un gradient de polarité, en trois paliers : ainsi le mélange A/B est initialement utilisé en 60/40 pendant 10 minutes, puis en 50/50 (10 minutes) et finalement en 0/100 (15 minutes). Après lyophilisation, 14mg de **16** sont obtenus (rendement 23%, solide violet).

SM (MALDI) : 2855,67 (masse calculée : 2855,45)

UV-visible [eau] λ (ε x 10⁻³) : 438 (181,1), 519 (6,7), 556 (3,0), 589 (1,9), 646 nm (1,4).

“TTP.Triaz.cycloVEGI” (pour TTP.Triazolyle-cycloVEGI) **17**

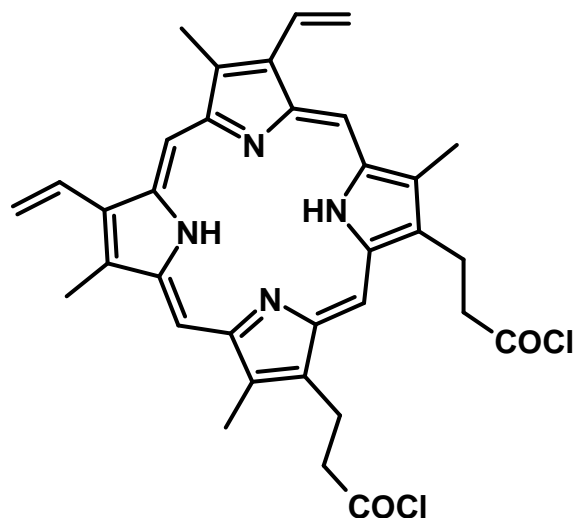


Dans un ballon de 10mL muni d'un barreau aimanté et équipé d'une garde de CaCl₂, sont solubilisés 77mg (21μmoles ; 1éq.) de **4a**, 20mg (110μmoles ; 5éq.) d'EDC et 12mg (110μmoles ; 5éq.) de NHS dans 6mL de CHCl₃ anhydre. Après 30 minutes d'agitation à température ambiante, 25mg (24μmoles ; 1,1éq.) de **15** solubilisés dans 3mL de CHCl₃ anhydre sont additionnés au mélange, à l'abri de la lumière. L'avancement de la réaction est suivi par CCM : après 40 heures d'agitation, la réaction est achevée. Le mélange est alors dilué avec 30mL de CHCl₃, lavé avec de l'eau (3x30mL) puis avec une solution aqueuse saturée de NaCl (2x30mL). Après séchage sur K₂CO₃ et filtration sur papier. L'évaporation du chloroforme (sous pression réduite) permet d'obtenir 110mg d'un solide pourpre qui est traité selon la procédure décrite page 153, puis purifié par RP-HPLC. Au débit de 4mL/min, l'élution est réalisée selon un gradient de polarité, en trois paliers : ainsi le mélange A/B est initialement utilisé en 60/40 pendant 10 minutes, puis en 50/50 (10 minutes) et finalement en 0/100 (15 minutes). Après lyophilisation, 19mg du composé **17** sont obtenus (rendement 26%, solide violet).

SM (MALDI) : 2909,54 (masse calculée : 2909,49)

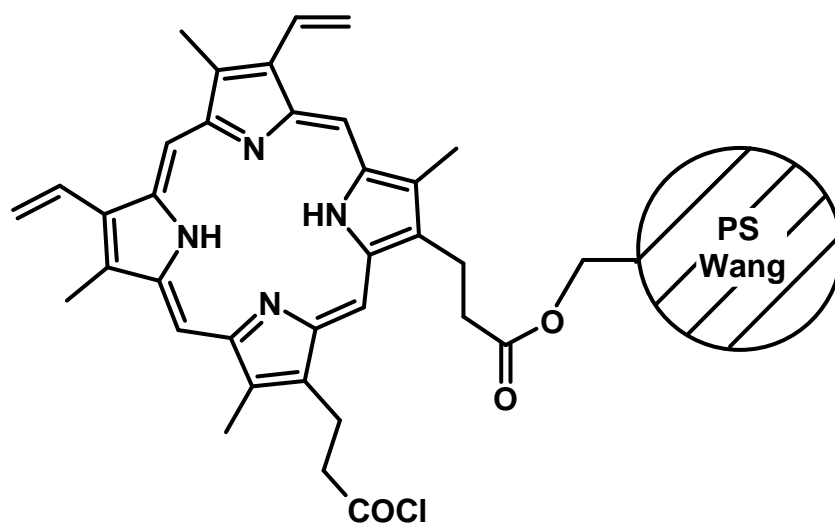
UV-visible [CDCl₃] λ (ε x 10⁻³) : 431 (334,3), 517 (19,8), 554 (12,4), 592 (6,7), 655 (6,0).

Bis - chlorure de protoporphyrinoyle **18**



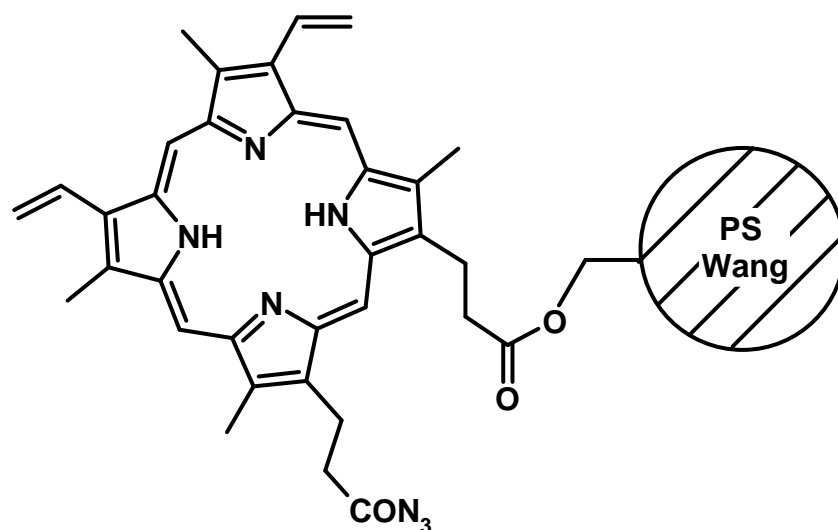
A l'abri de la lumière, dans un ballon de 25mL équipé d'un réfrigérant surmonté d'une garde à CaCl₂, 363mg (645μmoles) de protoporphyrine IX sont solubilisés par 10mL de chlorure de thionyle. Après 6 heures d'agitation à température ambiante, l'excès de chlorure de thionyle est éliminé à l'évaporateur rotatif, puis le résidu solide obtenu est séché 3 heures dans un dessiccateur sur P₂O₅, sous le vide d'une pompe à palettes . Sont ainsi obtenus 411mg de **18** (rendement quantitatif, solide pourpre). Fortement sensible à la lumière et à l'humidité, cet intermédiaire synthétique est engagé tel quel dans l'étape suivante.

Composé 19



Dans un ballon de 50mL muni d'une garde à CaCl₂, 130mg de résine de Wang (fonctionnalisée à 1,1mmoles/g) sont gonflés pendant 30 minutes avec 15mL de DCM anhydre et 1mL (12mmoles) de pyridine anhydre. A l'abri de la lumière, sous agitation magnétique, une solution de 411mg (645μmoles) de **18** dans 15mL de DCM anhydre est additionnée à la résine, sous agitation manuelle. Après 4 heures à température ambiante, le mélange est filtré par poussée d'Argon sur fritté porosité 3. Après lavages au DCM anhydre (3 x 15mL) et séchage sous le vide d'une pompe à palettes, 547mg de **19** sont obtenus (résine de couleur pourpre). Fortement sensible à la lumière et à l'humidité, cet intermédiaire synthétique est engagé tel quel dans l'étape suivante.

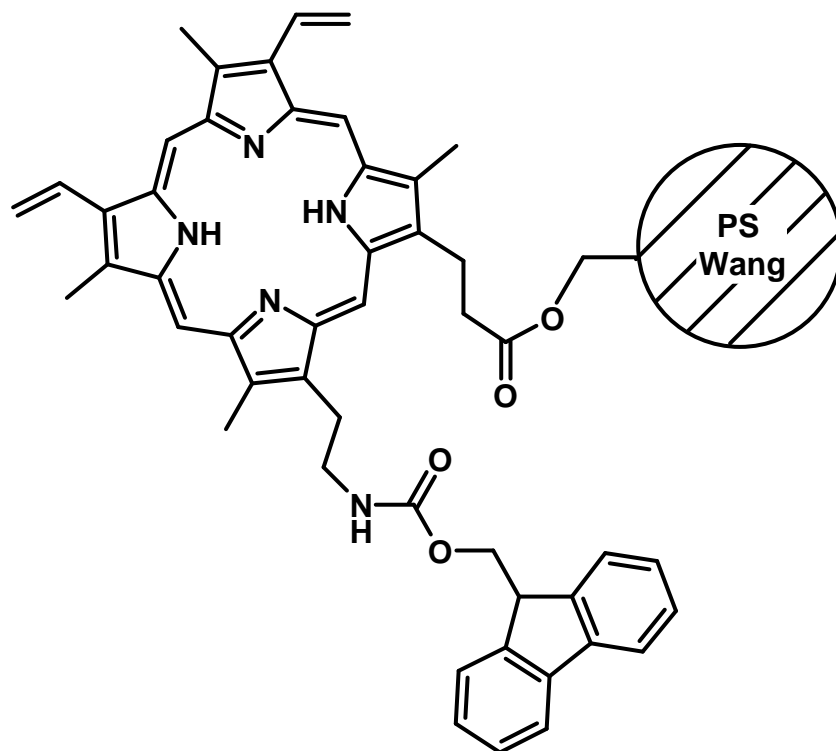
Composé 20



A l'abri de la lumière, dans un ballon de 25mL équipé d'un réfrigérant surmonté d'une garde à CaCl₂, 280mg de **19** sont ajoutés à une solution de 195mg (3mmoles) d'azoture de sodium dans 15mL de DMF anhydre. Le ballon est ensuite chauffé par un bain d'huile à 85°C pendant une nuit. Lorsque le milieu réactionnel est refroidi à température ambiante, la résine est récupérée par filtration sur fritté porosité 3, puis lavée successivement avec les solvants suivants : DMF (3 x 30mL), MeOH (3 x 30mL), DCM (3 x 30mL), et finalement MeOH (1x30mL). Après une nuit de séchage dans un dessiccateur sur KOH, sous le vide d'une pompe à palettes, 340mg de **20** sont obtenus (résine pourpre).

IR : La bande caractéristique (2104 cm⁻¹) des fonctions azoture d'acyle est observée.

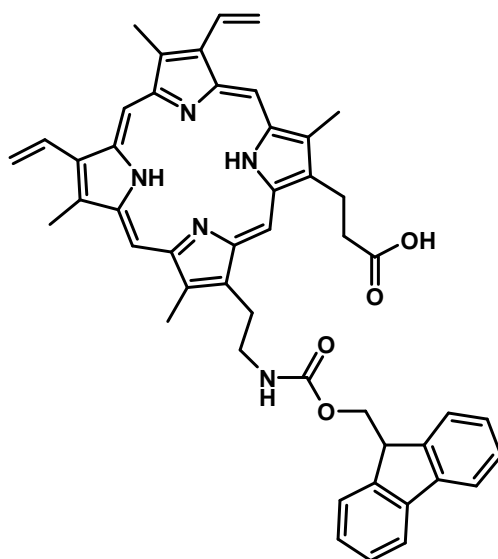
Composé 21



Sous Argon, à l'abri de la lumière, dans un ballon de 25mL muni d'un réfrigérant, 125mg de **20** sont additionnés à une solution de 300mg (1,5mmoles ; 10éq.) de 9-fluorèneméthanol dans 15mL de toluène anhydre. Le mélange est porté au reflux pendant 10 heures, puis il est refroidi à température ambiante. Par filtration sur fritté porosité 3, la résine est récupérée puis lavée successivement avec du toluène (4 x 20mL), du DCM (3 x 20mL), et avec 20mL de MeOH. Après une nuit sous le vide d'une pompe à palettes (sur KOH), 135mg de **21** sont obtenus.

Le taux de fonctionnalisation est alors déterminé selon la procédure de dosage spectrophotométrique détaillée page 150, ce qui permet d'établir un taux de 0,44mmole/gramme, ce qui correspond à un rendement global de 40% sur trois étapes.

2,4-bis éthényl- 6-(2-carboxyéthyl)-7-(2-amino-[9-méthylène fluorényl-carbonyloxy] éthyl)- 1,3,5,8- tétraméthylporphyrine **22**



Dans un ballon de 50mL, 83mg de **21** sont agités dans 20mL d'un mélange TFA/DCM/TIS (50/49/1) pendant 4 heures, à l'abri de la lumière. Le mélange est ensuite filtré sur fritté porosité 4 et la résine rincée avec 2 x 10mL de TFA. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à ce que son volume soit réduit à environ 2mL. Par l'addition de 30mL d'éther éthylique un solide pourpre précipite. Après filtration sur fritté porosité 4, le solide obtenu est rincé par 4 x 20mL d'éther diéthylique. Après une nuit dans un dessiccateur garni de KOH, sous le vide d'une pompe à palettes, 8mg de **22** (9,9 μ moles) sont obtenus (rendement décrochage 27%).

Rf = 0,33 (DMF/TFA/eau : 8/1/1).

UV-visible [DMF] λ ($\epsilon \times 10^{-3}$) : 409,6 (90,8) 506,8 (9,6) 542,9 (7,5) 576,0 (5,7) 630,6 (2,9).

RMN ^1H (DMSO d_6)

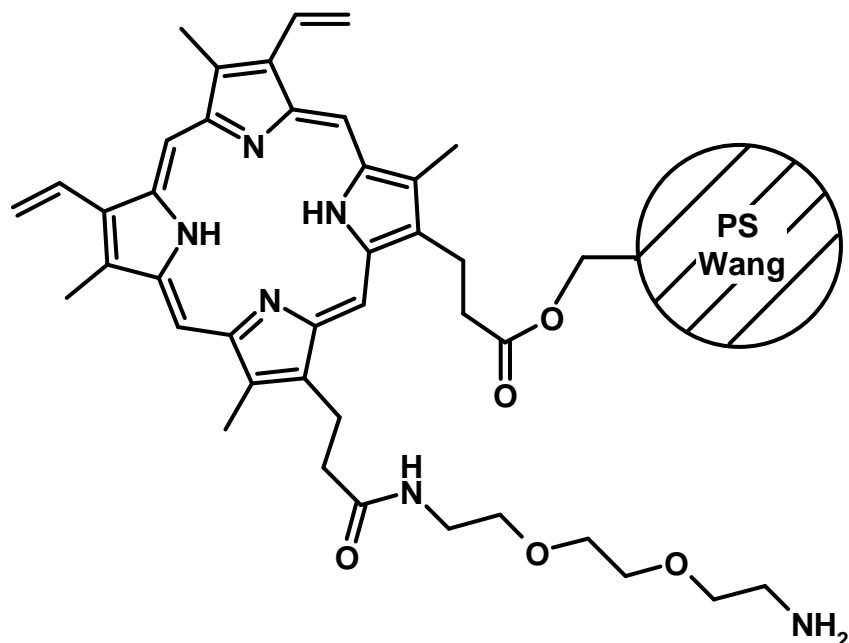
-3,8ppm (s. él., 2H, NH pyrroliques) ; 3,5-4,3ppm (m, 8H, H bras alkyles) ; 3,6ppm (s, 9H, CH₃ β -pyrroliques) ; 6,17ppm (d.d., $J=11,5-1,5\text{Hz}$; 2H, CH₂ vinyliques) ; 6,19ppm (d.d., $J=11,5-1,5\text{Hz}$; 2H, CH₂ vinyliques) ; 6,36ppm (d.d., $J=17,8-1,5\text{Hz}$; 2H, CH₂ vinyliques) ; 6,37ppm (d.d., $J=17,8-1,5\text{Hz}$; 2H, CH₂ vinyliques) ; 7,66ppm (d, $J=7,5\text{Hz}$; 6H, H aryliques 1,8 ; 2,7 et 3,6) ; 7,86ppm (d, $J=7,5\text{Hz}$; 2H, H aryliques 4,5) ; 8,05ppm (d.d., $J=11,5-17,8\text{Hz}$; 2H, CH vinyliques) ; 10,16ppm (s, 1H, H *méso*-) ; 10,21ppm (s, 1H, H *méso*-) ; 10,27ppm (s, 1H, H *méso*-) ; 10,29ppm (s, 1H, H*méso*).

RMN ^{13}C (DMSO d_6)

11,5ppm C méthyles β -pyrroliques ; 21,8 et 36,9ppm C bras alkyles ; 46,6ppm carbone tertiaire C₉ ; 65,6ppm CH₂ Fmoc ; 97ppm C *méso* ; 120,4ppm pour C_{1 et 8} ; 125,4ppm pour C_{4 et 5} ; 127,0ppm pour C_{2 et 7} ; 127,7ppm pour C_{3 et 6} ; 136-148ppm C α et β pyrroliques ; 144,1ppm pour C_{8a, 9a} ; 140,8ppm pour les C_{4a, 5a} ; 157,2ppm COO *carbamate*

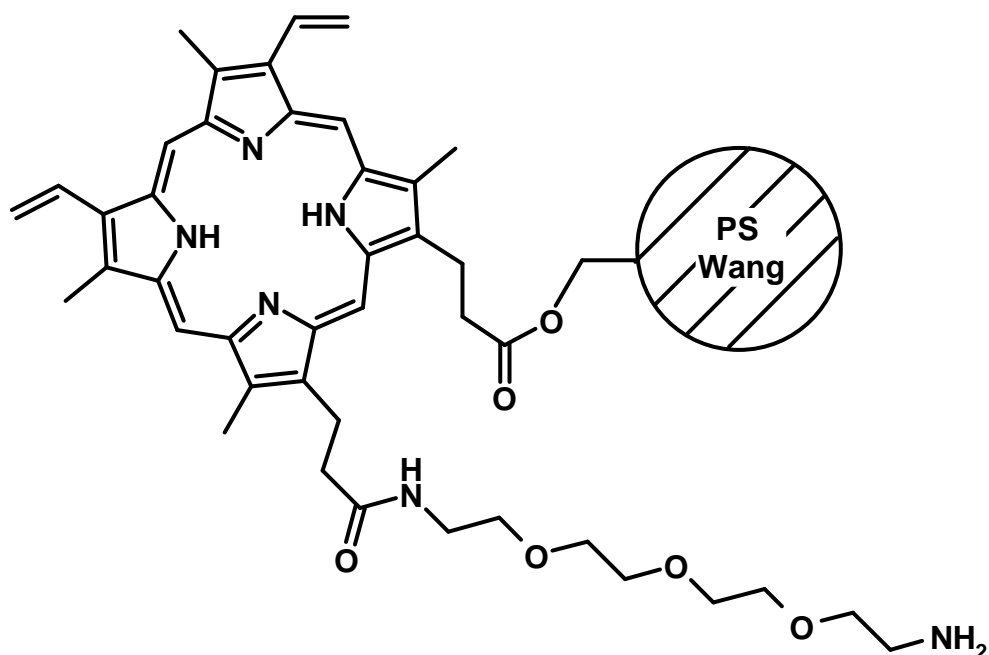
SM (MALDI) : 756,81 (M+H)⁺.

Composé 24a



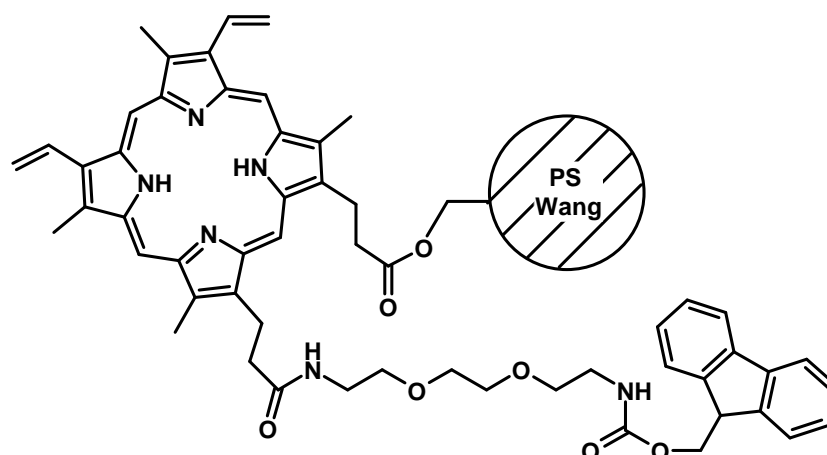
Dans un ballon de 10mL placé sous Argon et à l'abri de la lumière, 318mg (565 μ moles; 1 éq.) de protoporphyrine IX sont solubilisés dans 5mL de NMP anhydre. Alors 600 μ L (3,4mmoles) de DIEA, 210mg (1,7mmoles; 3 éq.) de DMAP et 795mg (1,7mmoles ; 3 éq.) de PyBrOP sont successivement introduits. Après 4 heures d'agitation magnétique à température ambiante, le mélange est additionné à 500mg (0,55mmoles théoriques) de résine Wang préalablement gonflée dans 1mL de NMP anhydre. Le milieu est alors soumis aux micro-ondes (150W) pendant 7 minutes. Après refroidissement à température ambiante, 500 μ L (3,4mmoles; 6 éq.) de 1,8-diamino-diéthylène glycol sont introduits, puis le mélange est une nouvelle fois chauffé par micro-ondes (150W) pendant 7 minutes. Le mélange est ensuite filtré sur fritté porosité 4. Après lavages par bullage avec 4 x 20 mL de NMP anhydre, et 4 x 20 mL de chloroforme anhydre, le composé attendu est séché une nuit sous le vide d'une pompe à palettes.

Composé 24b



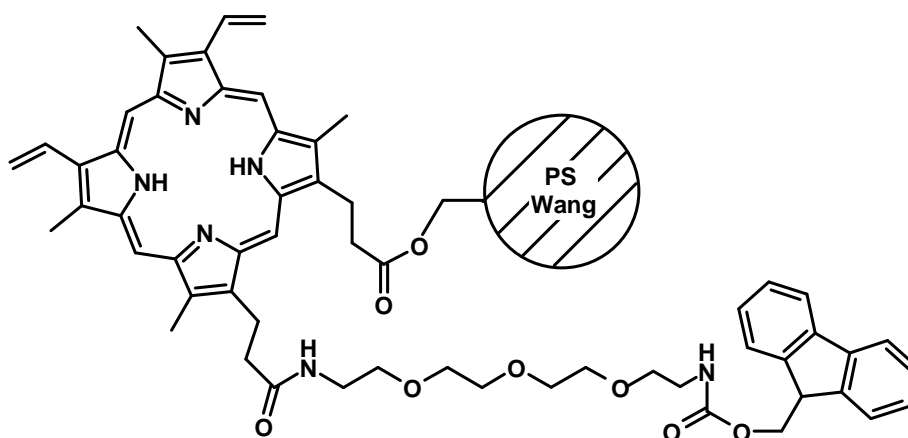
Dans un ballon de 10mL placé sous Argon et à l'abri de la lumière, 318mg (565 μ moles; 1 éq.) de protoporphyrine IX sont solubilisés dans 5mL de NMP anhydre. Alors 600 μ L (3,4mmoles) de DIEA, 210mg (1,7mmoles; 3 éq.) de DMAP et 795mg (1,7mmoles ; 3 éq.) de PyBrOP sont successivement introduits. Après 4 heures d'agitation magnétique à température ambiante, le mélange est additionné à 500mg (0,55mmoles théoriques) de résine Wang préalablement gonflée dans 1mL de NMP anhydre. Le milieu est alors soumis aux micro-ondes (150W) pendant 7 minutes. Après refroidissement à température ambiante, 653mg (3,4mmoles; 6 éq.) de 1,11-diamino-triéthylène glycol sont introduits, puis le mélange est une nouvelle fois chauffé par micro-ondes (150W) pendant 7 minutes. Le mélange est ensuite filtré sur fritté porosité 4. Après lavages par bullage avec 4 x 20 mL de NMP anhydre, et 4 x 20 mL de chloroforme anhydre, le composé attendu est séché une nuit sous le vide d'une pompe à palettes.

Composé 25a



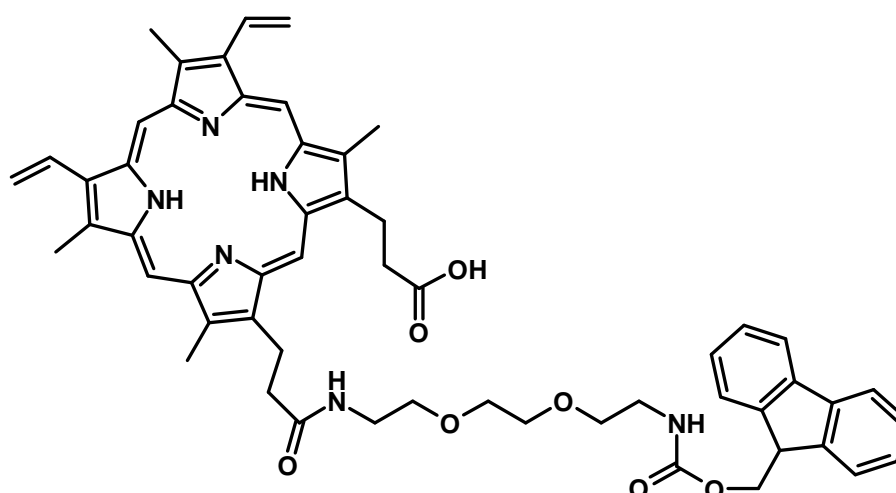
72mg de **24a** sont agités avec 97mg (288 μ moles) de FmocOSu dans 10mL de chloroforme anhydre pendant 3 heures, sous Argon, à l'abri de la lumière. Après lavages (par bullage) avec 4 x 20 mL de chloroforme et séchage une nuit sous le vide d'une pompe à palettes, 91mg de **25a** sont obtenus. Le taux de fonctionnalisation est alors déterminé selon la procédure de dosage spectro-photométrique détaillée page 150, ce qui permet d'établir un taux de 0,71mmole/gramme, ce qui correspond à un rendement global de 65% sur trois étapes.

Composé 25b



87mg de **24b** sont agités avec 119mg (353 μ moles) de FmocOSu dans 10mL de chloroforme anhydre pendant 3 heures, sous Argon, à l'abri de la lumière. Après lavages (par bullage) avec 4 x 20 mL de chloroforme et séchage une nuit sous le vide d'une pompe à palettes, 116mg de **25b** sont obtenus. Le taux de fonctionnalisation est alors déterminé selon la procédure de dosage spectro-photométrique détaillée page 150, ce qui permet d'établir un taux de 0,76mmole/gramme, ce qui correspond à un rendement global de 69% sur trois étapes.

Composé 26a



A l'abri de la lumière, dans un ballon de 50mL, 79mg de **25a** sont agités pendant 4 heures dans 20mL d'un mélange TFA/DCM/TIS (50/49/1). Le mélange est ensuite filtré sur fritté porosité 4 et la résine est rincée avec 2x10mL de TFA. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à ce que son volume soit réduit à environ 2mL. L'addition de 30mL d'éther éthylique engendre la précipitation d'un solide pourpre. Après filtration sur fritté porosité 4, le solide obtenu est rincé avec 4 x 20mL de chloroforme, puis séché une nuit sous le vide d'une pompe à palettes sur KOH. 5mg (5,5 μ moles) de **26a** sont ainsi obtenus (rendement 9,8%).

Rf = 0,30 (DMF/TFA/eau : 8/1/1).

UV-visible [DMF] λ ($\epsilon \times 10^{-3}$): 390,5 (111,8), 490,9 (5,5), 523,3 (4,9), 569,8 (4,3), 621,0 (2,0)

RMN ¹H (DMSO d₆)

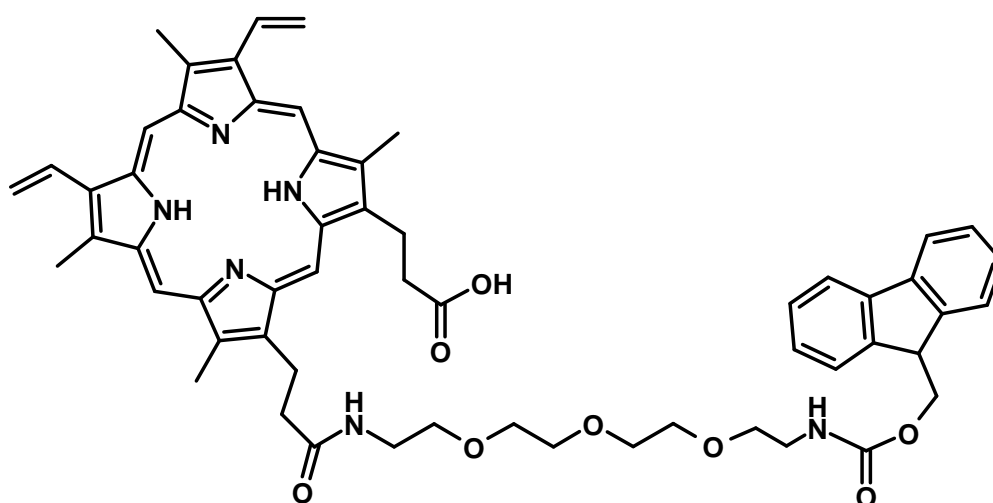
-3,8ppm (s. él., 2H, NH pyrroliques) ; 3,5-4,3ppm (m, 8H, H bras alkyles) ; 3,6ppm (s, 9H, CH₃ β -pyrroliques) ; 3,39ppm (m, 2H, Ha) ; 3,49ppm (m, 2H, Hh) ; 3,68-3,85ppm (m, 8H, Hb, c, d, e) ; 4,1ppm (s, 1H, NHCO) ; 6,17ppm (d.d., $J=11,5-1,5$ Hz ; 2H, CH₂ vinyliques) ; 6,19ppm (d.d., $J=11,5-1,5$ Hz ; 2H, CH₂ vinyliques) ; 6,36ppm (d.d., $J=17,8-1,5$ Hz ; 2H, CH₂ vinyliques) ; 6,37ppm (d.d., $J=17,8-1,5$ Hz ; 2H, CH₂ vinyliques) ; 7,66ppm (d, $J=7,5$ Hz ; 6H, H aryliques 1,8 ; 2,7 et 3,6) ; 7,86ppm (d, $J=7,5$ Hz ; 2H, H aryliques 4,5) ; 8,05ppm (d.d., $J=11,5-17,8$ Hz ; 2H, CH vinyliques) ; 10,16ppm (s, 1H, H méso-) ; 10,21ppm (s, 1H, H méso-) ; 10,27ppm (s, 1H, H méso-) ; 10,29ppm (s, 1H, Hméso).

RMN ¹³C (DMSO d₆)

11,5ppm C méthyles β -pyrroliques ; 21,8 et 36,9ppm C bras alkyles ; 40,1ppm C_a ; 41,6ppm C_f ; 46,6ppm C_g ; 65,6ppm CH₂ Fmoc ; 70,6ppm C_{b, c, d} ; 73,2ppm C_e ; 97ppm C méso ; 120,4ppm C_{1 et 8} ; 125,4ppm C_{4 et 5} ; 127,0ppm C_{2 et 7} ; 127,7ppm C_{3 et 6} ; 136-148ppm C α et β pyrroliques ; 144,1ppm C_{8a, 9a} ; 140,8ppm C_{4a, 5a} ; 157,2ppm COO carbamate ; 170,4ppm CO amide.

SM (MALDI) : 916,09 (M+H)⁺.

Composé 26b



A l'abri de la lumière, dans un ballon de 50mL, 91mg de **25b** sont agités pendant 4 heures dans 20mL d'un mélange TFA/DCM/TIS (50/49/1). Le mélange est ensuite filtré sur fritté porosité 4 et la résine est rincée avec 2x10mL de TFA. Le filtrat est concentré à l'évaporateur rotatif jusqu'à ce que son volume soit réduit à environ 2mL. L'addition de 30mL d'éther éthylique engendre la précipitation d'un solide pourpre. Après filtration sur fritté porosité 4, le solide obtenu est rincé par 4x20mL de chloroforme, puis séché une nuit sur KOH sous le vide d'une pompe à palettes. 8mg (8,1 μ moles) de **26b** sont ainsi obtenus (rendement 11,7%).

Rf = 0,26 (DMF/TFA/eau : 8/1/1).

UV-visible [DMF] λ ($\epsilon \times 10^{-3}$): 390,5 (109,7), 490,9 (5,2), 523,3 (4,8), 569,8 (4,8), 621,0 (2,6)

RMN ^1H , DMSO d_6 , δ en ppm:

-3,8ppm (s. él., 2H, NH pyrroliques) ; 3,49ppm (m, 2H, H h) ; 3,5-4,3ppm (m, 8H, H bras alkyles) ; 3,6ppm (s, 9H, CH $_3$ β -pyrroliques) ; 3,68-3,85ppm (m, 12H, H b, c, d, e, f, g) ; 4,1ppm (s, 1H, NHCO) ; 6,17ppm (d.d., $J=11,5-1,5\text{Hz}$; 2H, CH $_2$ vinyliques) ; 6,19ppm (d.d., $J=11,5-1,5\text{Hz}$; 2H, CH $_2$ vinyliques) ; 6,36ppm (d.d., $J=17,8-1,5\text{Hz}$; 2H, CH $_2$ vinyliques) ; 6,37ppm (d.d., $J=17,8-1,5\text{Hz}$; 2H, CH $_2$ vinyliques) ; 7,66ppm (d, $J=7,5\text{Hz}$; 6H, H aryliques 1,8 ; 2,7 et 3,6) ; 7,86ppm (d, $J=7,5\text{Hz}$; 2H, H aryliques 4,5) ; 8,05ppm (d.d., $J=11,5-17,8\text{Hz}$; 2H, CH vinyliques) ; 10,16ppm (s, 1H, H méso-) ; 10,21ppm (s, 1H, H méso-) ; 10,27ppm (s, 1H, H méso-) ; 10,29ppm (s, 1H, Hméso).

RMN ^{13}C (DMSO d_6)

11,5ppm C méthyles β -pyrroliques ; 21,8 et 36,9ppm C bras alkyles ; 40,1ppm C $_a$; 41,6ppm C $_h$; 46,6ppm C $_9$; 65,6ppm CH $_2$ Fmoc ; 70,6ppm C $_{b, c, d, e}$; 73,2ppm C $_g$; 97ppm C $_{\text{méso}}$; 120,4ppm C $_{1 \text{ et } 8}$; 125,4ppm C $_{4 \text{ et } 5}$; 127,0ppm C $_{2 \text{ et } 7}$; 127,7ppm C $_{3 \text{ et } 6}$; 136-148ppm C $_{\alpha \text{ et } \beta \text{ pyrroliques}}$; 144,1ppm C $_{8a, 9a}$; 140,8ppm C $_{4a, 5a}$; 157,2ppm COO carbamate ; 170,3ppm CO amide.

SM (MALDI) : 960,10 (M+H) $^+$.

ANNEXES

ANNEXE I

L'utilisation des micro-ondes en synthèse organique : une méthodologie propre, performante et économique ¹⁶⁹

Les micro-ondes sont des ondes électromagnétiques, dont la longueur d'onde se situe dans le spectre électromagnétique entre l'infrarouge (1cm) et les ondes radio (1m). Depuis une vingtaine d'années, au laboratoire comme à l'échelle industrielle, leur utilisation en synthèse organique est en essor constant. L'irradiation par micro-ondes est une méthodologie d'activation efficace, rapide, propre et peu consommatrice en énergie comparée à l'activation thermique par chauffage classique. Quand elle est couplée aux techniques de réactions sans solvant, l'irradiation par micro-onde conduit à de nettes améliorations et à une simplification des procédés par rapport aux méthodes classiques : cela en fait une méthode de choix en matière de coût et de protection de l'environnement.

Le chauffage dans un four à micro-ondes

Phénomène physique (figure AI)

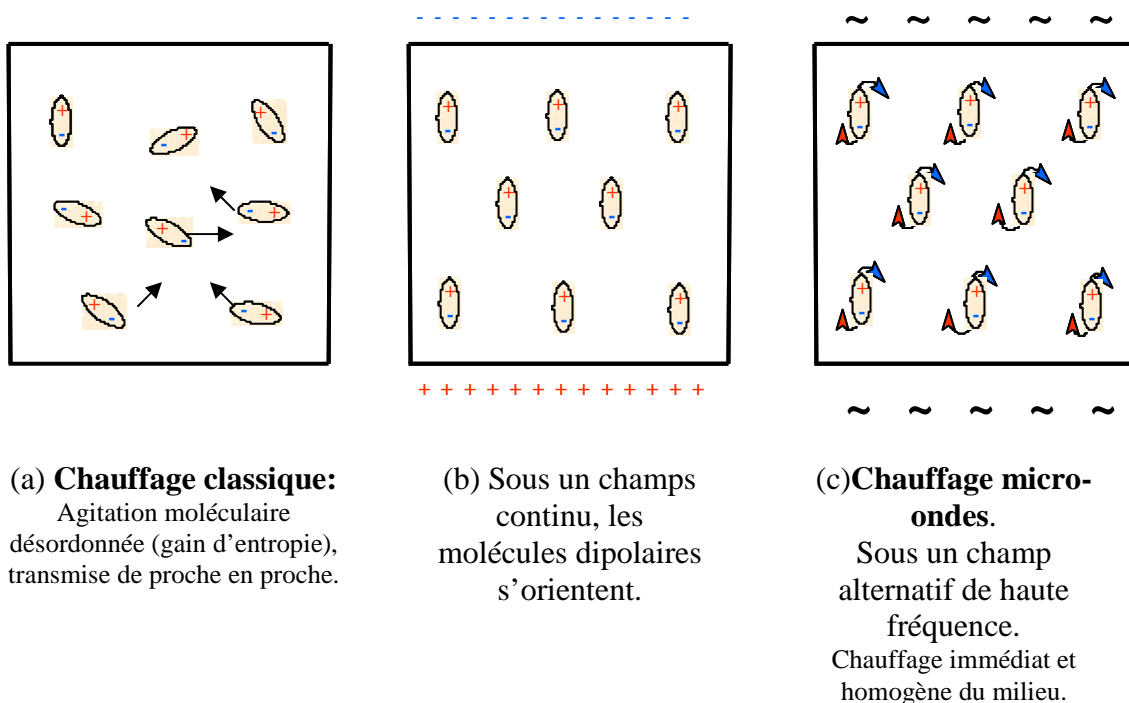


Figure AI : Chauffage classique et par micro-ondes : schématisation du phénomène physique.

¹⁶⁹ A. Loupy, A. Haudrechy, *Méthodes et Techniques de la Chimie Organique*, Grenoble Sciences Eds. (1999).

Appliqué sur des molécules polaires, un champ électromagnétique continu entraîne l'alignement de celles-ci dans le sens du vecteur champ appliqué, par un phénomène de polarisation dipolaire (b).

Le four fonctionne en générant un champ électromagnétique alternatif (c), ce qui fait basculer les dipôles de manière alternative, conduisant à leur rotation. Très pénétrantes, les micro-ondes provoquent la mise en rotation immédiate de toutes les molécules polaires du milieu. Les mouvements rotatoires se font à la même fréquence que celle du champ alternatif de l'appareil: à 2450MHz, les molécules polaires réalisent ainsi $2,45 \cdot 10^9$ rotations par seconde. C'est cette mise en rotation rapide qui engendre des frictions moléculaires, responsables de l'échauffement immédiat et homogène du milieu, sans les gradients de température observés en cours de chauffage classique.

La valeur du moment dipolaire (μ , exprimé en Debye) d'une molécule permet de prédire son comportement sous micro-ondes. Par exemple, avec une minute d'irradiation micro-ondes à la puissance de 600W, on porte la température du DMF ($\mu = 10,8$ D) à 130 °C, alors qu'un hydrocarbure apolaire comme l'heptane ($\mu = 0,0$ D) ne s'échauffe pas.

Influence du milieu réactionnel

Contrairement au chauffage classique, il est important de considérer la polarité des solvants utilisés lorsque l'assistance par irradiation micro-ondes est envisagée.

Réactions en solvants polaires :

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'effet des micro-ondes sur les réactifs est donc masqué : l'activation se fait par transfert d'énergie thermique, du solvant vers les réactifs. En conséquence, les rendements seront proches de ceux obtenus par chauffage classique : on parle d'*effet de solvant*.

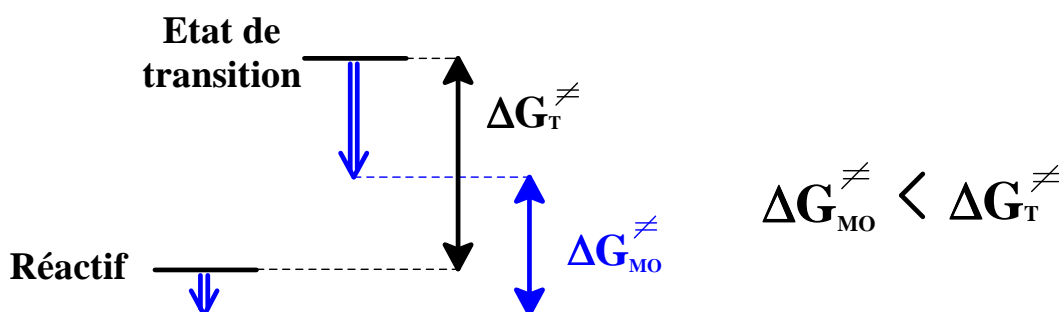
Réactions en solvants apolaires :

Un solvant apolaire n'absorbe pas ou très peu les micro-ondes : 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.

Pour une réaction donnée, on peut observer une variation de l'effet micro-ondes car la polarité du système suit l'évolution des étapes réactionnelles. Les mécanismes réactionnels sont donc à considérer avec attention lorsque l'activation micro-ondes est envisagée.

Aspects thermodynamique et cinétique

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 davantage stabilisé par les micro-ondes que ne l'est l'état initial (figure AII).¹⁷⁰



(ΔG_T^\ddagger : énergie d'activation par voie thermique ; ΔG_{MO}^\ddagger : énergie d'activation par micro-ondes)

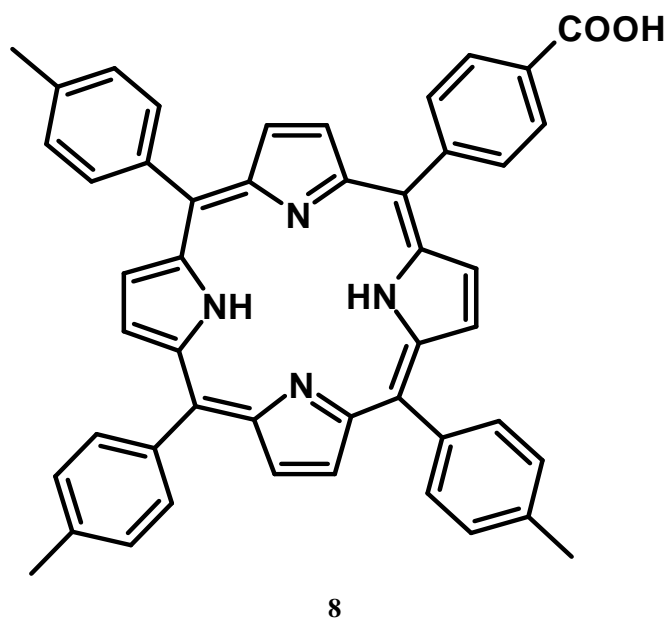
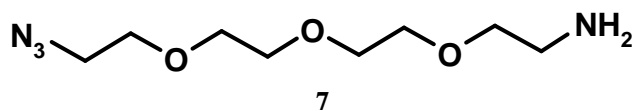
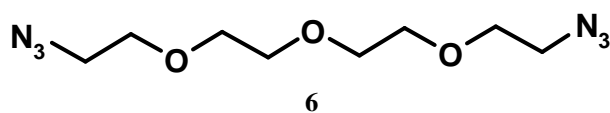
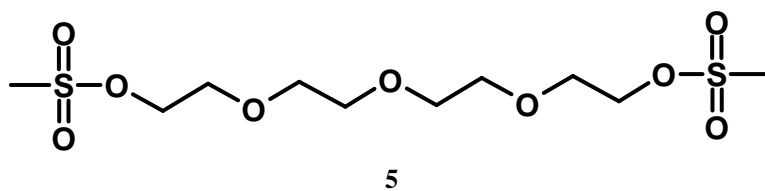
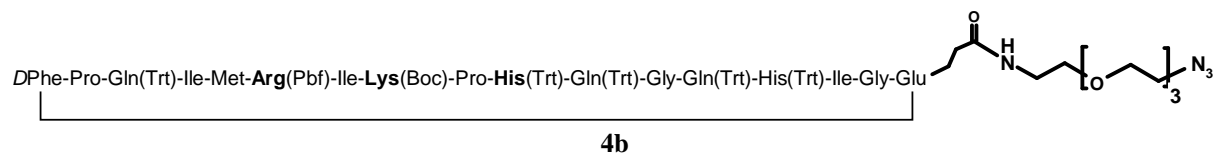
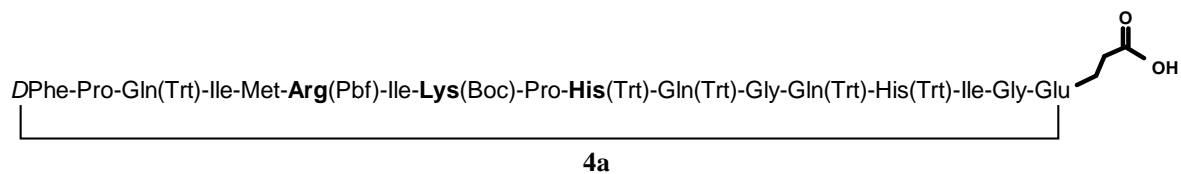
Figure AII : Stabilisation relative des états de transition polaires par rapport à l'état initial pour un mécanisme polaire.¹⁷⁰

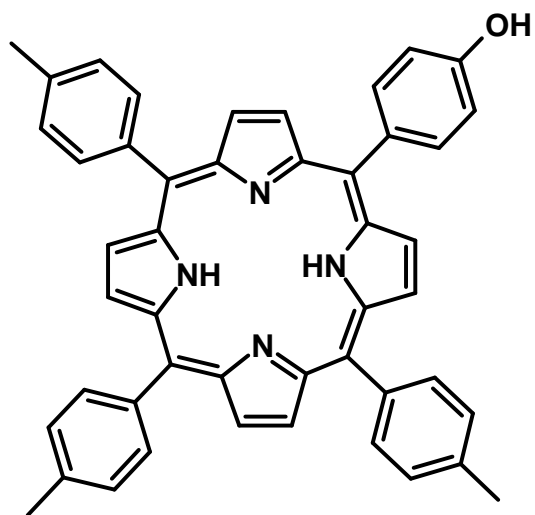
Lorsque l'énergie d'activation est faible (état initial et état de transition sont similaires) l'effet des micro-ondes est moins important. Inversement, lorsque l'énergie d'activation est élevée (état initial et état de transition sont différents) l'effet des micro-ondes est particulièrement marqué.

¹⁷⁰ L. Perreux; A. Loupy; *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9199-9223.

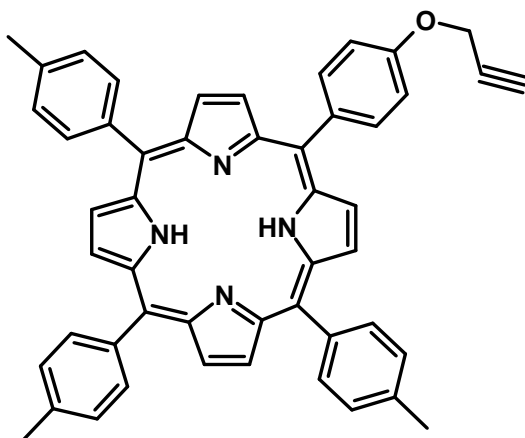
ANNEXE II

Structures des composés synthétisés au cours de ce travail

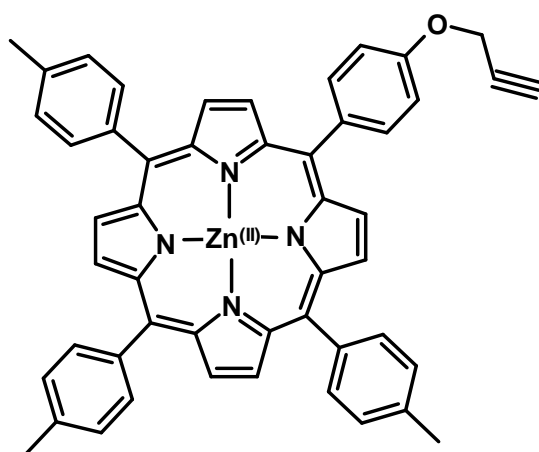




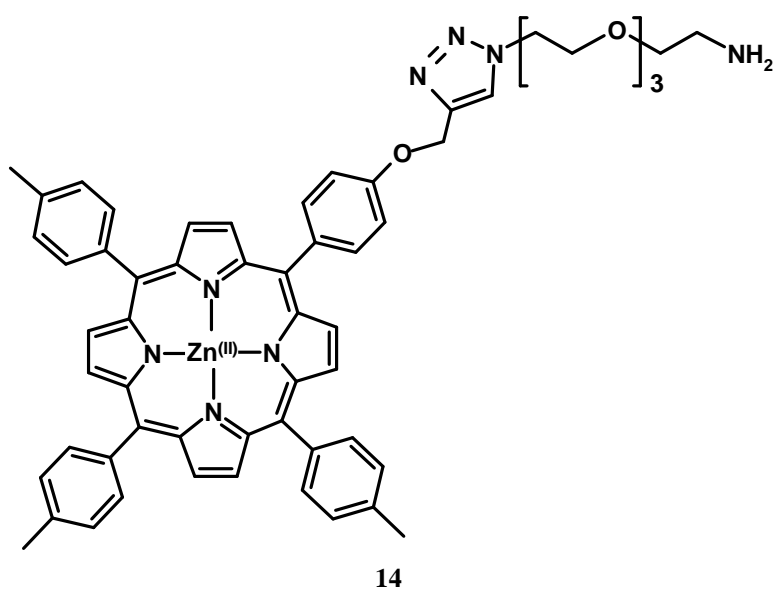
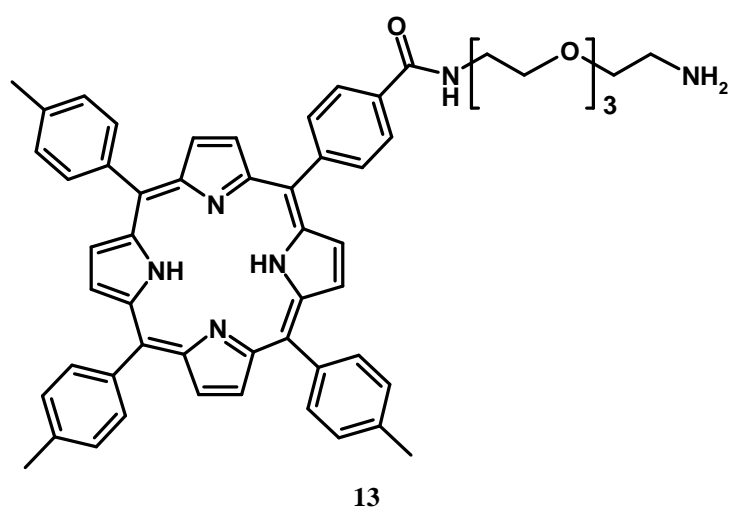
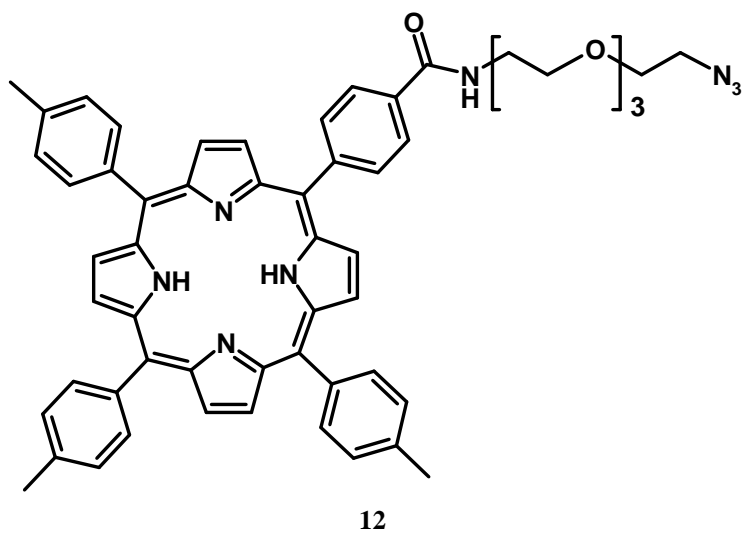
9

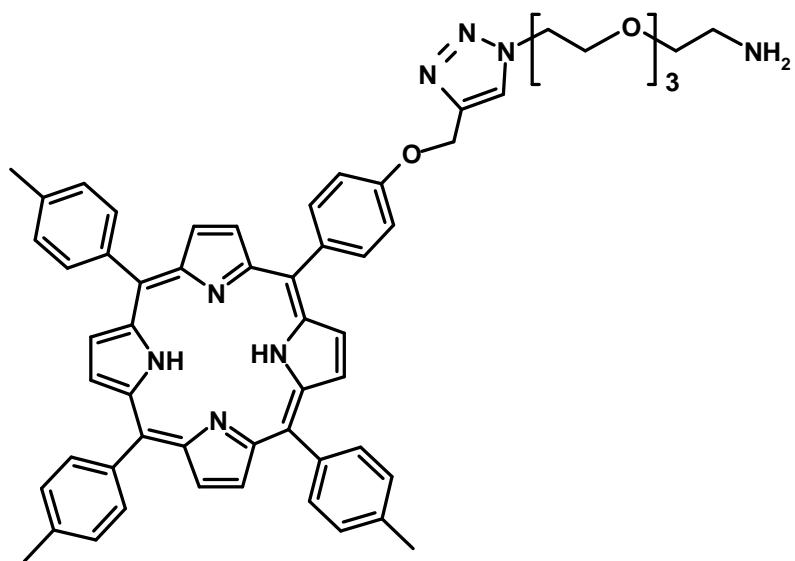


10

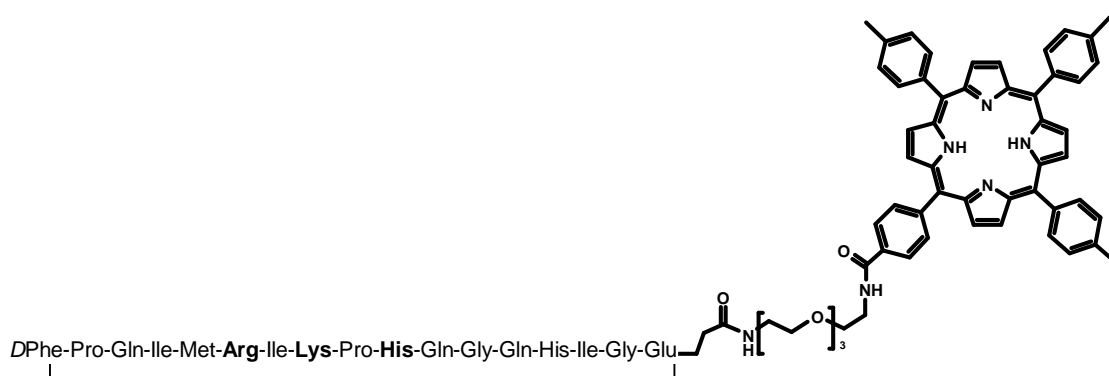


11

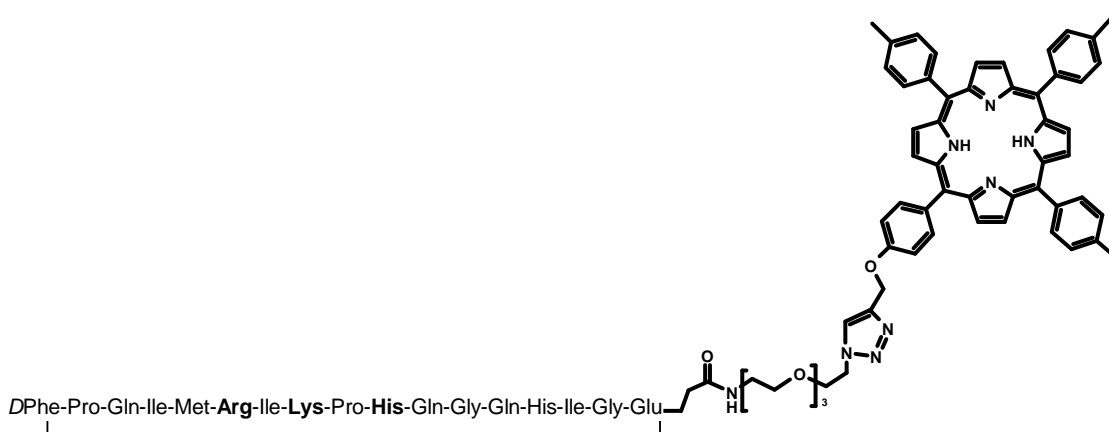




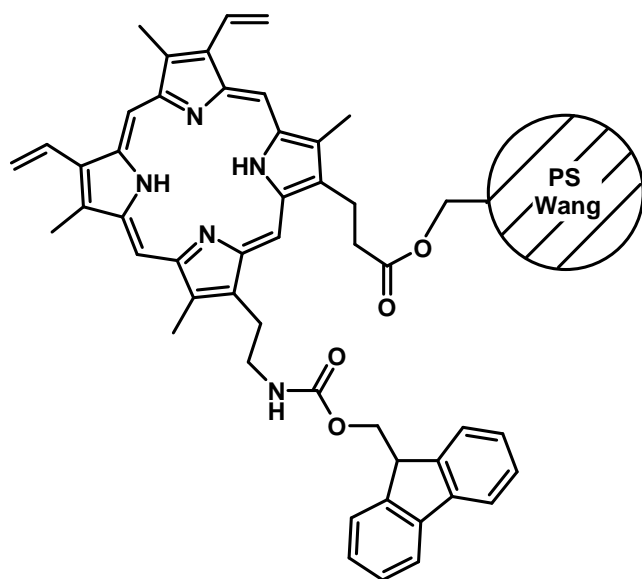
15



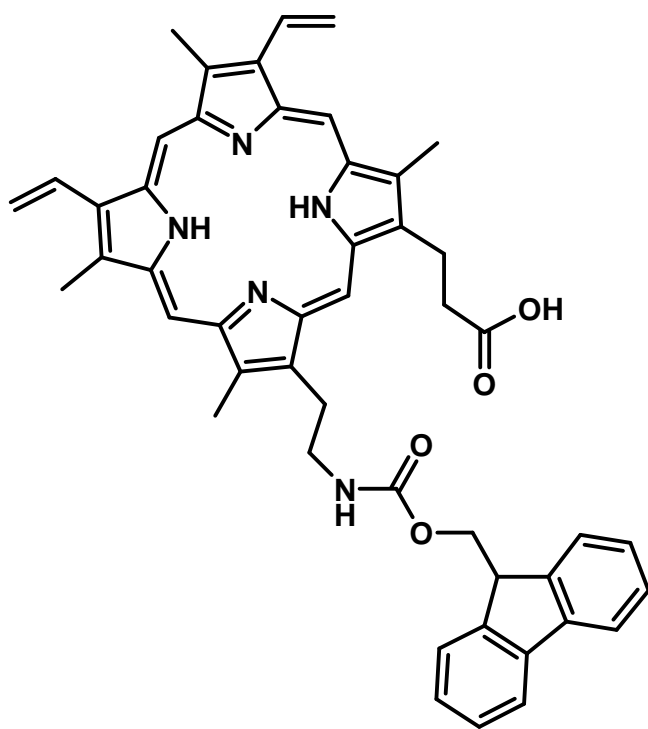
16



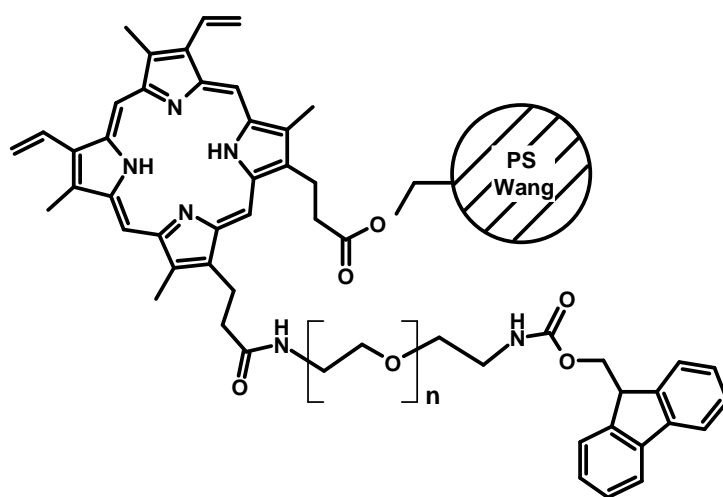
17



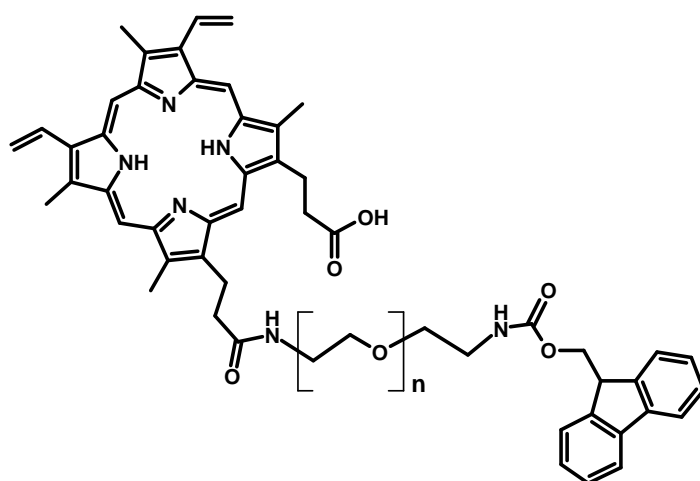
21



22



25a (n=2) ; 25b (n=3)



26a (n=2) ; 26b (n=3)