

UNIVERSITÉ DE LIMOGES

ÉCOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTÉ DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse N° 32-2008

Thèse

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LIMOGES

Discipline - Spécialité : Chimie Appliquée - Chimie des Substances Naturelles

Présentée et soutenue par

Florian Ménard

le 19 septembre 2008

Benzoporphyrines polyaminées et glycosylées Synthèses et tests biologiques

Thèse dirigée par M. Pierre KRAUSZ, Professeur et M. Vincent SOL, Maître de conférences

JURY :

Rapporteurs :

M^{me}. Clotilde POLICAR

Professeur

Université Paris Sud, Orsay

M. Yves QUENEAU

Directeur de Recherche au CNRS

Université de Lyon, INSA Lyon

Examineurs :

M. Stéphane GRELIER

Professeur

Université de Bordeaux I

M. Pierre KRAUSZ

Professeur

Université de Limoges

M. Vincent SOL

Maître de conférences

Université de Limoges

J'aime qu'à mes dessins la fortune
s'oppose :

car la peine de vaincre
en accroît le plaisir.

Jean Bertaut

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles à la faculté des Sciences et Techniques de Limoges. Je tiens à remercier son directeur Monsieur le Professeur Pierre Krausz pour avoir dirigé ce travail, pour la confiance et la liberté qu'il m'a accordées. Pour sa disponibilité, ses précieux conseils et commentaires qui m'ont permis de surmonter mes difficultés et de progresser au cours de cette thèse, je remercie tout particulièrement mon encadrant Vincent Sol. Pendant les nombreuses heures passées ensemble, j'ai beaucoup appris à son contact. Qu'il trouve ici les marques de ma reconnaissance et de mon respect. Je tiens également à les remercier, tous deux, pour avoir relu attentivement ce manuscrit. Merci du temps qu'ils ont consacré à redonner un peu de rigueur à cet écrit.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait Monsieur le Professeur Stéphane Grelier, Madame le Professeur Clotilde Policar et Monsieur le Professeur Yves Queneau en acceptant de participer à ce jury en tant que président et rapporteurs. Je leur exprime toute ma reconnaissance pour la rapidité avec laquelle ils ont lu mon manuscrit, l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour leurs remarques pertinentes qui ont permis de clarifier ma rédaction et d'apporter de nouvelles pistes de réflexion.

Je remercie le Docteur Caroline Le Morvan pour avoir effectué les analyses biologiques, le Docteur Sandra Alves pour les analyses de spectrométrie de masse, et le Docteur Yves Champavier pour les analyses RMN. Qu'ils trouvent également ici l'expression de toute ma reconnaissance pour leur aide qui a permis l'accomplissement de ce travail.

Je voudrais exprimer mes remerciements sincères à Rachida Zerrouki, Robert Granet et Vincent Chaleix, pour leur humanité, leur enthousiasme et leur disponibilité pour d'intenses et rationnelles discussions. Je n'oublie pas Michel Guilloton pour son aide dans l'écriture d'articles dans la langue de shakespeare.

Un grand merci à tous ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est : toute l'équipe du LCSN pour son accueil chaleureux durant ces années, qui a su créer une ambiance très sympathique fournissant un cadre privilégié pour effectuer une thèse. Pour reprendre un ordre plus chronologique, je pense particulièrement à Yannick et François de par leur adhésion au club des « trois grâces », à Virginie pour son côté bout-entrain, à Guillaume pour son rôle de mentor, à Ludovic inspirant la quiétude, à Karine C. pour sa perpétuelle bonne humeur, à Michelle pour sa gentillesse, à Cyril à l'accent chantant, à Carmen pour son côté maternel, à Marc avec sa personnalité alambiquée, à Karine T. et Romain pour leur complicité liant un rire à un humour singulier, à Muriel et Cédric les biologistes à l'âme de chimiste et aux deux petits nouveaux Julien et Nicolas.

*Je voudrais également exprimer ma profonde reconnaissance et amitié à mes deux employeurs Catherine Feder et Lydia Fernandes pour leur soutien et pour l'aménagement d'un emploi du temps compatible à mes études. Un grand merci à mes collègues devenus amis et tout particulièrement à la Mafia : Anabel, Maïd, Stéph, pti*Ben, Pony, Patou, Anne-cé, Emilie, et Val.*

Je souhaite enfin remercier chaudement mes proches les plus chères : mon frère, mes parents, ma famille, Maxime, Romain, Damien et Naïla.

Table des matières

Liste des abréviations.....	5
-----------------------------	---

Introduction générale.....	9
----------------------------	---

Chapitre I

Les benzoporphyrines – Structures, Propriétés et Applications – État de la question....	13
---	----

1. Structure des porphyrines et dérivés	15
2. État naturel	18
3. Synthèses et préparations	20
3-1 Méthode de synthèse des porphyrines	20
a) Synthèse de meso-porphyrines	20
b) Synthèse de porphyrines β -substituées.....	25
c) Cas particulier des benzoporphyrines.....	27
3-1 Méthode de synthèse des dérivés de porphyrines.....	36
4. Caractérisations	38
4-1 Spectroscopie UV-visible.....	38
4-2 Spectrométrie de masse	42
4-3 Résonance magnétique nucléaire.....	43
a) Spectroscopie RMN du proton	43
b) Spectroscopie RMN du carbone 13.....	45
4-1 Spectroscopie Infra-Rouge	45
5. Domaines d'application.....	46
5-1 Applications chimiques	46
5-2 Applications physico-chimiques.....	48
5-3 Applications biologiques et médicales : la PDT.....	49
a) Introduction à la photothérapie dynamique.....	49
b) Historique	50
c) Mécanisme et processus photochimique	53
d) Les mécanismes de la photodestruction	56
e) Les photosensibilisateurs utilisés en PDT.....	57
f) Autres applications thérapeutiques.....	74
6. Finalité du travail	76

Chapitre II

Synthèses de tétrabenzoporphyrines tétrapolyaminées..... 81

1. Introduction	83
2. Stratégie de synthèse	83
3. Synthèse du synthon tétracarboxyphényltétrabenzoporphyrinique (7).....	85
3-1 Généralités.....	85
3-2 Synthèse de l'ester tétrahydroisindole (1).....	86
3-3 Synthèse de la tétracarboxyméthylphényltétracyclohexènoporphyrine (3).....	87
3-4 Formation de la tétracarboxyméthylphényltétrabenzoporphyrine (6).....	88
3-5 Saponification des fonctions esters (7).....	89
4. Synthèses des précurseurs polyaminés (12 et 13)	90
4-1 Quelques éléments sur la chimie des polyamines.....	90
4-2 Schéma général.....	94
4-3 Synthèse de la spermidineBoc ₂ (8) et de la spermineBoc ₃ (9).....	95
4-4 Fixation du <i>N</i> -(4-bromobutyl)phtalimide (10 et 11).....	96
4-5 Déprotection du groupement phtalimide (12 et 13).....	97
5. Synthèses des benzoporphyrines tétrapolyaminées (16 et 17).....	98
5-1 Fixation des précurseurs polyaminés sur la benzoporphyrine (14 et 15).....	98
5-2 Déprotection des benzoporphyrines tétrapolyaminées (16 et 17).....	100
6. Caractérisations spectroscopiques.....	100
6-1 Spectroscopie UV-visible.....	101
6-2 Spectrométrie de masse MALDI.....	104
6-3 RMN du proton	105
6-4 RMN du carbone	109
7. Conclusions	111

Chapitre III

Synthèses de tétrabenzoporphyrines tétraglucosylées..... 113

1. Introduction	115
2. Stratégies de synthèse.....	115
3. Tétrabenzoporphyrine tétra- β -glucosylé (24).....	118
3-1 Synthèse de l'aldéhyde glucoacétylé (19).....	118
<i>a) Rappels bibliographiques sur la glycosylation</i>	118
<i>b) Synthèse du benzaldéhyde glucoacétylé</i>	120
3-1 Synthèse de la tétraphénylporphyrine tétraglucosylée (20).....	120

3-2	Oxydation de la tétraphénylporphyrine (20) en tétrabenzoporphyrine (23)	121
3-3	Déprotection de la benzoporphyrine glucosylée acétylée (24)	122
4.	Tétrabenzoporphyrine tétra- α -glucosylé (25)	123
4-1	Synthèse du bras espaceur (25)	123
4-2	Fixation des bras espaceurs sur le macrocycle benzoporphyrinique (26)	124
4-3	Déprotection des fonctions amines primaires (27)	125
4-4	Couplage de la benzoporphyrine aminée avec la δ -lactone (28)	125
4-5	Déprotection de la benzoporphyrine glucosylée acétylée (29)	127
5.	Caractérisation	128
5-1	Spectroscopie UV-visible	128
5-2	Spectrométrie de masse MALDI	130
5-3	RMN du proton	131
6.	Conclusions	134

Chapitre IV

Évaluations Biologiques 135

1.	Production d'oxygène singulet	137
2.	Mort cellulaire	138
2-1	Les dommages cellulaires directs – Quelques rappels	138
	<i>a) La nécrose</i>	138
	<i>b) L'apoptose</i>	139
2-2	Les dommages cellulaires indirects	140
2-3	Résultats	140
3.	Conclusions	142

Conclusions générales et perspectives 143

Chapitre V

Partie expérimentale 147

1.	Réactifs et solvants	149
2.	Mesures physiques	150
2-1	Ultraviolet-visible (UV)	150
2-2	Infra-rouge (IR)	150
2-1	Les températures de fusion (T_F)	151
2-2	Résonance magnétique nucléaire (RMN)	151
2-3	Spectrométrie de masse MALDI	151

2-4	Spectrométrie de masse Haute Résolution	151
2-5	Chromatographie	151
	<i>a) Chromatographie analytique sur couche mince</i>	151
	<i>b) Chromatographie préparative</i>	152
3.	Étude de la production d'oxygène singulet	152
4.	Matériels et méthodes : tests biologiques.....	153
4-1	Culture cellulaire	153
4-2	Test de viabilité cellulaire	154
	<i>a) Principe</i>	154
	<i>b) Mise en place du traitement photosensibilisateur</i>	154
	<i>c) Contrôles</i>	154
	<i>d) Irradiation lumineuse</i>	155
	<i>e) Test MTT</i>	155
	<i>f) Analyse statistique</i>	155
5.	Synthèses.....	155
	Liste des composés synthétisés	185
	Annexe	191
	Références bibliographiques	197

Liste des abréviations

5-ALA	5-aminolévulinique
2PP	photopolymérisation à deux photons
ADN	acide désoxyribonucléique
AMM	autorisation de mise sur le marché
Ar ₄ TCHP	tétraaryltétracyclohexènoporphyrine
Ar ₄ TBP	tétraaryltétrabenzoporphyrine
ARN	acides ribonucléiques
ARNt	acides ribonucléiques de transfert
BF ₃ .Et ₂ O	boron trifluoride-diéthyl étherate
Boc	<i>tert</i> -butyloxy-carbonyle
Boc-ON	2-(<i>tert</i> -butyloxy-carbonyloxyimine)-2-phénylacétonitrile
BOP	hexafluorophosphate de benzotriazoloxo-tri-(diméthylamino)phosphonium
BPD-MA	dérivé monoacide de la benzoporphyrine
BPE	extrait hypophysaire bovin
CCM	chromatographie sur couche mince
<i>Coll.</i>	collaborateur
DCC	dicyclohexylcarbodiimide
Dde	<i>N</i> -1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-éthyl
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>para</i> -benzoquinone
DFMO	α -difluorométhylornithine
DHE	dihématoporphyrine éther
DMF	diméthylformamide
DMLA	dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMSO	diméthyle sulfoxyde
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
EGF	Epidermal growth factor
ESI	ionisation par electrospray
HCCA	acide α -cyano-4-hydroxycinnamique
HOBt	1-hydroxybenzotriazole
HpD	hématoporphyrine
HPLC	chromatographie liquide haute performance
IR	Infra-Rouge
K-SFM	keratinocyte-serum free medium
LCSN	laboratoire de chimie des substances naturelles
LDL	lipoprotéines de faible densité
LiAlH ₄	hydrure de lithium aluminium
MALDI	désorption-ionisation laser assisté par matrice
MEM	eagle's minimum essential medium with earle's salts
Ms	mésyl
MGBG	méthylglyoxal-bis-(guanyl)-hydrazone
<i>m</i> -TCHP	<i>meta</i> -tétrahydroxyphénylchlorine
MTT	bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium
NeAA	acides aminés non essentiels
PACT	photochimiothérapie antimicrobienne
PAG	photo-générateur d'acide
PAST	paleontological statistics softward package for education and data analysis
PBS	phosphate buffer saline
PDT	photothérapie dynamique
PhIO	iodosylbenzène

PtO ₂	oxyde de platine
PyBOP	hexafluorophosphate de benzotriazoyloxy-tri-(pyrrolidino)-phosphonium
rEGF	facteur de croissance épidermique recombinant
R _f	Rapport frontal
RMN	résonance magnétique nucléaire
SIDA	syndrome d'immunodéficience acquise
SVF	sérum de veau fœtal
TBP	tétrabenzoporphyrine
TCHP	tétracyclohexènoporphyrine
TFA	acide trifluoroacétique
TTP	tétratolylporphyrine
TPP	tétraphénylporphyrine
VIH	virus d'immunodéficience humaine

Introduction générale

Les porphyrines font partie des molécules les plus étudiées parmi la classe des systèmes conjugués et possèdent un large champ d'application qui s'étend de leur utilisation en tant que colorant et encre jusqu'au développement de nouveaux matériaux pour l'optoélectronique. Ces chromophores sont aussi largement exploités dans l'étude de la reconnaissance moléculaire, dans le développement de molécules à l'échelle nanométrique comprenant les fils moléculaires, mais aussi dans l'élaboration de cellules photovoltaïques. Les porphyrines sont des structures hétérocycliques aromatiques très largement représentées dans les milieux vivants. Elles participent sous leur forme métallée à de nombreux processus d'oxydoréduction thermique ou photochimique en milieux biologiques. L'intérêt porté à la conception et au développement de nouvelles stratégies de synthèse de porphyrines et de leurs dérivés n'a cessé de croître ces dernières années en raison de leur vaste domaine d'applications. Par exemple, l'élaboration de modèles d'hémoprotéines, mimant l'aptitude des enzymes pour la reconnaissance ou la catalyse, permet de comprendre leur fonctionnement dans les systèmes naturels. En outre, certaines porphyrines d'origine synthétique ou naturelle se révèlent être particulièrement efficaces en tant que catalyseurs d'époxydation et d'hydroxylation -régiosélectifs ou mêmes stéréosélectifs-, ou encore en tant qu'agents de photodécomposition de l'eau. La photothérapie dynamique (PDT) ou photochimiothérapie, technique en plein développement appliquée au traitement des cancers, est un autre domaine d'application de ces structures hétérocycliques. Elle a été développée dans les années 1970, et de nos jours cette technique est utilisée également dans d'autres pathologies, comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et les myopies pathologiques. Des traitements fondés sur ce principe sont aussi destinés à lutter contre les maladies cardio-vasculaires, le SIDA, les rejets de greffes ou les leucémies. Parmi les porphyrines les plus couramment utilisées pour le traitement du cancer, deux grandes catégories de produits sont rencontrées. La première génération de ces molécules regroupe des dérivés de l'hémoglobine que l'on trouve sous deux formes : le dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) et le Photofrin II[®] qui est un mélange complexe de porphyrines naturelles. Ce dernier a été commercialisé dans un premier temps aux Etats-Unis, puis il a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en France en 1996. Depuis, des photosensibilisateurs de deuxième génération, possédant une meilleure pénétration des tissus, ont été développés et confèrent à la photothérapie dynamique un essor remarquable. La *meta*-tétrahydroxyphénylchlorine (*m*-THPC ou Foscan[®]) est utilisée pour traiter les cancers de l'œsophage, du poumon et du larynx. Le dérivé monoacide de la tétrabenzoporphyrine (BPD-MA) plus connu sous le nom de vertéporfine (Visudyne[®]), agréé

en avril 2000, est utilisé pour le traitement de DMLA qui est la cause la plus fréquente de cécité dans les pays industrialisés en raison du vieillissement de la population. Devant le nombre restreint de molécules efficaces à structure bien définie présentes sur le marché, la recherche de nouveaux photosensibilisateurs de troisième génération, capables d'atteindre spécifiquement les cellules cancéreuses, est un problème d'actualité. Cette recherche tend à s'orienter vers la synthèse de molécules hybrides composées d'un macrocycle porphyrinique associé à des agents de transport ou de reconnaissance comme, par exemple, les polyamines (spermidine et spermine) ou les glucides qui se révèlent être d'excellents agents de vectorisation vers certaines cellules tumorales. Ils permettent également d'augmenter la solubilité du photosensibilisateur dans l'eau.

Notre travail s'inscrit dans le cadre d'un programme de synthèse entrepris au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN). Nous avons réalisé la synthèse et la caractérisation de tétrabenzoporphyrines tétrapolyaminées et tétraglucosylées. Ainsi, dans un premier temps la synthèse du squelette tétrabenzoporphyrinique a été optimisée, puis dans un second temps, la tétrabenzoporphyrine obtenue a été substituée soit par quatre unités polyamines telles que la spermine ou la spermidine, soit par quatre unités α -D-glucose relié par un bras espaceur ou β -D-glucose. De plus une étude biologique de ces nouveaux photosensibilisateurs a été réalisée sur les lignées cellulaires MCF-7 et HaCaT (lignées cancéreuses humaines) afin d'évaluer *in vitro* leur activité anticancéreuse.

Chapitre I

Les benzoporphyrines

– Structures, Propriétés et Applications –

État de la question

Nous nous proposons, dans ce chapitre, de faire un état des lieux sur les porphyrines du point de vue synthèses, caractérisations et applications avec une référence particulière aux benzoporphyrines qui constituent l'objet de ce travail.

1. Structure des porphyrines et dérivés

Les porphyrines sont des macrocycles fortement conjugués constitués de quatre unités pyrroliques liées entre elles par un pont méthine. L'aromaticité (18 électrons π) leur confère une stabilité importante, une forte absorption dans le visible et permet à chaque atome d'azote de former une liaison ionique ou de covalence. En outre, ces structures hétérocycliques se comportent comme des diacides ou des dibases, et peuvent être métallées par presque tous les métaux. Dans le premier cas, la molécule est dite base "libre", dans le second cas, elle est dite "métallée" (Figure I-1).

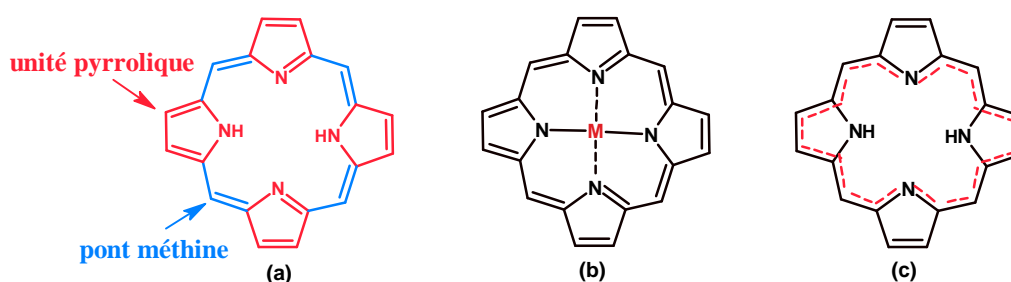


Figure I-1 : (a) Porphyrine base libre; (b) Porphyrine base métallée; (c) Représentation du système de 18 électrons π aromatiques

Ces macrocycles peuvent être partiellement réduits (Figure I-2) et lorsqu'une double liaison d'une position β -pyrrolique est hydrogénée, on parle alors de chlorines (du gr. *chlôros*, vert). Un composé apparenté, avec deux pyrroles réduits est appelé bactériochlorine ou isobactériochlorine.

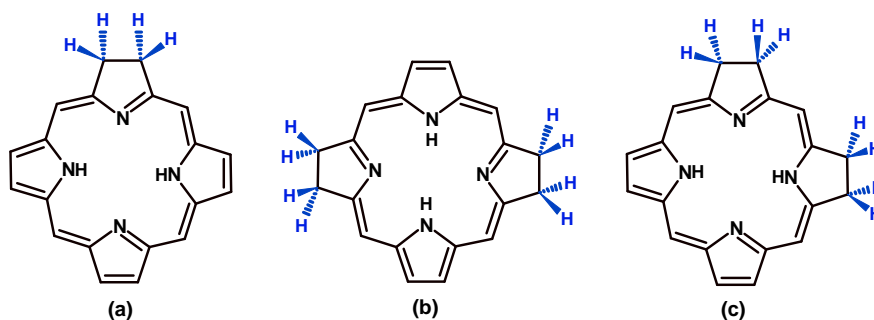


Figure I-2 : (a) Chlorine; (b) bactériochlorine; (c) isobactériochlorine

Autres dérivées de porphyrines, les benzoporphyrines sont des macrocycles aromatiques (22 électrons π) et sont constituées de quatre unités : l'une benzopyrrolique et les autres sont soit pyrrolique(s) et/ou benzopyrrolique(s) (Figure I-3).¹ Ces dernières sont liées entre elles par un pont méthine. Ces molécules possèdent des propriétés physiques et chimiques semblables aux porphyrines.

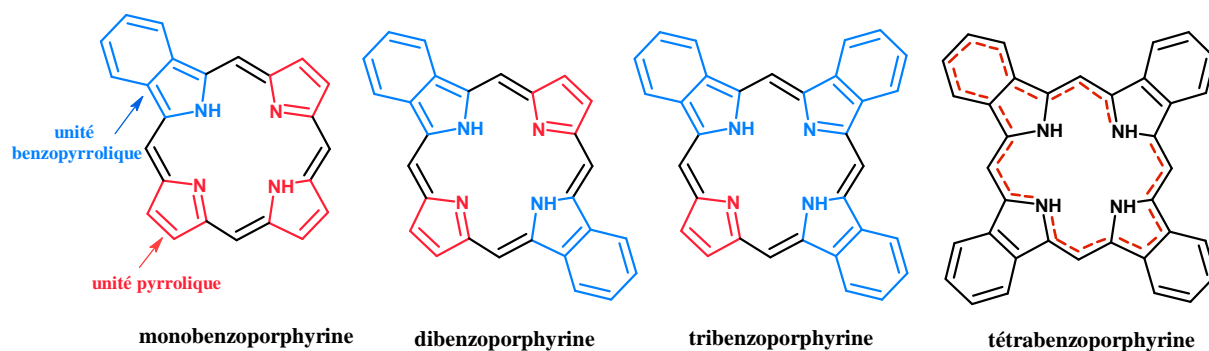


Figure I-3 : Exemples de benzoporphyrines et représentation du système de 22 électrons π aromatiques

Dans les années 30, le chimiste allemand Hans Fischer² propose pour la première fois un système de nomenclature encore utilisé de nos jours pour désigner les porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques. Ainsi, les atomes de carbone des positions méthines, aussi appelés "meso", sont numérotés α , β , γ et δ , et les carbones β -pyrroliques sont notés 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8. La complexité des porphyrines synthétisées augmentant, une numérotation systématique du macrocycle a été adoptée en 1987 afin de simplifier la nomenclature de ces molécules.³ Les carbones *meso* portent alors les numéros 5, 10, 15, 20, les positions α et β des cycles pyrroliques sont notées respectivement 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 et enfin les numéros 21, 22, 23, 24 ont été attribués aux quatre atomes d'azote (Figure I-4-a/b). Sur le même principe, le système de nomenclature utilisé pour désigner les benzoporphyrines est illustré au travers d'un modèle : la tétrabenzoporphyrine représentée ci-dessous (Figure I-4-c). Notons que les carbones des cycles benzéniques sont nommés par le

¹ O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, P. J. Carroll, S. Dalosto, S. A. Vinogradov; *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 6944-6946.

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.

numéro porté par le premier point de substitution suivi d'un indice allant de 1 à 4 soit 2¹, 2², 2³, 2⁴, 7¹, 7², 7³, 7⁴, 12¹, 12², 12³, 12⁴, 17¹, 17², 17³, 17⁴.⁴

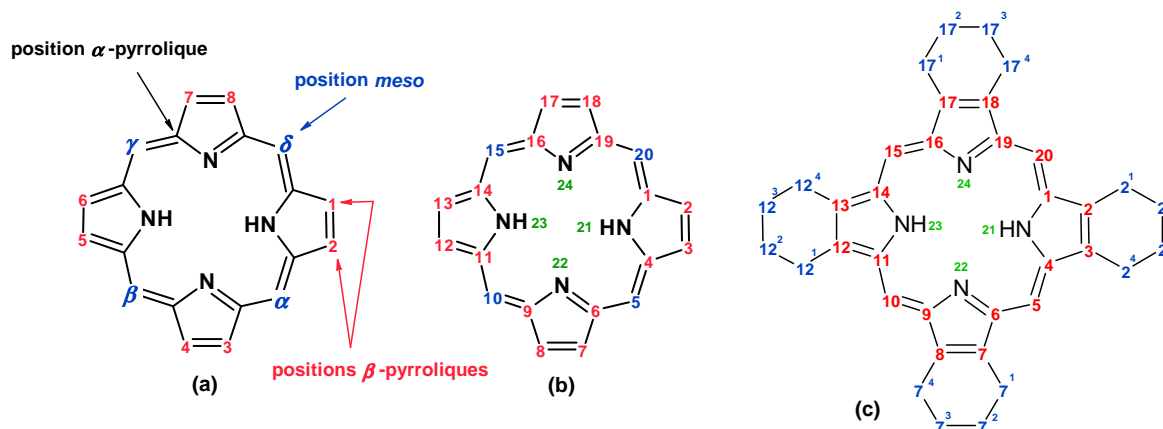


Figure I-4 : (a) Nomenclature de Fischer; (b) Nomenclature systématique d'une porphyrine; (c) Nomenclature systématique d'une benzoporphyrine

Le macrocycle porphyrinique ou benzoporphyrinique, structure de géométrie normalement plane, peut adopter dans certains cas des conformations non planes (Figure I-5).⁵

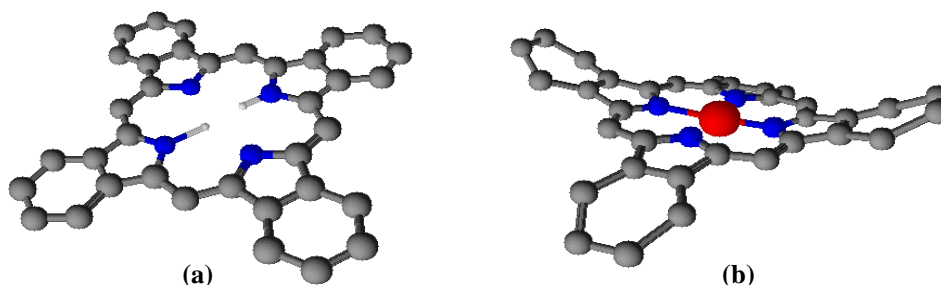


Figure I-5 : (a) Benzoporphyrine base "libre" plane ; (b) Benzoporphyrine de fer non plane

De telles distorsions peuvent être engendrées par la protonation des deux atomes d'azote, la présence de groupements volumineux en position *meso* ou encore par la métallation.

⁴ In *The porphyrins, Structures and synthesis*; D. Dolphin, Eds., *department of chemistry, University of British, Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada, 2000*, Part. A, Vol. 1.

⁵ E. F. Meyer; *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, **1972**, B28, 2162-2167.

2. État naturel

Les macrocycles tétrapyrroliques sont très largement représentés dans les milieux vivants. Ils sont métallés et généralement associés à des protéines. La figure I-6 présente quelques exemples de tels pigments naturels (porphyrines ou macrocycles dérivés) choisis parmi les plus représentatifs.

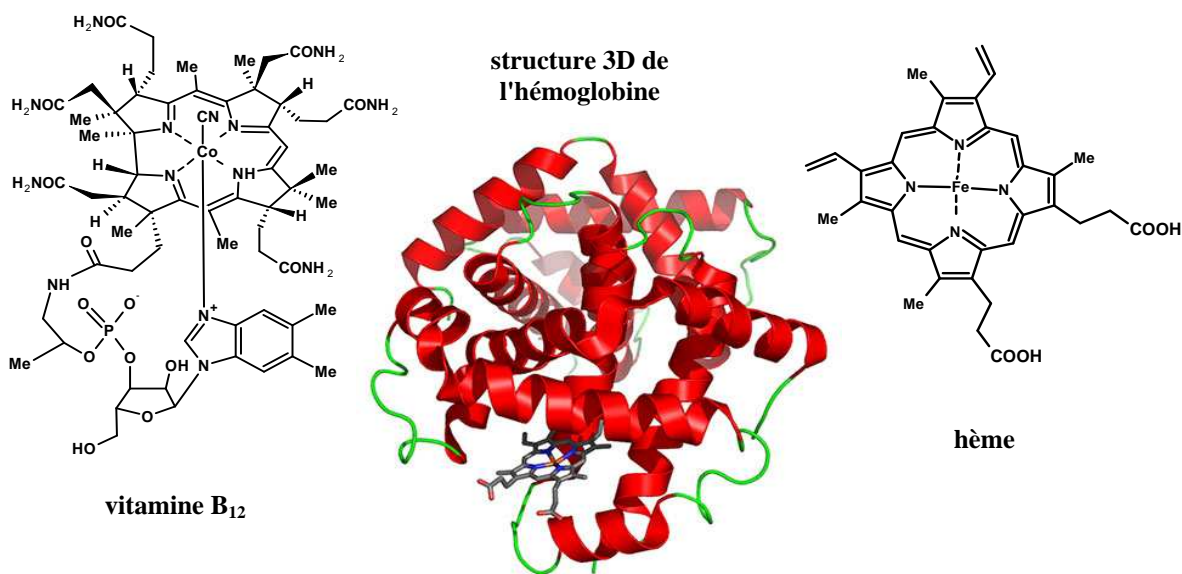


Figure I-6 : Exemples de macrocycles tétrapyrroliques naturels

Ces composés sont impliqués dans des processus naturels variés d'oxydoréduction. Ainsi le transport des gaz respiratoires (O_2 , CO_2) est assuré par l'hémoglobine⁶, protéine dont le groupe prosthétique est une porphyrine : la protoporphyrine IX métallée par du fer au degré d'oxydation +II (l'hème). La myoglobine quant à elle, protéine de structure très proche de celle de l'hémoglobine possédant également l'hème comme groupe prosthétique, participe au stockage de l'oxygène dans les tissus musculaires ainsi qu'à son transport vers les mitochondries. Les cytochromes constituent une autre classe de métalloprotéines construites autour d'un noyau héminique. L'environnement protéique de ces molécules permet à l'atome de fer central de passer réversiblement du degré d'oxydation +III au degré d'oxydation +II. De ce fait, les cytochromes de la chaîne respiratoire, comme le cytochrome *c*, jouent le rôle de transporteurs d'électrons lors du processus de respiration cellulaire. Le cytochrome P450, quant à lui, métabolise des composés xénobiotiques (substance possédant des propriétés

⁶ M. Perutz; *Pour la science*. **1979**, 16, 71-85.

toxiques) en catalysant leur oxydation ou leur réduction.⁷ Nous pouvons également citer, comme exemple de macrocycles tétrapyrroliques naturels, la vitamine B₁₂ dont la structure est celle d'une corrine métallée par un atome de cobalt pouvant se trouver à divers degrés d'oxydoréduction. La vitamine B₁₂ est le cofacteur de réactions de transméthylation et de réactions d'isomérisation. Associée à l'acide folique, elle intervient dans la transformation de l'homocystéine en méthionine par la méthionine synthase. En outre, elle est impliquée dans la formation des globules rouges. Une carence en vitamine B₁₂ se traduit par une anémie, une accumulation d'homocystéine dans le sang responsable de problèmes cérébrovasculaires ainsi que par une raréfaction de la méthionine impliquée dans la production de myéline ce qui altère les transmissions nerveuses. Nous retrouvons aussi ces structures dans toutes les plantes vertes sous forme de chlorophylle (Figure I-7) qui, par absorption de photons puis par transfert d'énergie, sont à l'origine de la photosynthèse. Ce que l'on nomme couramment "chlorophylle" est en réalité un mélange de plusieurs molécules de structures chimiques très proches. On distingue ainsi les chlorophylles a, b, c et d ainsi que quelques dérivés apparentés comme les bactériochlorophylles. Il est estimé que près d'un milliard de tonnes de ces composés sont synthétisées par les plantes chaque année sur toute la surface de la terre. La dégradation des ces molécules tout comme l'hème et la protohème, molécules de structure voisine, durant des millions d'années, produit des combustibles fossiles comprenant des macrocycles porphyriniques nommés géoporphyrines ou pétroporphyrines (Figure I-7).⁸ Ces molécules ont été pour la première fois découvertes et étudiées par Treibs⁹ dans les années 1930. Ces colorants géologiques, sont largement présents dans le schiste pétrolier, le pétrole et dans les goudrons. Ils sont uniques, du fait de leur profil chromatographique, et peuvent ainsi jouer le rôle d'indicateur pour la datation des couches sédimentaires, dans la reconstruction des couches géologiques et pour la détermination des origines biologiques des pétroles. La classe des benzoporphyrines est représentée, parmi ces composés tétracycliques, par la benzoDPEP et la BenzoEtio (Figure I-7).

⁷ L. R. Milgrom; *The Colors of Life : an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford Univ Press, UK, **1997**, 249-260.

⁸ a) A. Treibs; *Angew. Chem.*, **1936**, 49, 682-686. b) R. Ocampo, H. J. Callot, P. Albrech; In *Metal complexes in fossil fuels*. R. H. Filby, J. F. Branthaver, Eds.; *American Chemical Society: Washington, DC*, **1987**, 125-225.

c) E. W. Baker, S. E. Palmer; In *The Porphyrins*; D. Dolphin, Eds.; *Academic Press: New York*, **1978**, Vol. I, 485.

⁹ A. Treibs; *Leibigs Ann. Chem.*, **1936**, 509, 103-114.

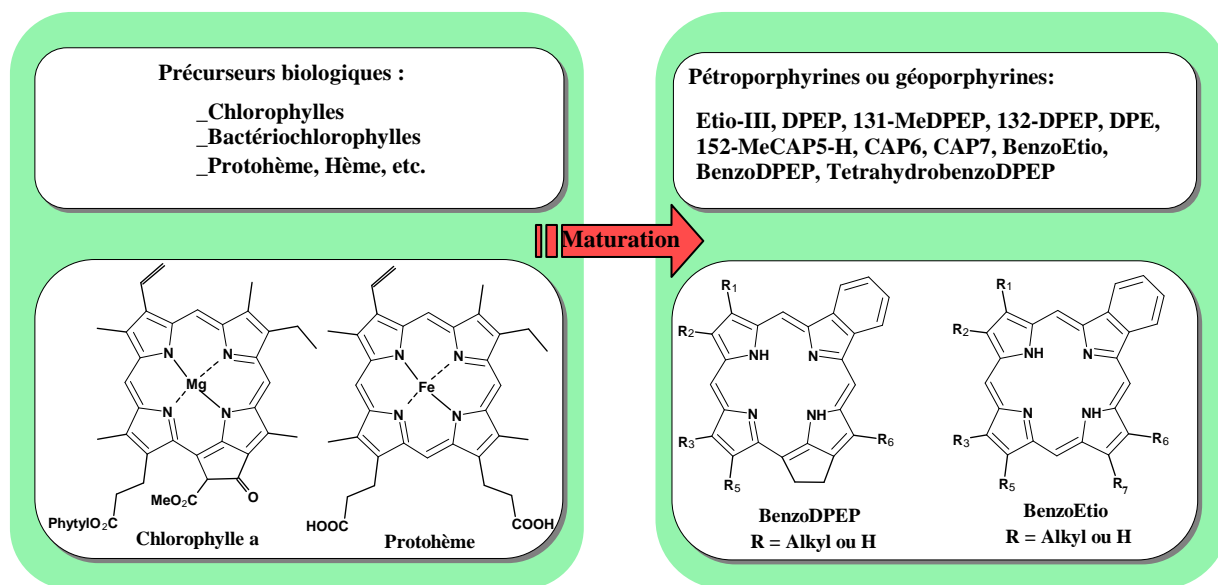


Figure I-7 : Formation de benzoporphyrines naturelles

Ce sont ces découvertes qui ont conduit aux premières synthèses de ces systèmes.

3. Synthèses et préparations

Au cours des 60 dernières années, l'intérêt (Chapitre I-5) pour les macrocycles tétrapyrroliques ne cessant d'augmenter, de nombreuses stratégies de synthèse ont été proposées. Ainsi deux grands types de porphyrines ont été développés, tels que les porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques, pour leurs structures semblables aux porphyrines naturelles, et les porphyrines substituées sur les positions *meso*. Dans ce qui suit, nous nous proposons de faire un tour d'horizon des grandes méthodes de synthèse de ces macrocycles tétrapyrroliques en insistant particulièrement sur l'élaboration de benzoporphyrines.

3-1 Méthode de synthèse des porphyrines

a) Synthèse de *meso*-porphyrines

En 1935, Rothemund¹⁰ décrit pour la première fois la synthèse d'une porphyrine symétrique substituée en position *meso*. En faisant réagir, sous atmosphère d'azote, l'éthanal et le pyrrole dans le méthanol à diverses températures, il a obtenu, avec de très faibles

¹⁰ P. J. Rothemund; *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 61, 2912-2915.

rendements, la *meso*-tétraméthylporphyrine. Dans les mêmes conditions opératoires, en utilisant différents aldéhydes, il a synthétisé diverses porphyrines portant comme substituants des groupes propyle, butyle, phényle ou encore 4-méthoxyphényle. En 1941, Rothemund¹¹ améliore les très faibles rendements obtenus jusqu'alors. Ainsi, en faisant réagir, dans une ampoule scellée, du pyrrole et du benzaldéhyde dans la pyridine à 220°C, il a obtenu la *meso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement de l'ordre de 5% (Figure I-8).

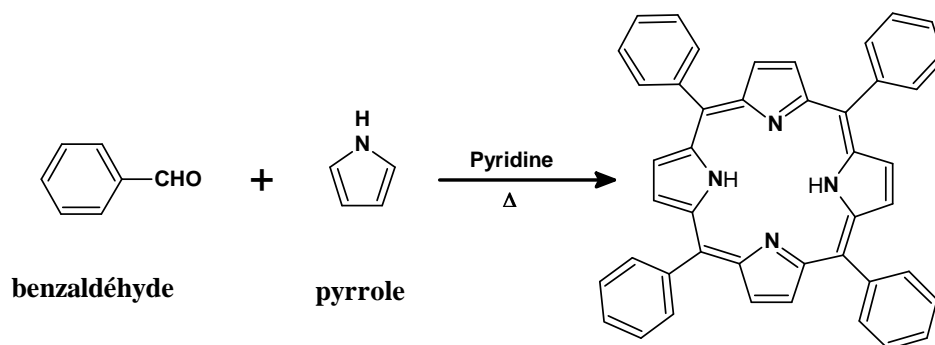


Figure I-8 : Méthode de Rothemund appliquée à la synthèse de la *meso*-tétraphénylporphyrine¹¹

Calvin et *coll.*¹² ont montré qu'il est possible dans les mêmes conditions de doubler le rendement en ajoutant au milieu réactionnel de l'acétate de zinc. De cette façon, ils ont synthétisé la *meso*-tétraphénylporphyrine métallée avec un rendement de 11%. Ces travaux sont les premiers d'une importante série de publications traitant des effets de la présence de métaux sur ce type de réaction. En 1967, Adler et Longo¹³ ont amélioré significativement la synthèse de porphyrines par condensation d'aldéhydes et de pyrrole. En condensant le benzaldéhyde et le pyrrole dans l'acide propionique à reflux dans un réacteur ouvert à l'air libre, ils ont formé la *meso*-tétraphénylporphyrine avec un rendement supérieur à 20%. La méthode de Adler-Longo, grâce à ces conditions de réactions plus douces, a permis d'accéder à un éventail beaucoup plus large de *meso*-porphyrines symétriques. En 1975, Little¹⁴ a adapté cette méthode à la synthèse de *meso*-arylporphyrines non symétriques. Cette méthode dite des "aldéhydes mixtes" consiste à condenser, dans l'acide propionique à reflux, du pyrrole et deux aldéhydes différents (Figure I-9). La stœchiométrie des aldéhydes initiaux permet d'accéder à des porphyrines mono, di ou trisubstituées.

¹¹ P. J. Rothemund, A. R. Menotti; *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 267-270.

¹² R. H. Ball, G. D. Dorough, M. Calvin; *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 2278-2281.

¹³ A. D. Adler, F. R. Longo, J. D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff; *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476.

¹⁴ R. G. Little, J. A. Anton, P. A. Loach, J. A. Ibers; *J. Heterocycl. Chem.*, **1975**, 12, 343-349.

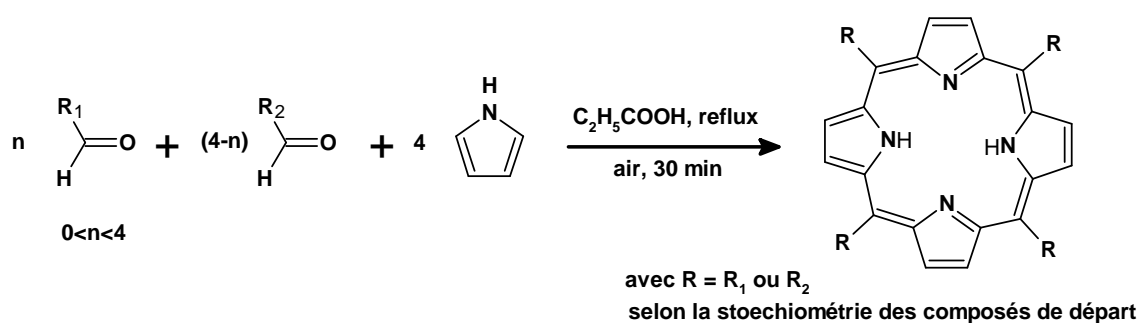


Figure I-9 : Méthode des aldéhydes mixtes¹⁴

En 1985, Gonsalves¹⁵ a montré qu'un mélange de pyrrole et d'alkylaldéhyde en présence d'acide trifluoroacétique en quantité catalytique conduisait à un porphyrinogène pouvant être oxydé en *meso*-tétraalkylporphyrine avec un bon rendement. En appliquant cette méthode, Lindsey¹⁶ a synthétisé un grand nombre de *meso*-tétraarylporphyrines. Ainsi, en utilisant du dichlorométhane sous courant d'argon et en présence d'acide de Lewis en quantité catalytique, il a obtenu, après oxydation par une quinone : le 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*para*-benzoquinone (DDQ), la tétraphénylporphyrine avec un rendement de 46% (Figure I-10).

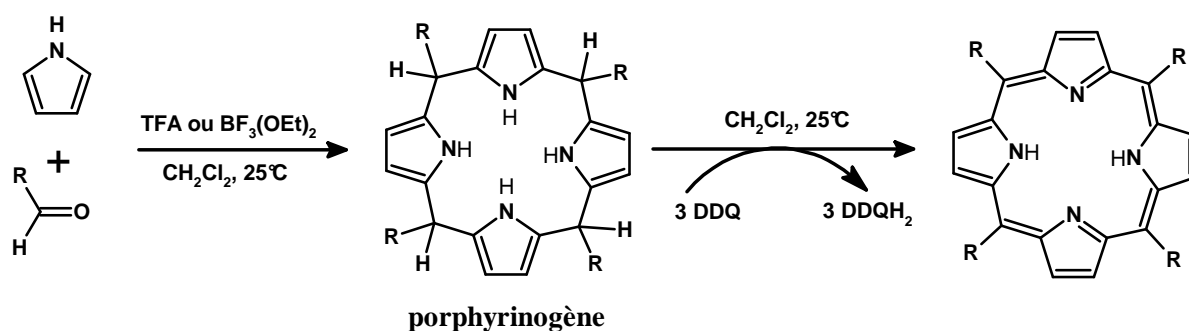


Figure I-10 : Méthode de Lindsey¹⁶

Depuis 1986, un très grand nombre de porphyrines symétriques a pu être synthétisé suivant ce protocole, les conditions douces de la méthode de Lindsey autorisant aussi l'emploi d'aldéhydes thermiquement peu stables. Les rendements optimaux ont été obtenus pour des concentrations en réactif de 10^{-2} mol.L⁻¹, c'est à dire en milieu dilué et en utilisant comme catalyseur le TFA (acide trifluoroacétique) ou le BF₃.Et₂O (trifluorure de bore - diéthyl éther).

¹⁵ A. M. A. R. Gonsalves, M. M. Pereira; *J. Heterocycl. Chem.*, **1985**, 22, 931-933.

¹⁶ J. S. Lindsey, H. C. Hsu, I. C. Schreiman; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969-4970.

✓ *Hypothèses mécanistiques*

La formation de porphyrines est une réaction acido-catalysée qui mène à un intermédiaire que l'on appelle le porphyrinogène qui doit être dans un second temps oxydé pour obtenir la porphyrine souhaitée. Le mécanisme proposé par Adler et Longo (Figure I-11) montre que lors de la condensation du pyrrole et de l'aldéhyde, l'espèce réactive est l'ion carbonium. Celui-ci est formé par l'attaque de l'aldéhyde protoné sur la position α du pyrrole, formant le pyrrole-carbinol, suivi de la perte d'une molécule d'eau. L'ion carbonium attaque ensuite la position α libre d'une autre molécule de pyrrole-carbinol pour former un dipyrrométhane-carbinol. Après perte d'une autre molécule d'eau, l'ion dipyrrométhane-carbonium correspondant va réagir sur une autre molécule de dipyrrométhane-carbonium pour former le porphyrinogène, qui est ensuite oxydé à l'air libre pour former la porphyrine correspondante.

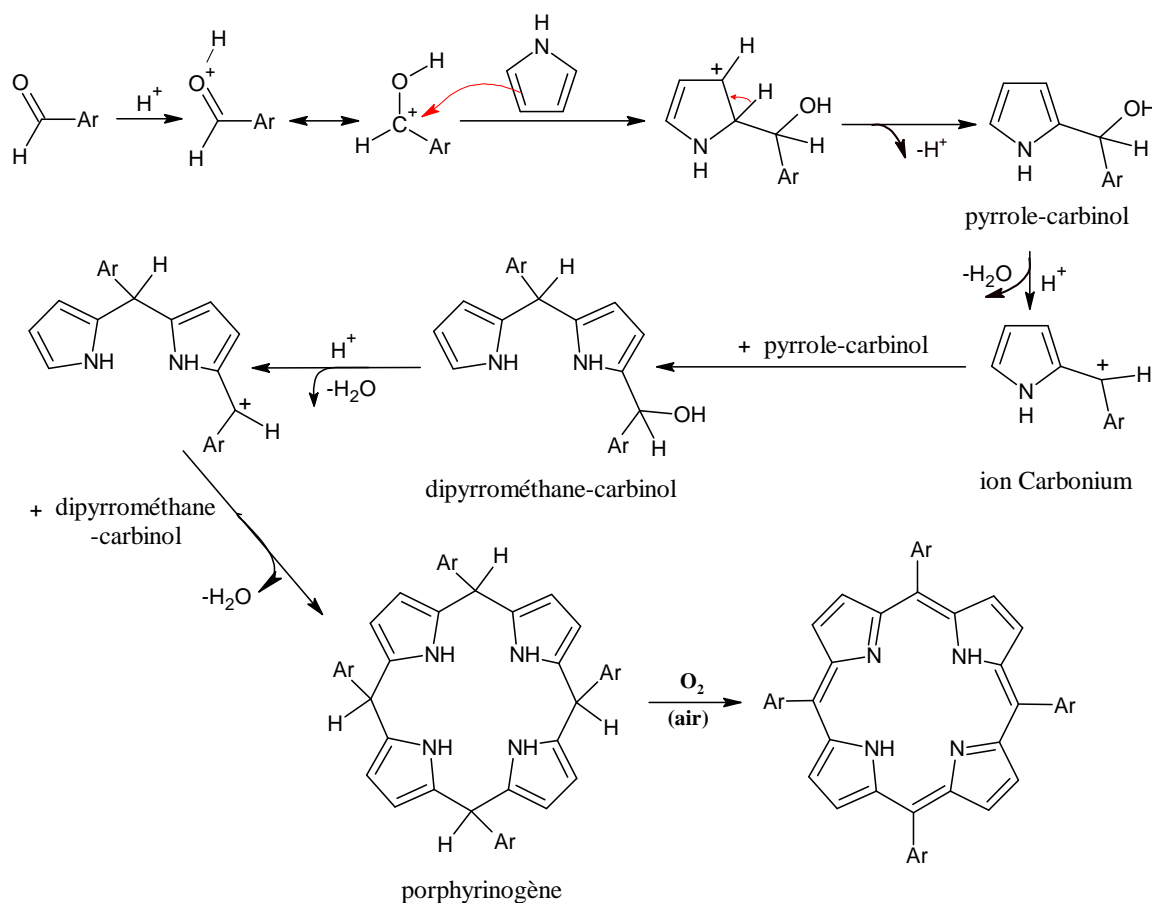


Figure I-11 : mécanisme de la synthèse d'une porphyrine proposé par Adler et Longo

En ce qui concerne le mécanisme proposé par Lindsey (Figure I-12), son début est identique à celui proposé par Adler et Longo et mène à l'intermédiaire dipyrrométhane-

carbinol. L'étape suivante consiste en la condensation successive d'unité pyrrole-carbinol menant à plusieurs oligomères. La cyclisation de l'oligomère tetrapyrrométhane-carbinol α -substitué conduit à la formation du porphyrinogène. La deuxième étape consiste en l'oxydation du porphyrinogène par le DDQ menant à la porphyrine correspondante. Ce mécanisme explique en partie les faibles rendements obtenus en synthèse de porphyrines par la trop grande proportion de différents polypyrrométhanes formés au cours de la réaction.

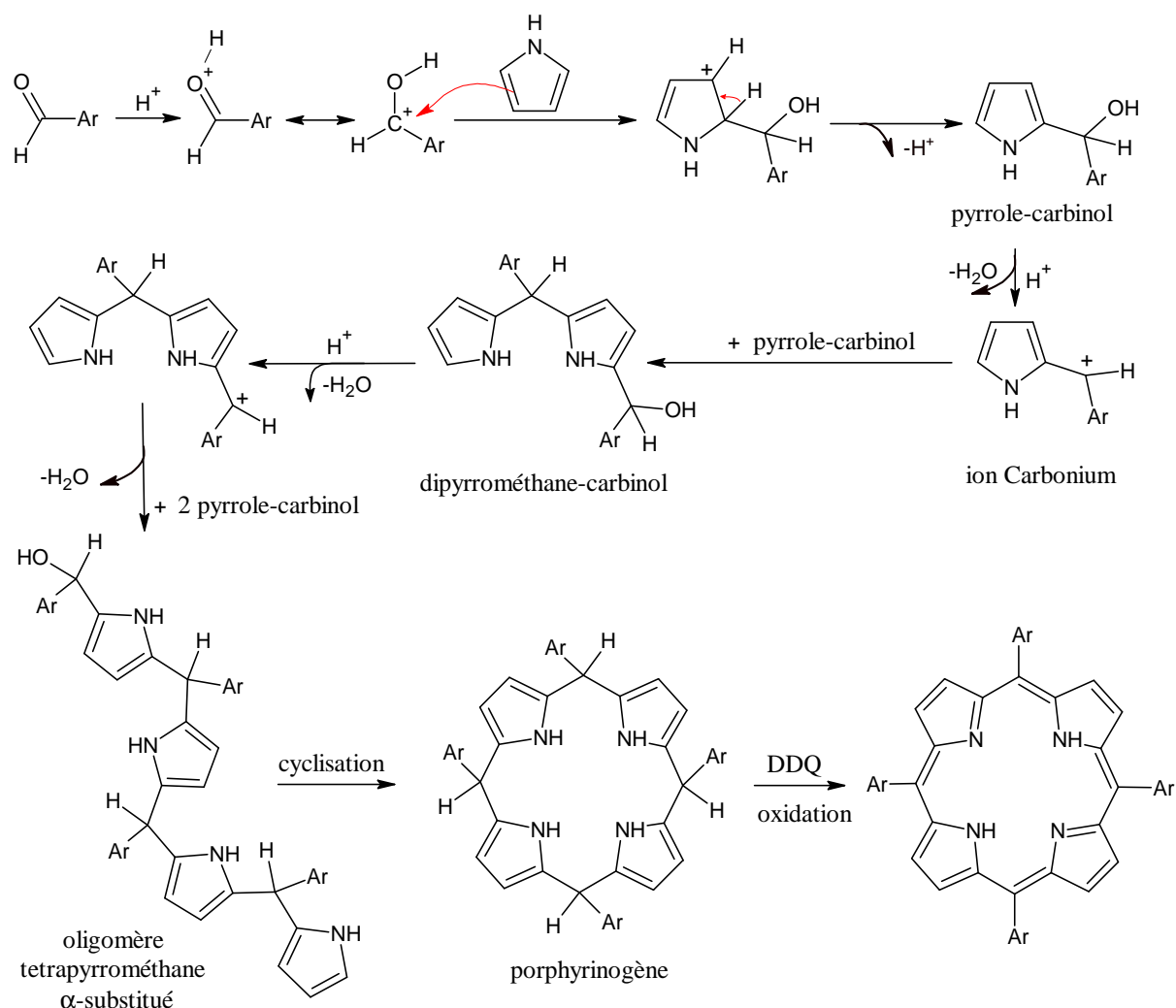


Figure I-12 : mécanisme de la synthèse d'une porphyrine proposé par Lindsey

Dans les deux hypothèses mécanistiques on a un départ de 4 molécules d'eau pendant le processus réactionnel.

Une autre approche permettant de former des macrocycles tétrapyrroliques consiste à utiliser comme précurseur des dipyrrométhanes. Dans les années 60, Woodward et

MacDonald ont synthétisé des porphyrines β -substituées par réaction d'un dipyrrométhane non substitué sur les positions 5 et 5' avec un 5,5'-bis-formyldipyrrométhane.¹⁷ La méthode de MacDonald, connue sous le nom de méthode " 2+2 ", conduit dans un premier temps à la formation d'un porphyrinogène qui est, dans un second temps, oxydé par une quinone (Figure I-13).

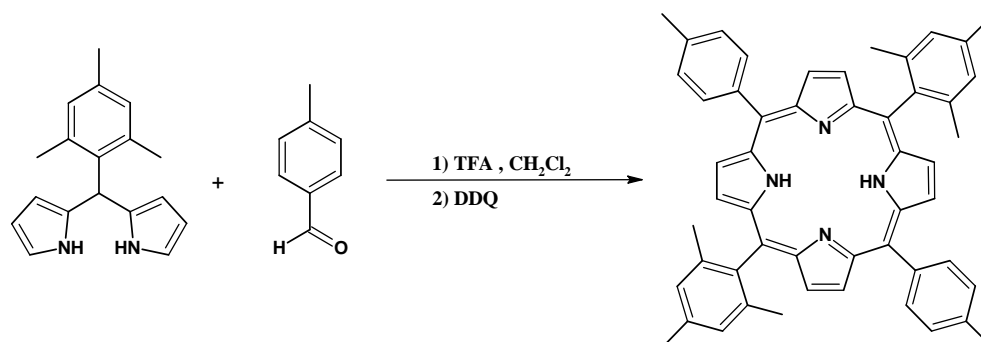


Figure I-13 : Adaptation de la méthode MacDonald " 2+2 " à la synthèse de *trans-meso*-porphyrines¹⁷

Cette stratégie a par la suite été très largement étudiée et appliquée à la synthèse de *meso*-porphyrines et plus particulièrement à la synthèse de *trans-meso*-porphyrines.

b) Synthèse de porphyrines β -substituées

L'une des principales stratégies de synthèse de porphyrines β -substituées s'inspire de celles utilisées pour la formation de *meso*-porphyrines, en utilisant des unités monopyrroliques substituées en position 3 et/ou 4. Ainsi, Treibs et Haberle¹⁸ ont obtenu l'octaméthylporphyrine par réaction de 3,4-diméthylpyrrole avec le formaldéhyde dans l'acide acétique en présence de pyridine avec un rendement de 77% (Figure I-14).

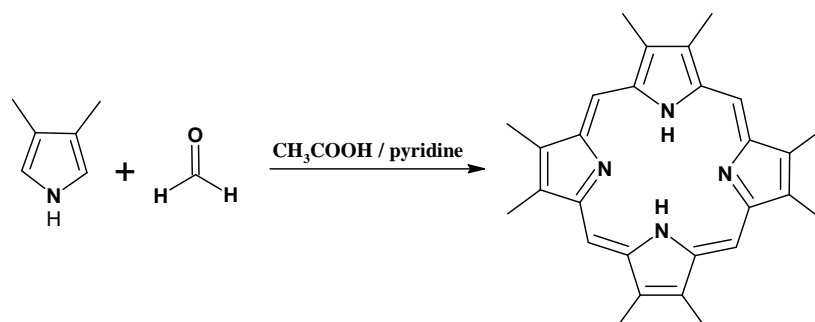
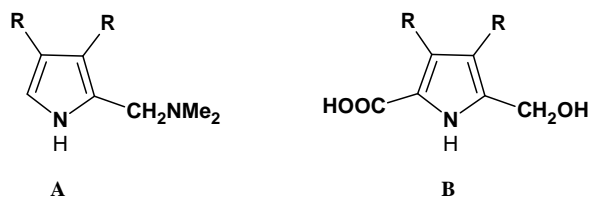


Figure I-14 : Synthèse de l'octaméthylporphyrine¹⁸

¹⁷ a) R. B. Woodward; *Angew. Chem.*, **1960**, 72, 651-662. b) R. B. Woodward; *Pure Appl. Chem.*, **1961**, 2, 383-404. c) G. P. Arsenault, E. Bullock, S. F. MacDonald; *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4384-4389.

¹⁸ A. Treibs, N. Haberle ; *Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 718, 183-207.

Une autre approche importante passe par la condensation de pyrroles substitués en position 2 et/ou 5. Ce type de réaction ne donne des résultats satisfaisants que si les deux positions β -pyrroliques sont substituées.



De cette façon, Siedel et Winkler¹⁹ ont synthétisé plusieurs porphyrines β -substituées en chauffant, à sec ou en solution, des pyrroles semblables au composé **B**. Par ailleurs, la condensation de pyrrole de type **A** suivie d'une oxydation par l'air permet d'obtenir des porphyrines symétriques avec de bons rendements.

En 1996, Smith²⁰ a présenté une nouvelle méthode permettant d'obtenir, à partir d'unités monopyrroliques, des octaalkylporphyrines symétriques isomériquement pures portant deux types de substituants différents (Figure I-15).

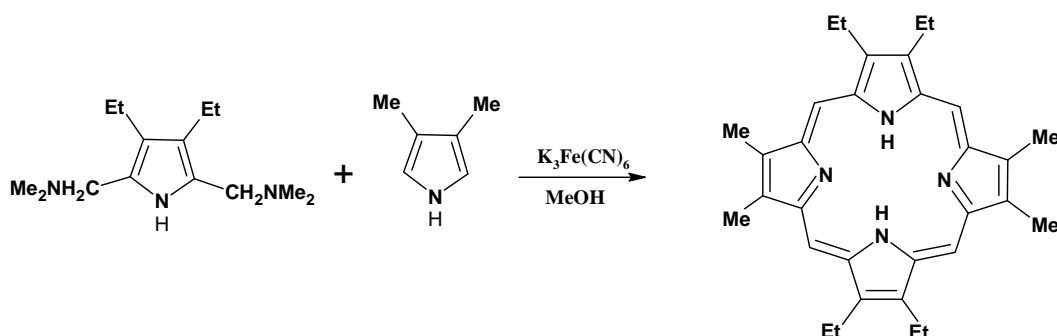


Figure I-15 : Synthèse de la tétraéthyl-tétraméthylporphyrine²⁰

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

Une autre voie propre à la synthèse de porphyrines centrosymétriques ou ayant une symétrie dans l'une ou l'autre moitié de la molécule utilise des intermédiaires de type dipyrrométhène ou dipyrrométhane. De la sorte l'équipe de Fischer²¹ a synthétisé, dans les

¹⁹ W. Siedel, F. Winkler; *Liebigs Ann. Chem.*, **1943**, 54, 162-201.

²⁰ L. T. Nguyen, M. O. Senge, K. M. Smith; *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 998-1003.

²¹ H. Fischer, H. Friedrich, W. Lamatsch, K. Morgenroth; *Techn. Hochschule, Munchen. Ann.*, **1928**, 466, 147-178.

années 1920-1930, de nombreuses porphyrines β -substituées à partir de dipyrrométhènes dans des solvants organiques acides à des températures supérieures à 200°C (Figure I-16).

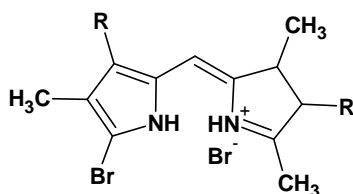


Figure I-16 : Dipyrrométhènes utilisés par Fischer²¹

En 1960, Woodward et MacDonald ont utilisé comme précurseurs des unités dipyrrométhane. La méthode "2+2", que nous avons décrite précédemment pour la synthèse de *meso*-porphyrines, est souvent préférée à celle de Fischer pour ses conditions réactionnelles plus douces. Ces dernières années, une nouvelle approche nommée "3+1" est apparue. Celle-ci consiste à condenser un tripyrrane sur un diformyl-pyrrole (Figure I-17).

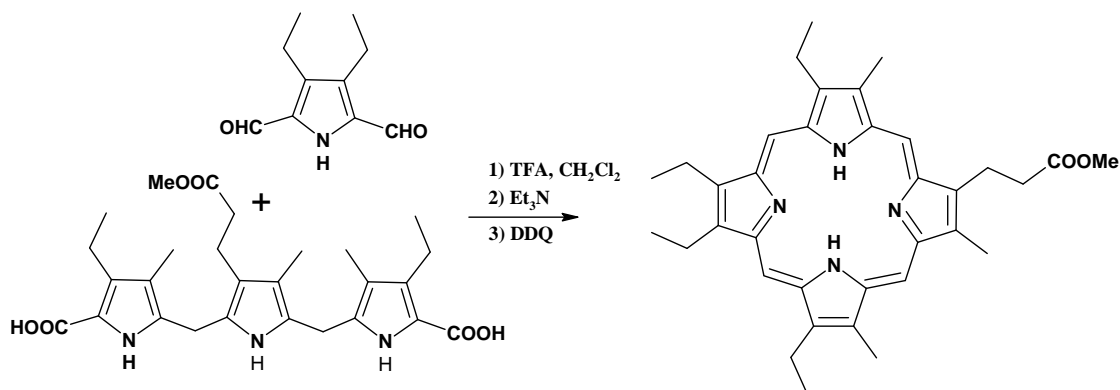


Figure I-17 : Exemple de synthèse par la méthode "3+1" ²²

Par cette méthode, il est possible de former des porphyrines β -substituées mono- ou di-fonctionnalisées sur le même pyrrole avec des rendements de l'ordre de 35%.²²

c) Cas particulier des benzoporphyrines

Rappelons que le squelette tétrabenzoporphyrinique possède quatre positions *meso* non-substituées, comme la porphine ou les octaalkylporphyrines, et quatre unités benzo-pyrroles, comme des phthalocyanines (Figure I-18).

²² J. L. Sessler, J. W. Genge, A. Urbach, P. Sansom; *Synlett*, **1996**, 2, 187-188.

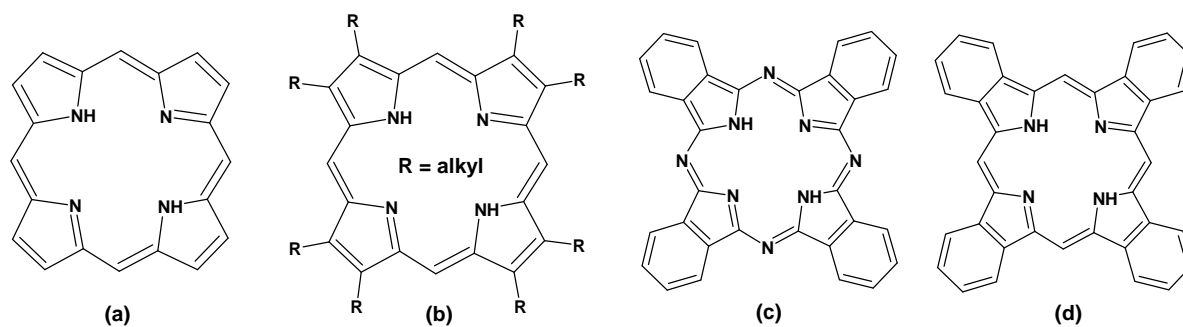


Figure I-18 : (a) Porphine ; (b) Octaalkylporphyrines ; (c) Phtalocyanine ; (d) Tétrabenzoporphyrine

✓ *Synthèses de tétrabenzoporphyrines non-substituées*

Les tétrabenzoporphyrines peuvent être préparées par diverses méthodes. Vers la fin des années 1930, la tétrabenzoporphyrine chélatée par un métal a été pour la première fois synthétisée par Helberger et *coll.*²³ à partir du *o*-cyanoacétophénone et diverses phtalimides. En raison de leur structure proche avec les phtalocyanines, Linstead et *coll.*²⁴, en 1950, ont étudié ces colorants tétrapyrroliques. Ils ont obtenu, tout d'abord, la tétrabenzoporphyrine de zinc impure par réaction de l'acide *o*-cyanocinnamique avec un sel de zinc à haute température. Par la suite, cette réaction a été améliorée en utilisant l'acétate de zinc avec la 3-carboxyméthylphtalimide à température élevée (Figure I-19).²⁵

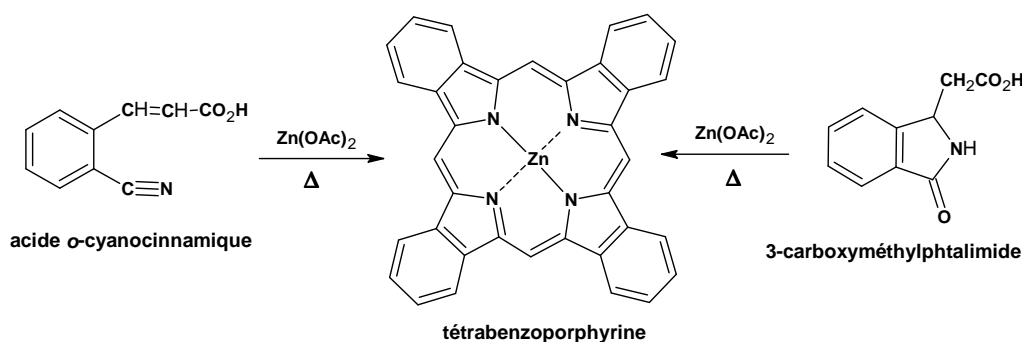


Figure I-19 : Méthode de Linstead appliquée à la synthèse de la tétrabenzoporphyrine²⁴⁻²⁵

²³ a) J. H. Helberger; **1937**, 529, 205. b) J. H. Helberger; von A. Rebay; *Ibid.*, **1937**, 531, 279. c) J. H. Helberger; von A. Rebay, D. B. Hever; *Ibid.*, **1938**, 533, 197. d) J. H. Helberger, D. B. Hever; *Ibid.*, **1938**, 536, 173.

²⁴ P. A. Barrett, R. P. Linstead; F. G. Rindall, G. A. P. Tuoy; *J. Chem. Soc.*, **1940**, 1079-1092.

²⁵ R. P. Linstead, F. T. Weiss; *J. Chem. Soc.*, **1950**, 297-2981.

Puis dans les années 1970, Bonnett et *coll.*²⁶ ont préparé l'octaméthyl-benzoporphyrine par pyrolyse de la tétraméthylisoindeole via un sel métallique (Figure I-20).

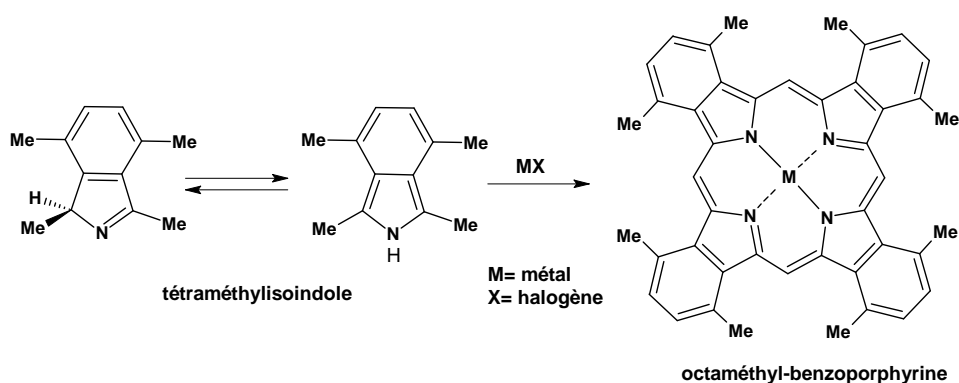


Figure I-20 : Méthode de Bonnett appliquée à la synthèse de l'octaméthyl-benzoporphyrine²⁶

Quelques années après, Vogler et Kunkely²⁷ ont obtenu la tétrabenzoporphyrine par la réaction de l'acide 2-acétylbenzoïque avec l'acétate de zinc en présence d'ammoniaque et d'un tamis moléculaire à 400°C (Figure I-21).

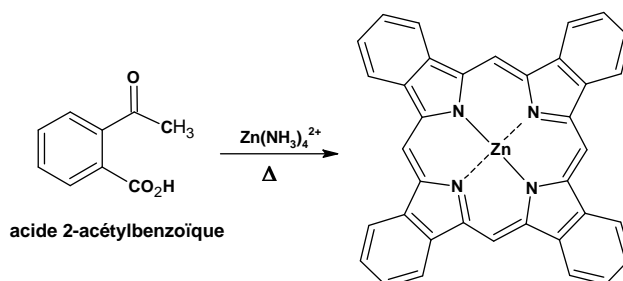


Figure I-21 : Méthode de Volger et Kunkely appliquée à la synthèse de la tétrabenzoporphyrine²⁷

Suite à ces travaux, une nouvelle synthèse, réalisée par Kopranenkov et *coll.*²⁸, utilise le phtalimide ou son sel de potassium qui, condensé avec l'acétate de sodium ou l'acide

²⁶ a) C. O. Bender, R. J. Bonnett; *Chem. Soc.(C)*, **1968**, 3036-40. b) C. O. Bender, R. Bonnett, R. G. Smith; *Ibid.*, **1970**, 1251-1257. c) C. O. Bender, R. Bonnett, R. G. J. Smith; *Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1972**, 771-776.

²⁷ A. Vogler, H. Kunkely; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, 17, 760.

²⁸ a) V. N. Kopranenkov, A. M. Vorotnikov, T. M. Ivanova, E. A. Luk'yanet's; *Chem. Heterocyclic Comp.*, **1988**, 24, 1120-1125. b) V. N. Kopranenkov, E. A. Makarova, S. N. Dashkevich, E. A. Luk'yanet's; *Chem. Heterocyclic Comp.*, **1988**, 24, 630-637. c) V. N. Kopranenkov, E. A. Makarova, E. A. Luck'yanet's; *Chem. Heterocyclic Comp.*, **1988**, 24, 394-398.

malonique en présence d'acétate de zinc à 340-360°C, conduit à la tétrabenzoporphyrine. Son schéma réactionnel est illustré au travers de la figure I-20.

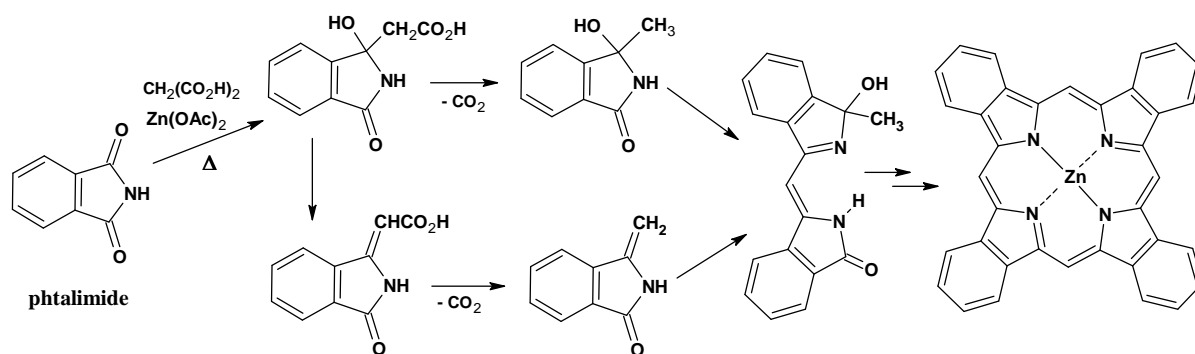


Figure I-22 : Synthèse de la tétrabenzoporphyrine à partir du phthalimide²⁸

Quant à Rémy²⁹, il a obtenu la tétrabenzoporphyrine par réaction de type Rothmund (Chapitre I-3-1-a), en faisant réagir l'isoindole avec le formaldéhyde à haute température (Figure I-23).

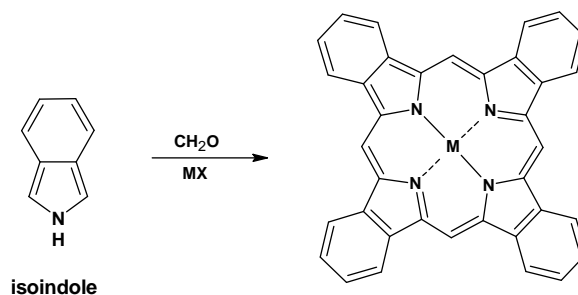


Figure I-23 : Méthode de Rémy appliquée à la synthèse de la tétrabenzoporphyrine²⁹

En raison de leur faible solubilité et par la présence d'impuretés persistantes de type porphyrine, ces réactions ne permettent pas d'obtenir le produit désiré rigoureusement pur.³⁰ Ces problèmes peuvent être surmontés en introduisant des substituants afin d'augmenter leur solubilité, tels que la tétra-*tert*-butyltétrabenzoporphyrine³¹ ou des structures polyalkylées³².

²⁹ D. E. Remy; *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 1451-1454.

³⁰ a) L. Edwards, M. Gouterman, C. B. Rose; *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 7638-7641. b) K. Liou, T. P. Newcomb, M. D. Heagy, J. A. Thompson, W. B. Heuer, R. L. Musselman, C. S. Jacobsen, B. M. Hoffman, J. A. Ibers; *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 4517-4523. c) R. B. M. Koehorst, J. F. Kleibeuker, T. J. Schaafsma, D. A. de Bie, B. Geurtsen, R. N. Henrie, H. C. van der Plas; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1981**, 1005-1009.

³¹ N. Zh. Mamardashvili, A. S. Semeikin, O. A. Golubchikov; *Russ. J. Org. Chem.* **1994**, 30, 770-773.

³² Y. Matsuzawa, K. Ichimura, K. Kudo; *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 277, 151-156.

La méthode "hautes températures en présence d'acétate de zinc" a été également employée pour préparer le dimère tétrabenzoporphyrinique (Figure I-24).³³

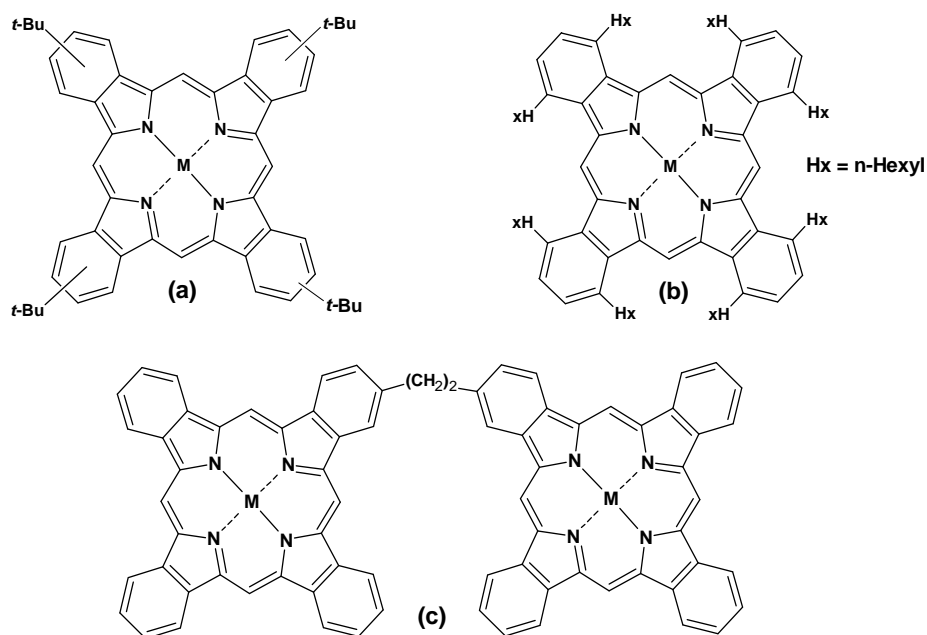


Figure I-24 : (a) Tétratert-butyltétrabenzoporphyrine³¹ ; (b) Exemple de structure polyalkylée³² ; (c) Dimère tétrabenzoporphyrinique³³

Ces dernières années, des méthodes plus douces de synthèse (Figure I-25) ont été mises au point par Cavaleiro et *coll.*³⁴ qui ont utilisé la condensation pyrrolique de Barton-Zard³⁵ (Chapitre II-3-2) sur un dérivé du vinylsulfone pour préparer le 3-sulfolène.³⁶ Celui-ci subit alors une élimination chélotropique de la fonction sulfone puis une cycloaddition de type Diels-Alder par chauffage avec la phénylvinylsulfone pour donner les isomères tétrahydroisindoles avec un rendement de 62%.³⁴ La réduction de l'ester avec l'hydrure de lithium aluminium (LiAlH_4), suivie d'une cyclotétramérisation dans l'acide acétique et d'une oxydation avec le DDQ, donne le mélange d'isomères de phénylesulfonylporphyrine avec un rendement de 60%. L'élimination de quatre unités de phénylesulfinate, suivie d'une déshydrogénation par le DDQ à reflux dans le toluène, fournit la tétrabenzoporphyrine avec un rendement global de 55%.³⁴

³³ A. M. Vorotnitkov, V. N. Kopranev, E. A. Khim. Luk'yanet's; *Geterotsikl. Soedin.*, **1994**, 36-39.

³⁴ M. G. H. Vicente, A. C. Tomé, A. Walter, J. A. S. Cavaleiro; *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3639-3642.

³⁵ D. H. R. Barton, J. Kervagoret, S. Z. Zard; *Tetrahedron*, **1990**, 46, 7587-7598.

³⁶ a) D. P. Arnold, L. Burgess-Dean, J. Hubbard, M. A. A. Rahman; *J. Chem.* **1994**, 47, 969-974. b) G. Haake, D. Struve, F. P. Montforts, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 9703-9704.

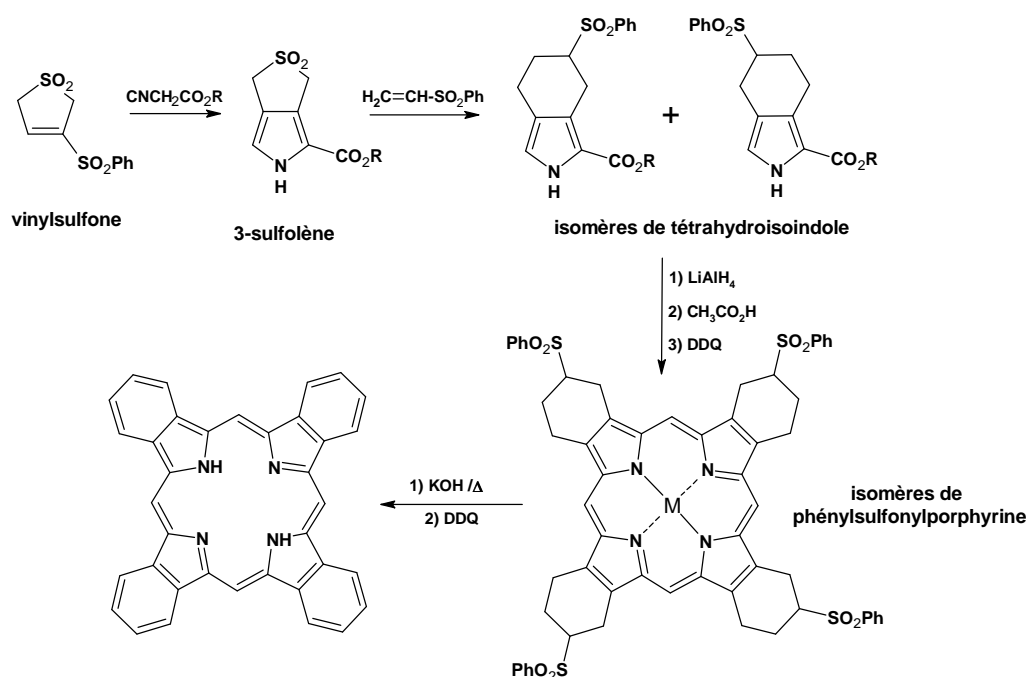


Figure I-25 : Méthode de Cavaleiro appliquée à la synthèse de la tétrabenzoporphyrine³⁴

Ono et *coll.*³⁷, quant à eux, ont obtenu le 4,7-dihydro-4,7-éthano-2H-isoindole en deux étapes à partir du 1,3-cyanohexadiène, du β -sulfonylnitroéthylène et de l'isocynoacétate éthylique, et ont employé cette structure comme synthon à la place de l'isoindole dans la synthèse des benzoporphyrines (Figure I-26).

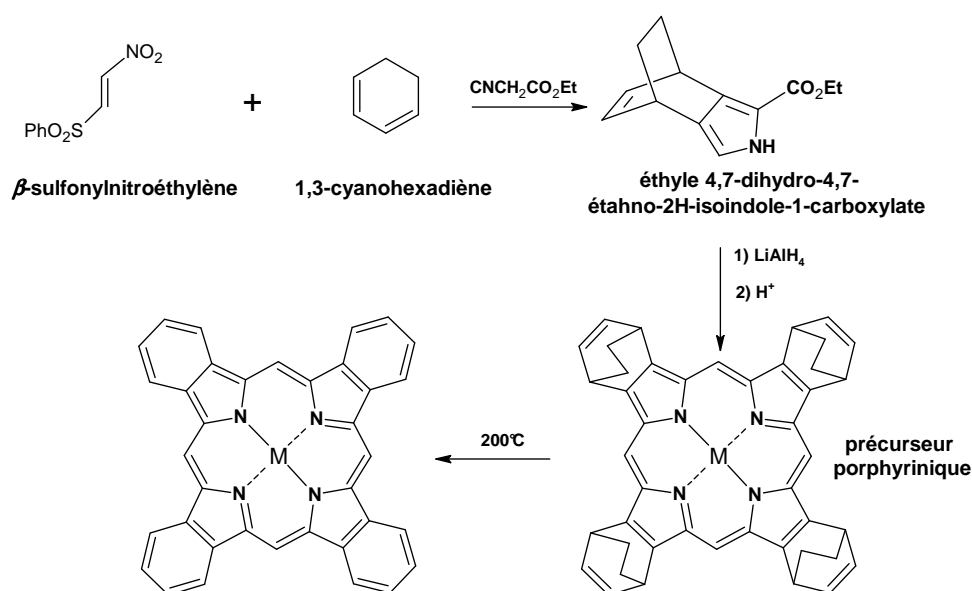


Figure I-26 : Méthode de Ono appliquée à la synthèse de la tétrabenzoporphyrine³⁷

³⁷ S. Ito, T. Murashima, H. Uno, N. Ono; *Chem. Commun.*, **1998**, 1661-1662.

La réduction de l'ester par du LiAlH_4 suivie d'une cyclisation du tétramère, catalysée en milieu acide, conduit au précurseur porphyrinique avec un rendement de 30%. La tétrabenzoporphyrine est obtenue par chauffage à 200°C .³⁷

✓ *Synthèses de tétrabenzoporphyrines meso-substituées*

Une classe intéressante de composés est obtenue en combinant les principes structuraux de la tétraarylporphyrine avec ceux de la tétrabenzoporphyrine, soit une porphyrine contenant des cycles benzéniques fusionnés en β . Ceci mène à des porphyrines dodéca-substituées du type *meso*-tétraaryltétrabenzoporphyrine. La plus représentative, pour laquelle plusieurs synthèses ont été décrites, est la Zn^{II} (5,10,15,20-tétraaryltétrabenzoporphyrines) (Figure I-27).

Kropanenkov et *coll.*³⁸ ont décrit l'utilisation du 3-benzylidène-phthalimide ou d'une combinaison du phthalimide de potassium et l'acide de phénylacétique avec de l'acétate de zinc à des températures élevées (360°C). Quant à Rémy et *coll.*²⁹, ils ont utilisé la réaction de l'isoindole avec du benzaldéhyde et de l'acétate de zinc à la même température (360°C). Elle est obtenue aussi à 360°C , selon la méthode de Ono et *coll.*³⁹, par réaction de l'acide phénylacétique et du phthalimide (Figure I-27).

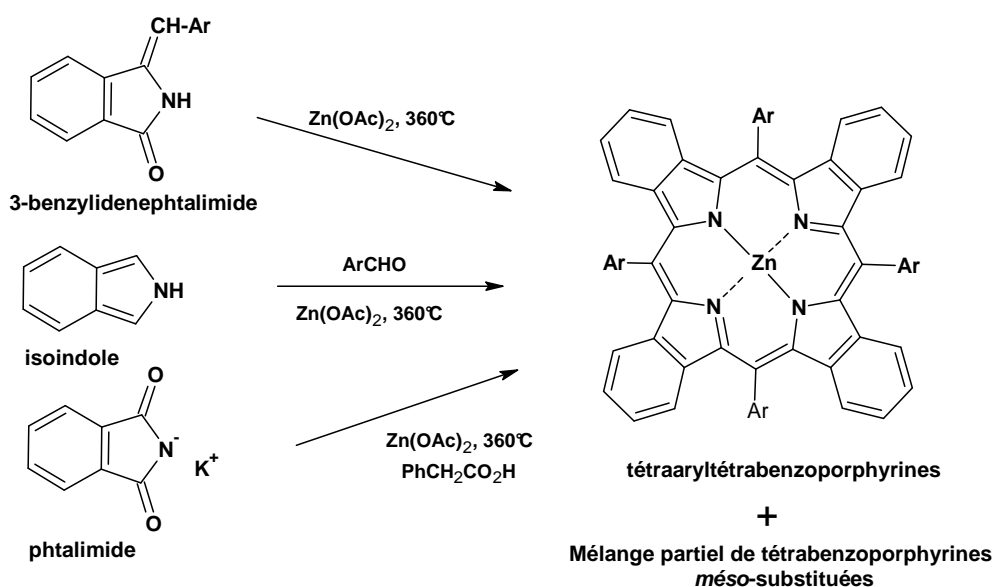


Figure I-27 : Synthèse de la *meso*-tétraaryltétrabenzoporphyrine^{29, 38, 39}

³⁸ a) V. N. Koproanekov, S. N. Dashkevich, E. A. Luk'yanet's; *J. Gen. Chem. USSR*, **1981**, 51, 2165. b) S. A. Vinogradov, D. F. Wilson; *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1995**, 103-111.

³⁹ K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, Y. Toba, M. Fukui, O. Ohno; *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 186, 95-101.

La molécule chélatée par le zinc a été obtenue avec un rendement d'environ 10%. Un examen plus détaillé des produits bruts obtenus lors de ces réactions a établi qu'ils se composent de mélange de benzoporphyrines partiellement substituées en *meso* telles que la di et la triarylbenzoporphyrine.⁴⁰ Toutefois, l'utilisation du benzoate de zinc(II) au lieu de l'acétate de zinc en tant qu'agent de chélation lors de la cyclisation du tétramère permet de surmonter ce problème.⁴¹ D'autres *meso*-substituants tels que les groupements *p*-tolyl et *p*-anisyl pourraient être incorporés par des méthodes similaires.

Récemment, une approche synthétique complètement différente a été rapportée par Ono et coll.³⁷ (Figure I-28). Ils ont préparé un dérivé de l'isoindole, obtenu en traitant l'éthyle 4,7-dihydro-4,7-éthano-2H-isoindole-1-carboxylate avec de l'hydroxyde de potassium en présence d'éthylène glycol à 170°C, qui en présence d'aldéhydes aromatiques dans les conditions de Lindsey (Chapitre I-3) produit des précurseurs tétraarylporphyriniques avec des rendements avoisinant les 25 à 35%. Après chauffage à 200°C, les tétraaryltétrabenzoporphyrines (Ar = Ph ou 2-thiènyle) ont été isolées. Cette nouvelle méthodologie, relativement douce, augmente considérablement l'accessibilité vers de nouvelles tétrabenzoporphyrines peu étudiées.

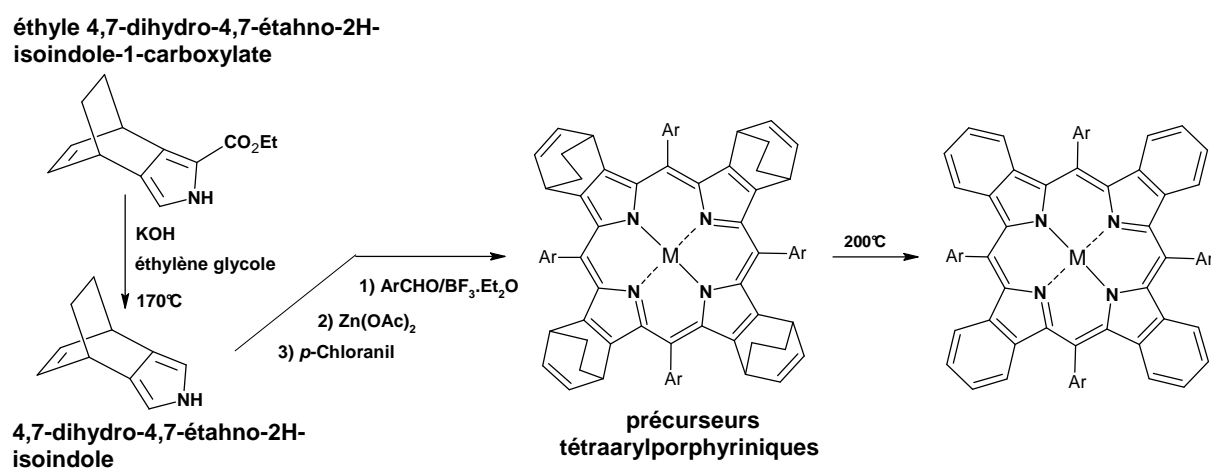


Figure I-28 : Méthode de Ono appliquée à la synthèse de la tétraaryltétrabenzoporphyrine³⁷

⁴⁰ a) K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, M. Fukui, O. Ohno; *Inorg. Chim. Acta* **1990**, 176, 31-33. b) M. Yasuike, K. Koseki, T. Yamaoka, K. Ichimura, M. Sakuragi, O. Ohno, *Ibid.*, **1991**, 183, 9-13. c) M. Yasuike, T. Yamaoka, O. Ohno, K. Ichimura, H. Morii, M. Sakuragi, *Ibid.*, **1991**, 185, 39-47. d) R. J. Cheng.; Y. R. Chen, C. E. Chuang; *Heterocycles*, **1992**, 34, 1-4.

⁴¹ K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, M. Fukui, O. Ohno; *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 182, 83-86.

Les méthodes de synthèse de benzoporphyrines utilisées par Cavaleiro et *coll.* ainsi que par Ono et *coll.* emploient un protocole exigeant la présence d'un groupement activant spécifique permettant l'aromatisation des cyclohexanes. Celui-ci, éliminé par la suite, limite toutefois le choix des substituants fixés sur le macrocycle. Cette restriction majeure se retrouve également dans les synthèses de Kropanenkov et *coll.* par l'utilisation de températures élevées.

L'oxydation directe des cyclohexanes portés par les pyrroles pour obtenir l'analogue benzoporphyrinique n'a été décrite et utilisée que récemment par Vinogradov et *coll.*⁴² (Figure I-29).

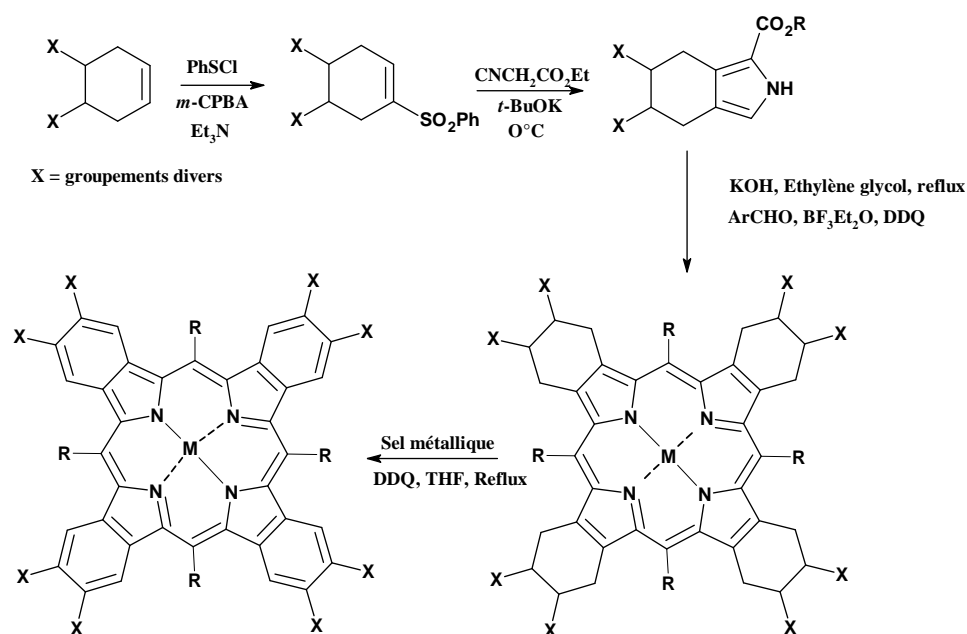


Figure I-29 : Méthode de Vinogradov appliquée à la synthèse des tétraaryltétrabenzoporphyrines⁴²

Cette méthode permet ainsi la synthèse de macrocycles mono, di, tri et tétrabenzoporphyriniques portant des substituants plus variés. Notre travail s'appuie sur cette méthode, efficace et fonctionnelle, décrite plus précisément au cours du chapitre suivant.

⁴² (a) O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, I. P. Beletskaya, S. A. Vinogradov; *Chem. Commun.*, **2001**, 261-262. b) O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, P. J. Carroll, S. A. Vinogradov; *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 7517-7520. c) O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, I. P. Beletskaya, P. J. Carroll, S. A. Vinogradov; *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 522-535.

3-1 Méthode de synthèse des dérivés de porphyrines

L'étude de dérivés de porphyrine, tels que la vitamine B₁₂ et les chlorophylles, a conduit de nombreux groupes de recherches à se pencher sur leurs synthèses. Nous présentons ici, à titre d'exemple, quelques synthèses de chlorines. Celles-ci nécessitent au préalable la formation de leur analogue porphyrinique, selon les méthodes énoncées précédemment. Dans les années 40, Fischer⁴³ a décrit l'oxydation des octa-alkylporphyrines par le tétraoxyde d'osmium (OsO₄). Cette réaction passe par un ester cyclique hydrolysé en milieu réducteur par l'hydruire de soufre, afin d'obtenir la dihydrochlorine correspondante. Cette méthode permis à Brückner et Dolphin⁴⁴ de synthétiser la *meso*-2,3-dihydroxytétraphénylchlorine (Figure I-30).

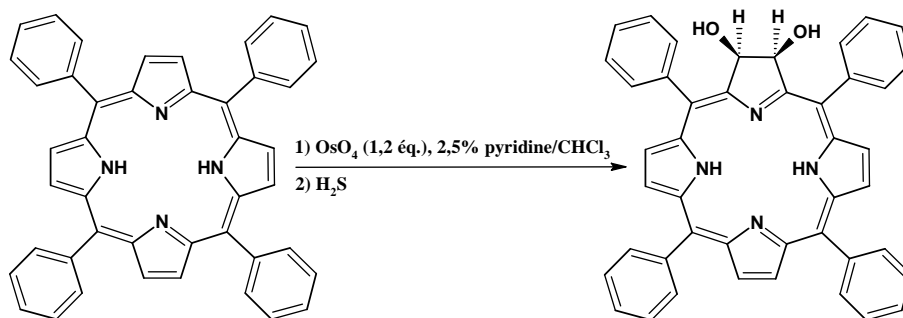


Figure I-30 : Synthèse de la *meso*-2,3-dihydroxytétraphénylchlorine⁴⁴

Il est également possible de préparer ces molécules par réduction des porphyrines par un hydrazide, mettant en jeu un intermédiaire réactionnel : le diimide. Le mécanisme de l'hydrogénation d'une double liaison par le diimide est une cycloaddition *syn*. Il en résulte un mécanisme concerté orchestré par les deux hydrogènes en position *cis* du diimide (Figure I-31).

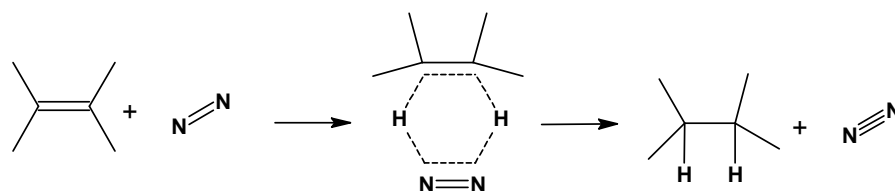


Figure I-31 : Mécanisme de réduction par le diimide

⁴³Fisher, H. Pfeiffer ; *Liebigs Ann. Chem.*, 556, **1944**, 131-153.

⁴⁴ C. Brückner, D. Dolphin ; *Tetrahedron Lett.*, 36(19), **1995**, 3925-3928, 24.

La réduction d'une double liaison, appliquée aux porphyrines, a permis à Withlock⁴⁵ de synthétiser des chlorines et des bactérochlorines à partir de la tétraphénylporphyrine et de l'octaéthylporphyrine. Il a utilisé, pour cela, un précurseur de diimide : le *para*-toluènesulfonylhydrazide. Il est généralement connu que la décomposition thermique d'arènesulfonylhydrazide produit le réactif azoté (diimide) responsable de l'hydrogénation. (Figure I-32).

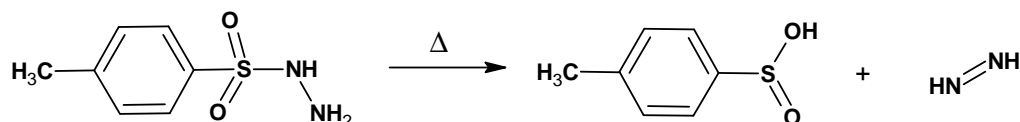


Figure I-32 : Décomposition thermique d'arènesulfonylhydrazide.

Ce procédé a permis à Bonnett et coll.⁴⁶ de synthétiser la *mé*ta-tétrahydroxyphénylchlorine (Figure I-33).

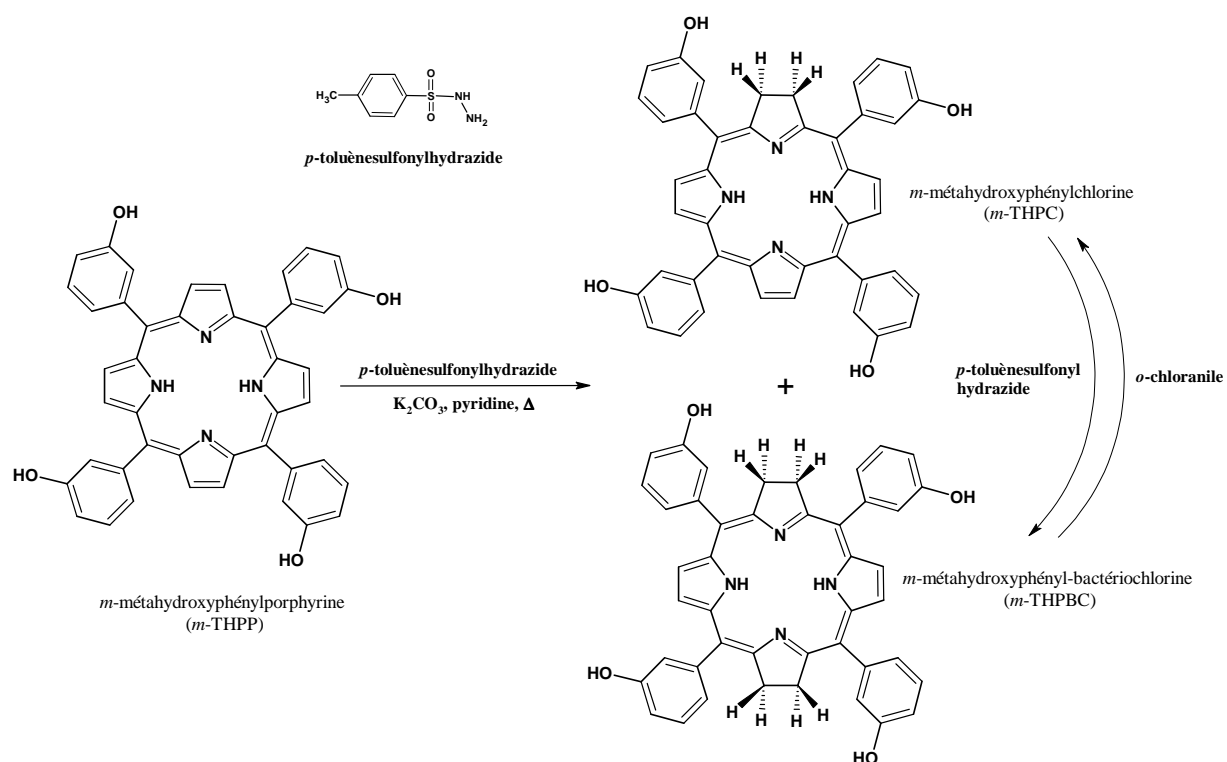


Figure I-33 : Synthèse de la *mé*ta-tétrahydroxyphénylchlorine (*m*-THPC)⁴⁶

⁴⁵ H.W. Whitlock, R. Hanauer, M.Y. Oester, B.K. Bower ; *J. Org. Chem.*, 33(5), **1968**, 2169-2171.

⁴⁶ R. Bonnet, M.J. Dimsdale, G.F. Stephenson ; *J. Chem. Soc.*, **1969**, 564-570, 25.

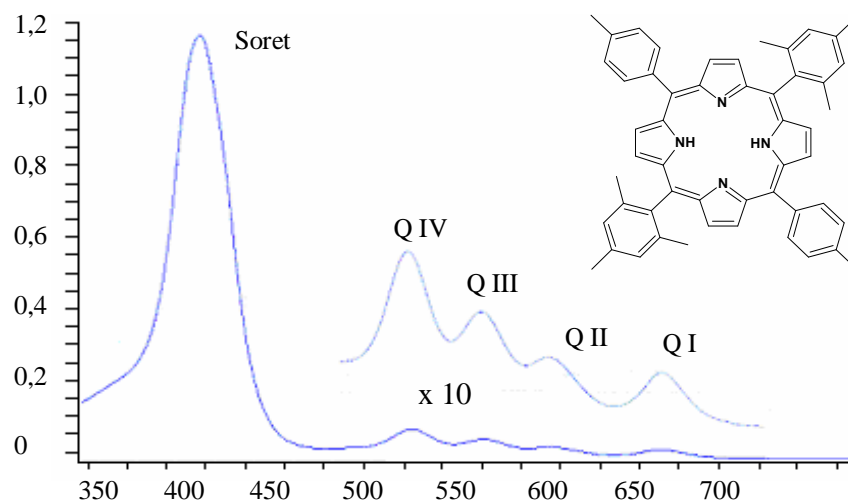
Le produit nouvellement formé peut à nouveau subir une réduction, en présence de *p*-toluènesulfonylhydrazine, pour fournir la bactériochlorine correspondante. Toutefois cette dernière étape est réversible en présence d'un oxydant doux, comme le chloranile.

4. Caractérisations

4-1 Spectroscopie UV-visible

Comme nous l'avons indiqué précédemment, les porphyrines et leurs dérivés possèdent un système d'électrons π fortement conjugué. Ces molécules absorbent donc dans le domaine du visible et présentent des spectres d'absorption très caractéristiques qui sont fonction de la structure et de la présence ou non d'un métal.

Le spectre UV-visible des porphyrines se compose d'une bande intense ($\epsilon > 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret (ou bande B), caractéristique de tous les tétrapyrroles cycliques conjugués, et de quatre bandes de moindre intensité aux plus grandes longueurs d'ondes (entre 500 et 680 nm) nommées bandes Q (Figure I-34).



La région du spectre située dans le domaine du visible, généralement sensible aux variations de structure, renseigne sur la substitution du macrocycle. En effet, les quatre bandes Q, numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités

relatives varier notablement en fonction de la nature et de la position des substituants.² Ainsi quatre types de spectre se distinguent et sont appelés : *etio*, *rhodo*, *oxorhodo* et *phyllo* (Figure I-35).³

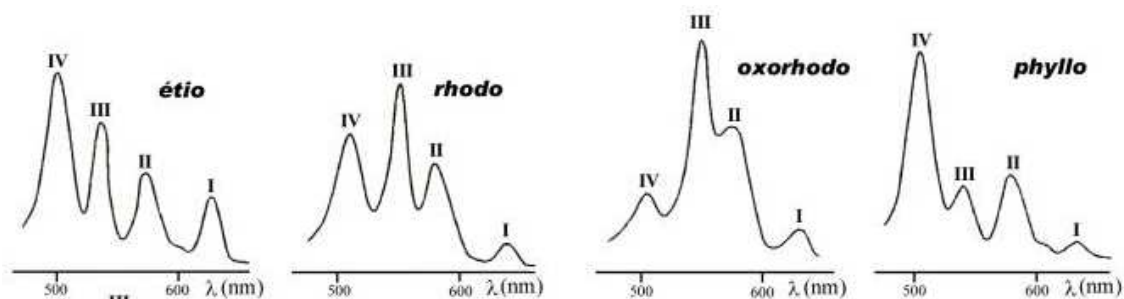


Figure I-35 : Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres d'absorption de porphyrines bases libres

Le type *etio* est principalement rencontré dans le cas de porphyrines β -substituées par au moins 6 groupements, ou dans le cas de la plupart des *meso*-arylporphyrines. Si ces dernières portent un substituant saturé (par exemple une chaîne alkyle) à la place de l'aryle, elles auront généralement un spectre de type *phyllo*. La présence de groupements riches en électrons (carbonyle...) π en position β -pyrrolique génère un profil de spectre de type *rhodo*, alors que la présence de deux de ces mêmes groupements en position β -pyrrolique sur deux pyrroles opposés conduit plutôt à un spectre de type *oxorhodo*.

Dans le cas des porphyrines métallées ou protonées, la présence de la bande de Soret est toujours observée contrairement au nombre de bandes Q pouvant être réduites à deux ou trois en fonction de la nature du métal et de son degré d'oxydation. Ces dernières sont nommées α et β en partant des grandes longueurs d'onde (Figure I-36). Dans ce cas, la substitution du macrocycle a très peu d'influence sur les intensités relatives des bandes α et β .

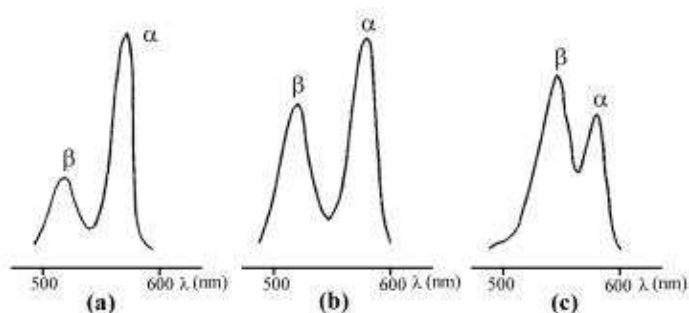


Figure I-36 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par : (a) Ni(II) ; (b) Pd(II) ; (c) Cd(II)

En revanche, la nature de l'ion métallique fixé, engendre d'importantes modifications du rapport des intensités de ces deux bandes. En effet, un rapport $\alpha/\beta > 1$ indique généralement la présence d'un métal impliqué dans le complexe plan, stable avec la porphyrine (c'est le cas par exemple du Ni(II) ou encore du Pd(II)). Par contre, lorsque le métal peut être facilement remplacé par deux protons, on observe un rapport $\alpha/\beta < 1$ (par exemple avec du Cd(II)).

Le spectre d'absorption des benzoporphyrines montre des bandes d'absorption différentes de celles rencontrées pour les porphyrines. En effet, les benzoporphyrines ne possèdent que 3 bandes Q (Figure I-37) dont la bande QII, vers 650 nm, de forte intensité. Celle-ci leur confère la propriété d'absorber dans le rouge permettant ainsi d'irradier des tumeurs profondes dans les tissus.

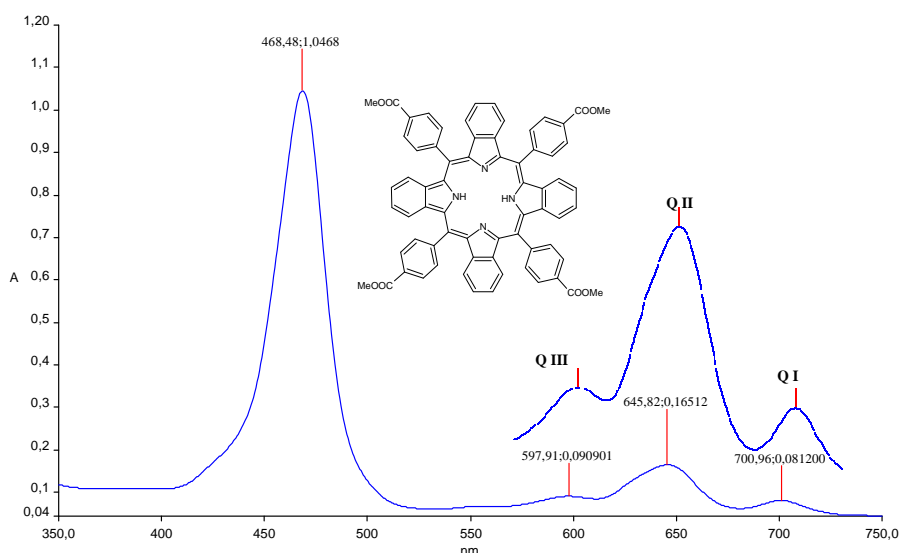


Figure I-37 : Spectre UV-visible caractéristique d'une tétrabenzoporphyrine dans CHCl_3

Des études d'UV-visible de diverses tétrabenzoporphyrines substitués en *meso* indiquent clairement que les maxima d'absorption augmentent (effet bathochrome) avec l'augmentation du nombre de groupes phényle ou aryle en *meso* (Figure I-38), indiquant une corrélation entre la déformation du macrocycle et les maxima d'absorption.^{30a, 40}

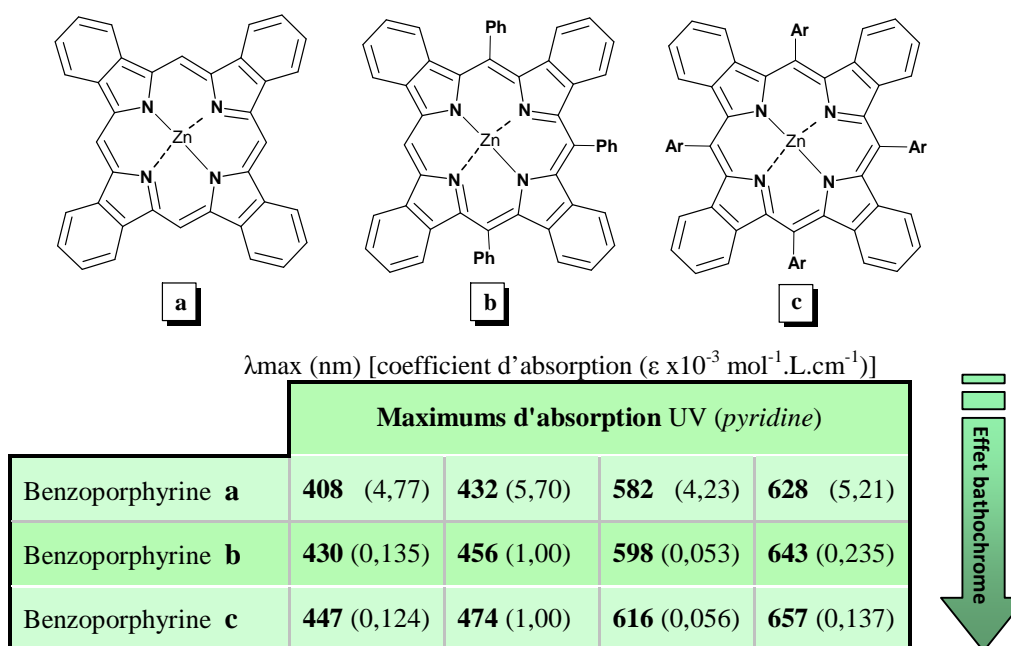


Figure I-38 : UV-visible de diverses tétrabenzoporphyrines substitués en *meso*

Parmi les dérivés de porphyrine, les chlorines présentent également un spectre UV-visible caractéristique (Figure I-39).

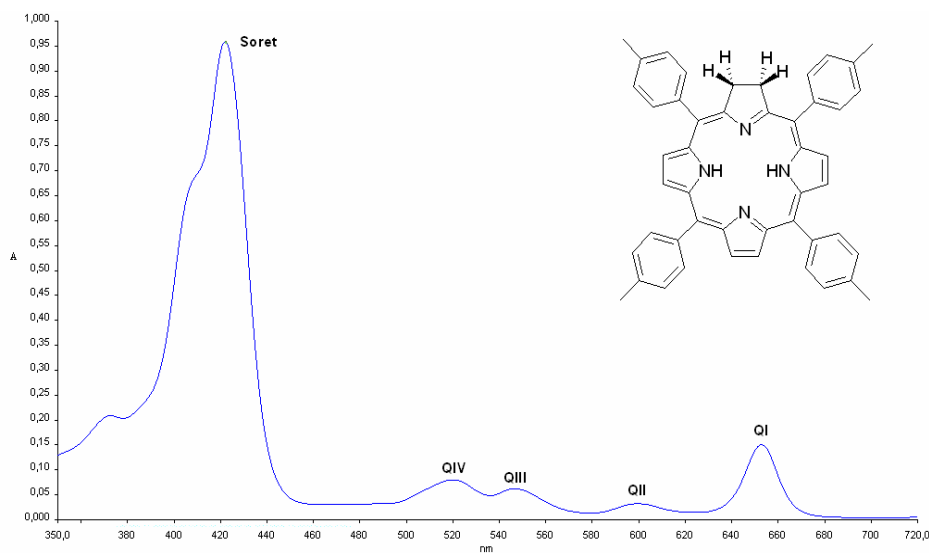


Figure I-39 : Spectre UV-visible caractéristique d'une chlorine : la H_2TTC (dans CHCl_3)

En effet, ces composés possèdent une bande QI intense leur conférant aussi des propriétés intéressantes pour une application en PDT.

4-2 Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse est une technique d'analyse permettant d'identifier des molécules d'intérêt par mesure de leur masse mono-isotopique. Les porphyrines et leurs dérivés étant très faiblement volatiles, 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 : MALDI (Figure I-40). Cette technique permet le passage en phase gazeuse de molécules ionisées intactes à hauts poids moléculaires. Le produit à analyser, mélangé à une matrice, est adsorbé sur un support métallique. Le dépôt est ensuite irradié par des impulsions lasers courtes (quelques nanosecondes) dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption de la matrice. L'énergie délivrée par le laser est absorbée de manière sélective par la matrice conduisant à un phénomène de désorption et d'ionisation. Une faible partie de l'énergie absorbée est transmise sous forme d'énergie cinétique et d'énergie interne à la substance analysée ce qui provoque l'éjection d'espèces moléculaires essentiellement intactes. Les ions produits sont généralement $[M+H]^+$, $[M-H]^+$ ou peuvent être issus de processus de cationisation $[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$. La nature de la matrice est importante. Elle doit être soluble dans les mêmes solvants que la substance étudiée de façon à obtenir un dépôt homogène. Même si l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA) est une matrice couramment employée pour l'étude des porphyrines, il existe cependant une gamme assez étendue de composés pouvant être utilisée comme matrice en fonction des caractéristiques des porphyrines étudiées.⁴⁷

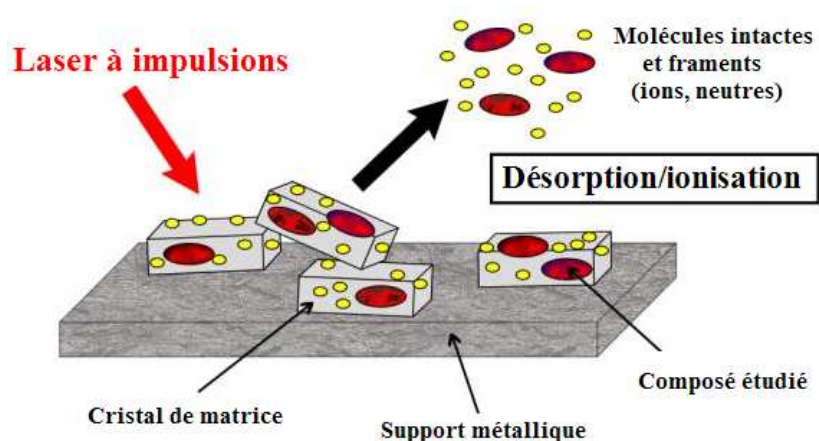


Figure I-40 : Principe de la technique MALDI⁴⁸

⁴⁷ M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 78, 53-68.

⁴⁸ F. Rusconi, J. M. Schmitter; *Analisis Magazine*, **1998**, 26, 13-17.

Le mode ESI est, lui aussi, utilisé pour de telles structures et permet d'obtenir l'ion moléculaire. L'ionisation par électrospray consiste à introduire une solution d'échantillon 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.

4-3 Résonance magnétique nucléaire

Depuis les premiers travaux réalisés par Becker et coll.⁴⁹ en 1959, l'étude de la résonance magnétique nucléaire (RMN) des porphyrines a fait l'objet d'un grand nombre de publications. Comme tous les composés aromatiques, les structures porphyriniques possèdent un courant de cycle important affectant ainsi l'ensemble des protons du macrocycle.

a) Spectroscopie RMN du proton

La résonance magnétique nucléaire du proton (RMN ^1H) appliquée à ces macrocycles fournit des spectres très caractéristiques. En effet, le courant de cycle généré par le champ magnétique (imposé par l'appareil) induit un important cône d'anisotropie magnétique dont l'axe est perpendiculaire au plan du macrocycle (Figure I-41).

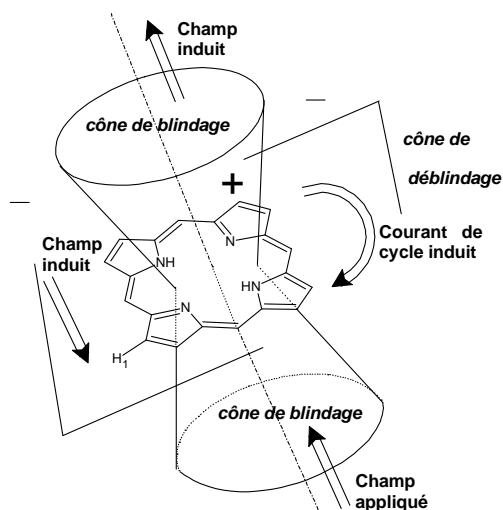


Figure I-41 : Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine

⁴⁹ E. D. Becker, R. B. Bradley; *J. Chem. Phys.*, **1959**, 31, 1413-1414.

Ainsi, les protons à l'intérieur de ce cône sont blindés alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont fortement déblindés. Le spectre RMN est alors étendu sur une large zone de plus de 15 ppm.⁵⁰

Le spectre RMN ¹H de la porphine (porphyrine sans aucun substituant), est constitué de 3 singulets à -3,76, 9,74 et 10,50 ppm (Figure I-42).

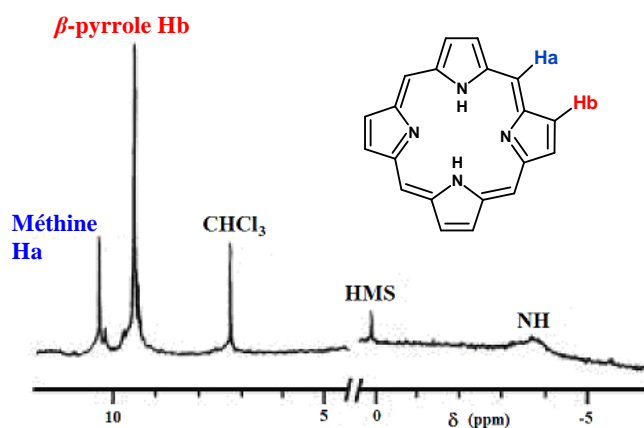


Figure I-42 : Spectre RMN ¹H de la porphine dans CDCl₃

Ces signaux sont attribués respectivement aux protons liés aux atomes d'azote, aux protons des positions β -pyrroliques et aux protons méthine (position *meso*). Puisque ces derniers sont liés à des carbones essentiellement déficients en électrons, ils sont plus déblindés que les protons β -pyrroliques. De plus l'unicité des signaux des protons β -pyrroliques s'explique par la tautomérie des protons NH internes.

Dans le cas de porphyrines *meso*-substituées, les substituants affectent davantage les déplacements chimiques des protons du macrocycle que dans le cas de porphyrines β -substituées. Il y a un blindage des protons périphériques et un déblindage des protons internes dus à une diminution du courant de cycle. L'introduction d'un métal modifie également sensiblement le spectre. On observe ainsi des variations de déplacements chimiques des protons périphériques (β -pyrroliques ou *meso*) selon la nature, le degré d'oxydation du métal. Pour les benzoporphyrines, on observe une modification de l'allure du spectre (Figure I-43).

⁵⁰ J. M. Craig; *The Porphyrins Handbook*, vol. 5, Ed. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, **1999**.

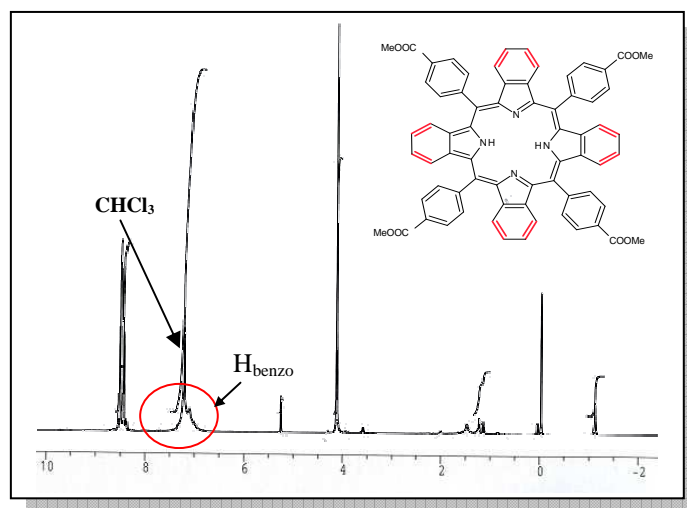


Figure I-43 : Spectre RMN ^1H d'une tétrabenzoporphyrinique

En effet, la présence des cycles aromatiques liés au pyrrole conduit à l'apparition de signaux (doublet) déblindés ($7,5 < \delta < 6,5$ ppm) correspondant aux protons du noyau benzénique.

b) Spectroscopie RMN du carbone 13

Le spectre RMN du carbone 13 du macrocycle porphyrinique se compose essentiellement de trois zones : les carbones des groupes méthines résonnant autour de 90-120 ppm, les carbones β -pyrroliques vers 130 ppm et les carbones α -pyrroliques 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.⁵¹ Notons par ailleurs que dans le cas des benzoporphyrines les carbones benzéniques résonnent vers 135 ppm.

4-1 Spectroscopie Infra-Rouge

La spectroscopie Infra-Rouge (IR) est relativement peu utilisée pour la caractérisation des macrocycles porphyriniques. Cependant, quelques bandes de vibration sont caractéristiques et notamment celles des liaisons C-N à $2208\text{-}2212\text{ cm}^{-1}$, des liaisons C-H à $3075\text{-}3150\text{ cm}^{-1}$ ou encore celles des liaisons N-H pyrrole à $3310\text{-}3326\text{ cm}^{-1}$.

⁵¹ R. J. Abraham, G. E. Hawkes, M. F. Hudson, K. M. Smith; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1975**, 3, 204-211.

5. Domaines d'application

5-1 Applications chimiques

Les porphyrines naturelles, sous forme métallées et parfois bases libres, sont impliquées dans les chaînes d'oxydoréduction thermiques ou photochimiques des milieux biologiques. Les complexes métalloporphyrines sont notamment utilisés en catalyse d'oxygénation. Les premiers résultats ont été obtenus par Groves et *coll.*⁵² qui ont réalisé l'époxydation d'oléfines ainsi que l'hydroxylation d'alcane. Dans ces réactions, l'iodosylbenzène (PhIO) est utilisé comme donneur d'oxygène et la tétratolylporphyrine de fer (Fe(TTP)Cl) ou la tétraphénylporphyrine de fer (Fe(TPP)Cl) comme catalyseur (Figure I-44).

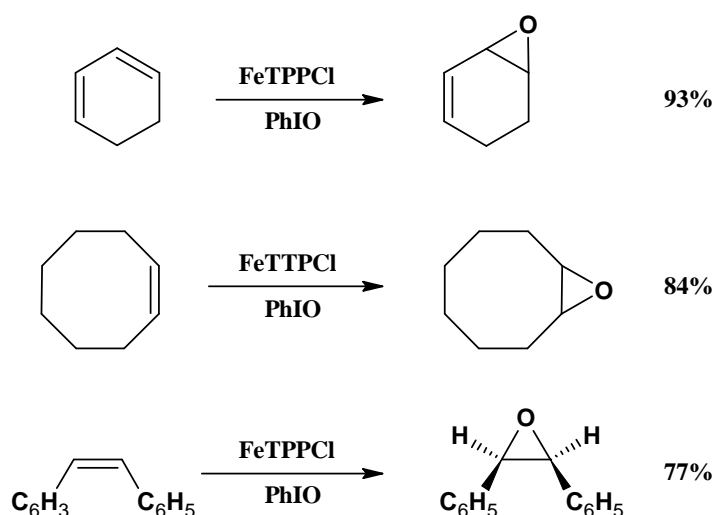


Figure I-44 : Quelques exemples de réaction d'époxydation⁵²

Les porphyrines de fer ou de manganèse catalysent le transfert d'un atome d'oxygène d'un donneur à un substrat par formation transitoire d'un dérivé oxo-métallique (Figure I-45). L'iodosylbenzène est le donneur d'oxygène le plus couramment utilisé mais il peut être remplacé par l'hypochlorite de sodium, par l'oxygène en présence d'une source d'électrons ou encore par un peroxyde.

⁵² J. T. Groves, T. E. Nemo, R. S. Myers; *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 1032-1033.

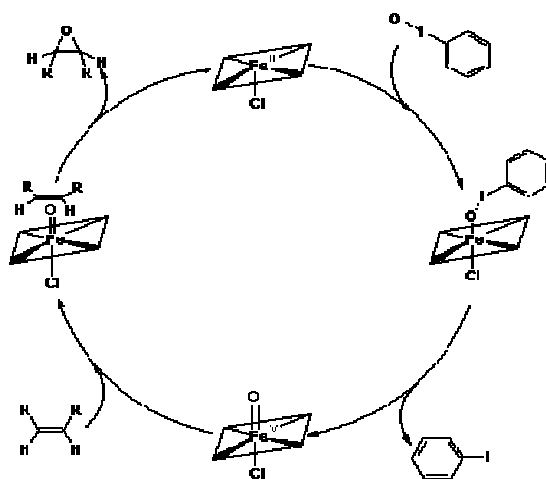


Figure I-45 : mécanisme transfert d'un atome d'oxygène

Un autre processus utilisant les macrocycles porphyriniques est la transformation photochimique de l'eau en hydrogène. Ce processus a fait l'objet de nombreux travaux en raison de son impact potentiel dans le domaine des énergies renouvelables (Figure I-46).⁵³ Il consiste à exciter sous l'action de la lumière visible un photosensibilisateur (S) qui va transférer un de ces électrons à un accepteur d'électrons (le méthylviologène) et décomposer l'eau catalytiquement pour obtenir le dihydrogène. A l'autre extrémité de la chaîne se trouve un donneur (D) qui va restituer un électron au photosensibilisateur. Le donneur sera alors oxydé et détruit.

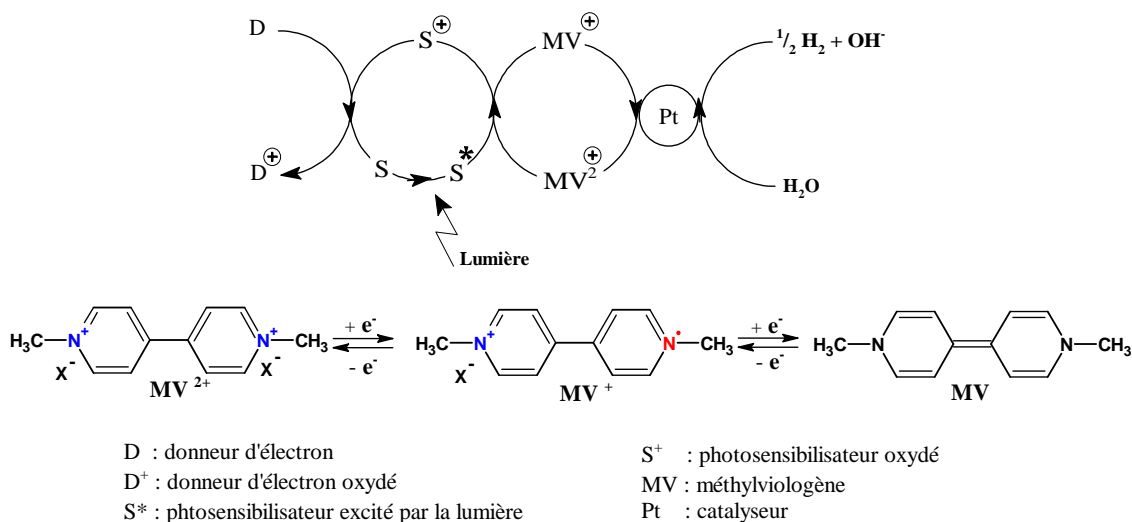


Figure I-46: Transformation photochimique de l'eau en hydrogène⁵³

⁵³ J. M. Lehn, M. Kirch, J. P. Sauvage, R. Ziessel; *La Recherche*, **1980**, 11, 203-205.

Un système similaire a été envisagé pour produire de l'oxygène à partir de l'eau.⁷ Dans ce cas, l'eau est photochimiquement oxydée. Tout d'abord, le photosensibilisateur (S) excité s'oxyde en donnant un électron à un accepteur (A : cobalt). Il va ensuite prendre un électron au catalyseur (dioxyde de Ruthénium) et ce dernier, devenant déficient en électron, va oxyder l'eau et entraîner la formation d'oxygène (Figure I-47).

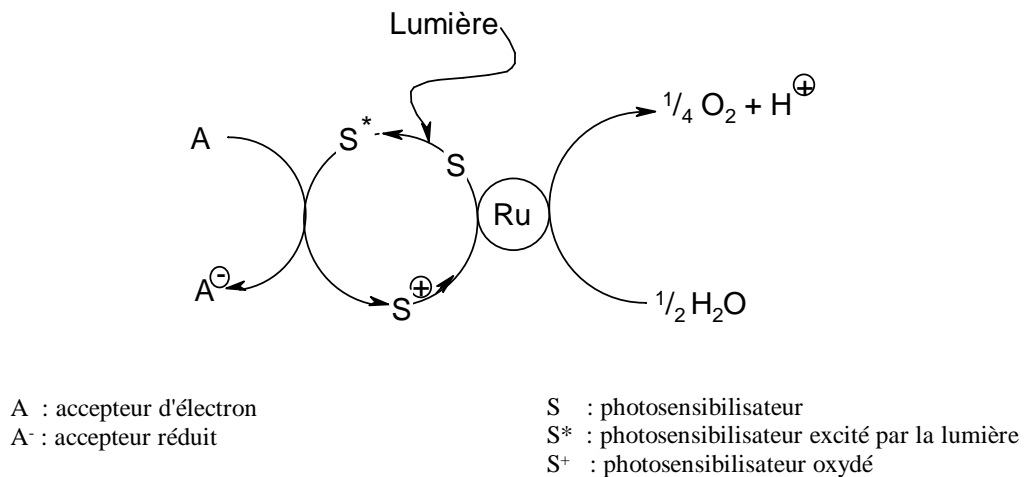
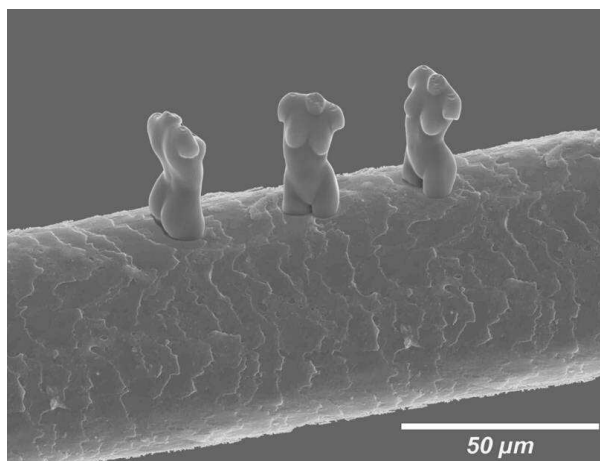


Figure I-47 : Transformation photochimique de l'eau en oxygène²

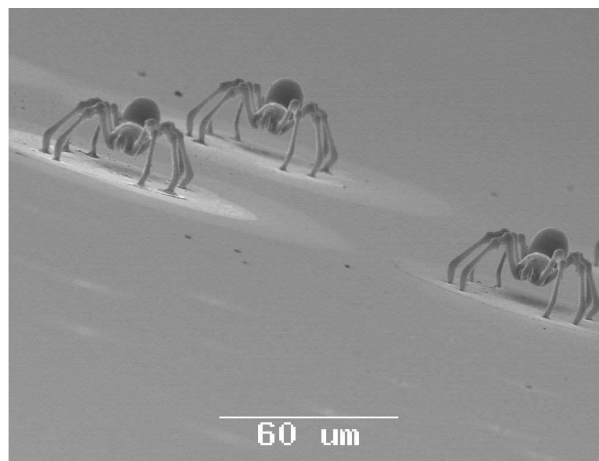
Un tel système constitue en théorie une source inépuisable d'énergie, mais il demeure en pratique limité en raison de la dégradation du photosensibilisateur et de la consommation du donneur.

5-2 Applications physico-chimiques

La fabrication de structures 3D de dimensions nanométriques à partir de polymères passe généralement par l'utilisation de la stéréo-lithographie (SL) par faisceaux d'électrons ou extrême UV. La SL est une technologie permettant la polymérisation couche par couche. Cependant, depuis peu, il existe une autre méthode, véritable procédé en 3D, qui consiste à utiliser la photopolymérisation à deux photons (2PP), permettant ainsi de fabriquer des micro-objets 3D avec une grande résolution : inférieure à la centaine de nanomètre (Figure I-48). Lors de ce procédé, la polymérisation n'a lieu qu'autour du point focal du laser.



Micro-modèles de Venus sur cheveux humains



Micro-modèle d'araignées avec 8 pattes de 1μm

Figure I-48 : Structures 3D fabriqués par la technique 2PP⁵⁴

Dans ce domaine les benzoporphyrines, comme par exemple la tétra-*para*-tolyltétrabenzoporphyrine⁵⁴, en présence d'un photo-générateur d'acide (PAG), peuvent être utilisées comme catalyseur pour des réactions de polymérisation. En effet la tétrabenzoporphyrine excitée à deux longueurs d'ondes différentes (635 nm et 490 nm) se retrouve sous forme cationique en cédant son électron au PAG qui génère par la suite une forme acide permettant ainsi la polymérisation d'éthers vinyliques.

5-3 Applications biologiques et médicales : la PDT

La photooxydation par les macrocycles porphyriniques en présence d'oxygène n'est pas réduite à la synthèse organique, puisque ce procédé a également permis un développement important des traitements photochimiques de maladies.

a) Introduction à la photothérapie dynamique

Il s'agit d'une voie de traitement de certains types de cancer qui peut être employée soit en complément soit en remplacement d'une autre méthode telle que la chirurgie. Les traitements classiques du cancer sont la chirurgie qui consiste à retirer les parties du corps envahies par les tumeurs; la radiothérapie qui utilise les rayonnements ionisant émis par certains éléments radioactifs pour détruire les cellules anormales ou du moins ralentir leur progression; et la chimiothérapie qui implique l'utilisation de produits chimiques ayant un effet direct sur les

⁵⁴ S. Ohkuma; T. Yamashita; *Two-photon sensitized polymerization of vinyl ethers via electron transfer of ZnTTBP*, *J. Photopolym. Sci. Technol.* Vol.15, N°1, **2002**.

cellules malades, soit en les détruisant, soit en empêchant leur prolifération. Malgré leur efficacité, toutes ces techniques présentent de nombreux inconvénients : la chirurgie est en générale trop invalidante pour le malade (même si des progrès sont faits pour diminuer la gêne occasionnée), tandis que la radiothérapie et la chimiothérapie manquent de sélectivité et touchent également les tissus sains.

Puisque le cancer est la deuxième cause de mortalité chez l'homme (après les maladies cardiovasculaires), on comprend l'intérêt de la thérapie photodynamique (PDT). Il s'agit en effet d'une technique innovante qui a été récemment acceptée en clinique pour traiter un certain nombre de cancers et ne présentant pas tous les inconvénients des autres traitements. Elle est basée sur la combinaison de deux facteurs : une molécule photosensibilisante qui n'est pas toxique par elle-même et une source lumineuse. Cette molécule est capable d'absorber un photon, entraînant par la suite une série de réactions causant des dommages irréversibles aux tissus concernés.

b) Historique

L'héliothérapie est connue depuis l'antiquité. Dès le 5^{ème} siècle avant notre ère, Hérodote notait les effets bénéfiques du soleil sur la croissance osseuse, tandis qu'Hippocrate (460-376 avant J. C.) mentionnait son utilisation dans le traitement de plusieurs maladies humaines. Le terme photothérapie est dû au scientifique islandais Finsen (1860-1904) qui s'est consacré à l'étude des effets thérapeutiques des divers rayons du spectre solaire notamment pour traiter et guérir le « *Lupus vulgaris* », maladie de la peau très courante dans les pays nordiques.⁵⁵ En 1903, Jesionek et von Tappeiner⁵⁶ ont posé les bases de la photothérapie antitumorale grâce à l'utilisation combinée de la lumière et de l'éosine appliquées localement aux tumeurs cancéreuses (Figure I-49-a). En 1908, Haussmann⁵⁷ a montré la photosensibilité de souris exposées à la lumière, après une injection d'hématoporphyrine (Figure I-49-b). Cette sensibilité s'est avéré être fonction de la quantité de sensibilisateur et de lumière. Afin de prouver que les résultats de phototoxicité mis en évidence chez la souris peuvent s'appliquer à l'homme, Friedrich Meyer-Betz s'est livré en 1912 à une expérience sur lui-même en s'injectant 200 mg d'hématoporphyrine (Figure I-50).

⁵⁵ N. F. Finsen; *Phototherapy*. London: Arnold, **1901**.

⁵⁶ A. H. Jesionek; *von Tappeiner*, *Munch. Med. Wochenschr.*, **1903**, 41, 2042-2051.

⁵⁷ W. Haussmann; *Biochem. Z.*, **1910**, 30, 276-316.

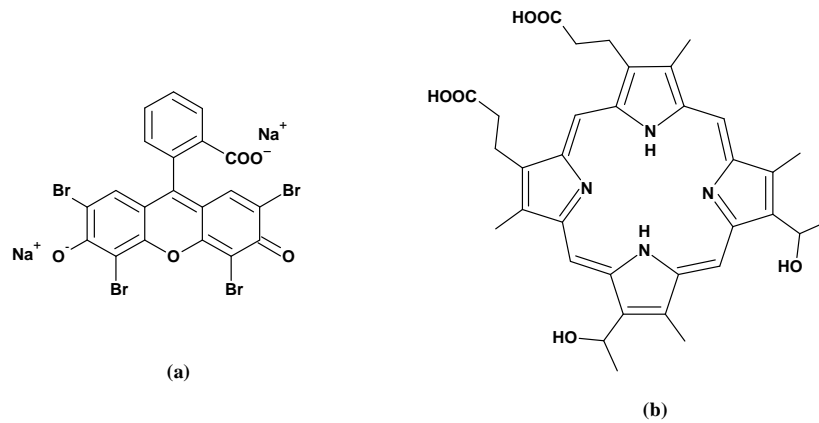


Figure I-49 : Structure de l'éosine Y⁵⁶ (a) et de l'hématoporphyrine⁵⁷ (b)

Tant qu'il est resté non exposé au soleil, rien de spectaculaire ne s'est produit, mais lors de l'exposition à la lumière solaire, une réaction eut lieu, entraînant une hyperpigmentation de la peau et un oedème généralisé : symptômes d'une hypersensibilité à la lumière, dont il a souffert pendant plusieurs semaines.

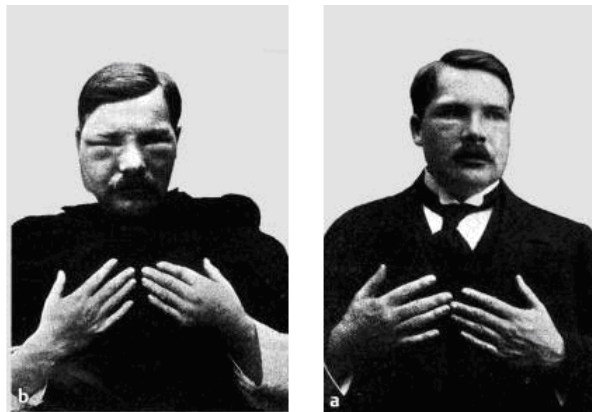


Figure I-50 : Meyer-Betz. À gauche : après injection et exposition au soleil. À droite : cinq jours après injection, l'oedème est réduit, mais quelques lésions sur les mains et le visage subsistent

Une observation importante a été faite à Lyon par Policard⁵⁸ en 1924 qui a constaté la fluorescence de porphyrines naturelles dans certaines tumeurs, faisant ainsi, pour la première fois, la relation entre cancer et porphyrines. Les travaux de Figge⁵⁹, en 1948, ont été les premiers à montrer le potentiel des porphyrines et notamment de l'hématoporphyrine dans le traitement de certains cancers. Néanmoins, en 1961 Lipson⁶⁰ a noté que le manque de

⁵⁸ A. Policard, A. Leulier; *C. R. Acad. Sci. Soc. Biol.*, **1924**, 91, 1423-1424.

⁵⁹ F. H. J. Figge, G. S. Weiland, L. O. J. Manganiello; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, 68, 640-641.

⁶⁰ R. L. Lipson, E. J. Baldes; *Arch. Dermatol.*, **1960**, 82, 508-516.

spécificité de ce photosensibilisateur pour les tissus cancéreux peut engendrer de graves lésions des tissus sains lors du traitement photodynamique. Lipson a introduit alors un dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) et a démontré la localisation, avec un degré élevé, des porphyrines dans les tissus cancéreux permettant la visualisation des zones tumorales par irradiation dans l'ultraviolet (fluorescence rouge des porphyrines). Pendant une dizaine d'années, ce composé a été utilisé comme agent diagnostique de certains cancers. Ce n'est qu'en 1974 que le dérivé d'hématoporphyrine a connu un développement rapide comme agent thérapeutique grâce aux travaux de Dougherty⁶¹, qui a démontré l'efficacité de la photothérapie dynamique des cancers sur des modèles animaux puis sur des humains. Parallèlement à ces recherches, Weishaupt⁶² a découvert que l'absorption d'énergie lumineuse par la HpD induit la formation d'oxygène singulet, agent responsable de la destruction des tissus. En 1984, Dougherty⁶³ a obtenu par purification de la HpD, un mélange composé (Figure I-51) essentiellement d'oligomères reliés par des ponts éther et/ou ester. Cette fraction active est actuellement commercialisée sous le nom de Photofrin[®]. Entre 1986 et 2000, le Photofrin[®] a été le seul photosensibilisateur utilisé en clinique humaine. Il n'a reçu que récemment l'autorisation de mise sur le marché dans plusieurs pays (USA, France, Hollande, Japon,...).

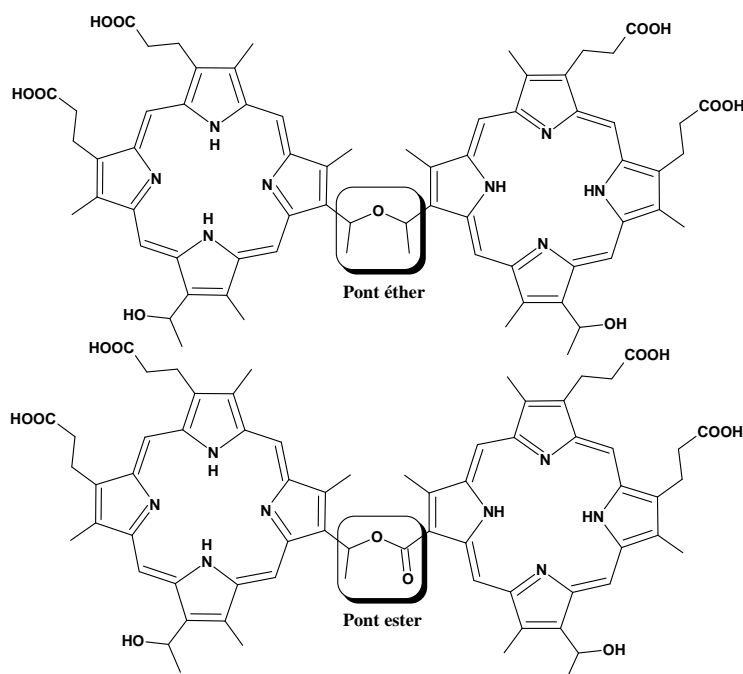


Figure I-51 : Structures des fractions actives du Photofrin[®]

⁶¹ T. J. Dougherty; *J. Natl. Cancer Inst.*, **1974**, 52, 1133-1136.

⁶² K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty; *Cancer Res.*, **1976**, 36, 2326-2329.

⁶³ T. J. Dougherty; W. R. Potter, K. R. Weishaupt; *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1984**, 170, 301-314.

Désormais, de nouvelles molécules, plus spécifiques et plus actives sont développées en laboratoire. Certaines reçoivent une autorisation de mise sur le marché (AMM) tandis que d'autres sont actuellement en essai phase clinique I, II ou III.

c) Mécanisme et processus photochimique

La première étape consiste à introduire, généralement par voie intraveineuse, l'agent photosensible. La tumeur qui a concentré cet agent est alors exposée à une lumière de longueur d'onde capable d'induire un mécanisme photochimique et dont les agents intermédiaires sont des espèces cytotoxiques. L'interaction de ces espèces avec le milieu intracellulaire endommage les membranes et divers organites conduisant à la mort cellulaire (Figure I-52).

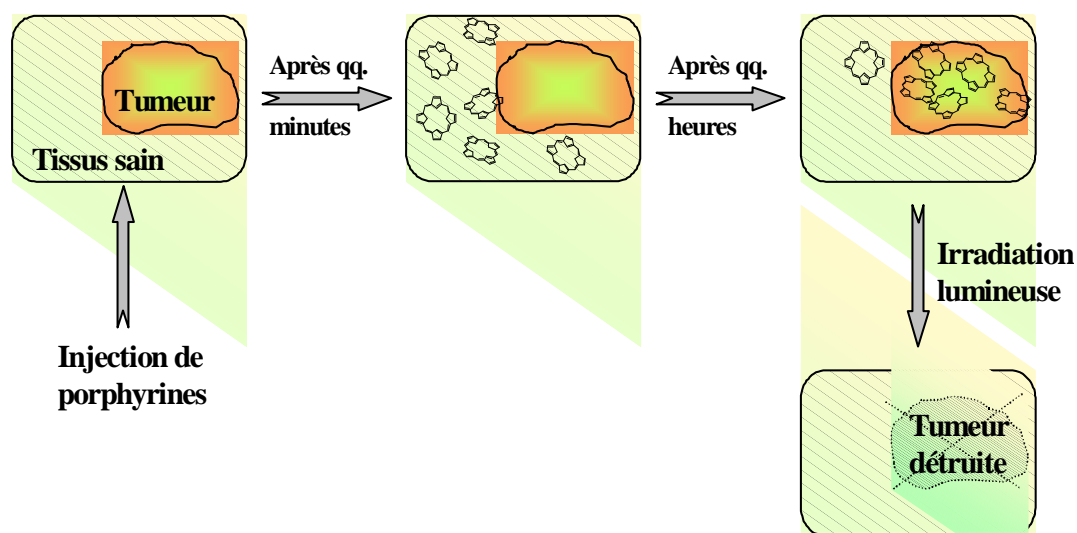


Figure I-52 : Représentation schématique du principe de la PDT

La majorité des photosensibilisateurs présente une absorption optimale dans le domaine de l'ultraviolet, le violet ou le bleu spectral, alors que l'irradiation lumineuse en PDT s'effectue habituellement en lumière rouge (650 à 750 nm) car celle-ci permet une pénétration de plus d'un millimètre au niveau tissulaire (Figure I-53).⁶⁴

⁶⁴ I. J. Mac Donalds; T. J. Dougherty; *Basic principles of photodynamic therapy, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2001, 5, 105-120

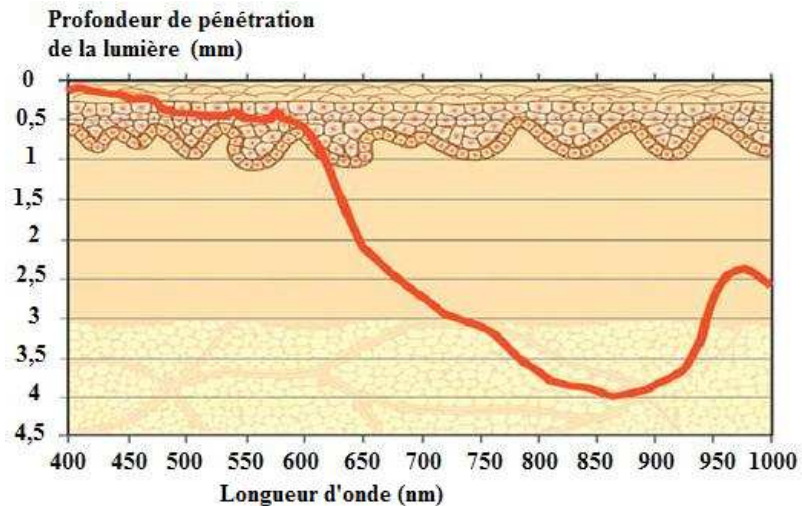


Figure I-53 : Profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus⁶⁴

Le spectre d'absorption de l'hème présente un pic intense autour de 420 nm et en raison de la présence de vaisseaux de petites et/ou de larges dimensions localisés au niveau des tissus, les plus courtes longueurs d'onde sont sujettes à de fortes variations d'intensité lumineuse. En PDT, des cellules tumorales peuvent être alors soustraites à l'action de la lumière au voisinage d'un vaisseau et survivre à l'irradiation. Cependant certaines restrictions à l'usage de la lumière rouge existent. En effet, en raison de la dispersion lumineuse et de l'absorption minimale du sang (et des tissus), les longues longueurs d'onde (> 800 nm), ne pénètrent que quelques millimètres dans les tissus. Le rayon d'action de la PDT est habituellement inférieur à 1 cm, cependant pour des tumeurs plus épaisses de multiples séances d'irradiation sont nécessaires en pratique, en insérant, par exemple, plusieurs fibres optiques à l'intérieur du volume tumoral.

À la suite de l'absorption d'un photon, le photosensibilisateur se retrouve excité. Il existe alors plusieurs possibilités de retour à son état fondamental. L'une d'elle est la fluorescence. Cependant pour être un photosensibilisateur potentiel, une molécule doit pouvoir stocker l'énergie plus longtemps (micro ou milliseconde). Cette situation est possible lorsque l'électron excité change d'état de spin, donnant lieu à une situation transitoire dénommée conversion intersystème. Le photosensibilisateur excité se retrouve ainsi à l'état triplet. Il peut alors retourner à l'état fondamental (phénomène de phosphorescence) ou transférer son énergie aux molécules environnantes et notamment à l'oxygène. Le photosensibilisateur, à l'état fondamental, est alors ainsi de nouveau disponible pour l'absorption d'un autre photon. Par conséquent, celui-ci agit comme un catalyseur qui transfère l'énergie lumineuse aux

molécules de dioxygène générant ainsi des espèces très réactives et nocives pour les structures intracellulaires telles que les lipides membranaires ou les enzymes.⁶⁵ Ces espèces peuvent même altérer ou détruire le photosensibilisateur, induisant ainsi la formation de photoproduits et la perte progressive de la photosensibilisation et de la fluorescence (photo-blanchiment) survenant en cours d'irradiation.

Sous l'effet du transfert d'énergie, les molécules de dioxygène environnantes peuvent réagir soit par réaction de transfert d'électron par l'intermédiaire d'un substrat (mécanisme de type I) soit par réaction de transfert d'énergie (mécanisme de type II). Dans la réaction de type I, des radicaux libres sont formés conduisant à la production de radicaux hautement réactifs (O_2^- , OH^\cdot) et à la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).⁶⁶ Toutefois, la majorité des photosensibilisateurs utilisés en PDT agissent principalement via le mécanisme de type II au cours duquel l'oxygène singlet (1O_2) est produit (Figure I-54).

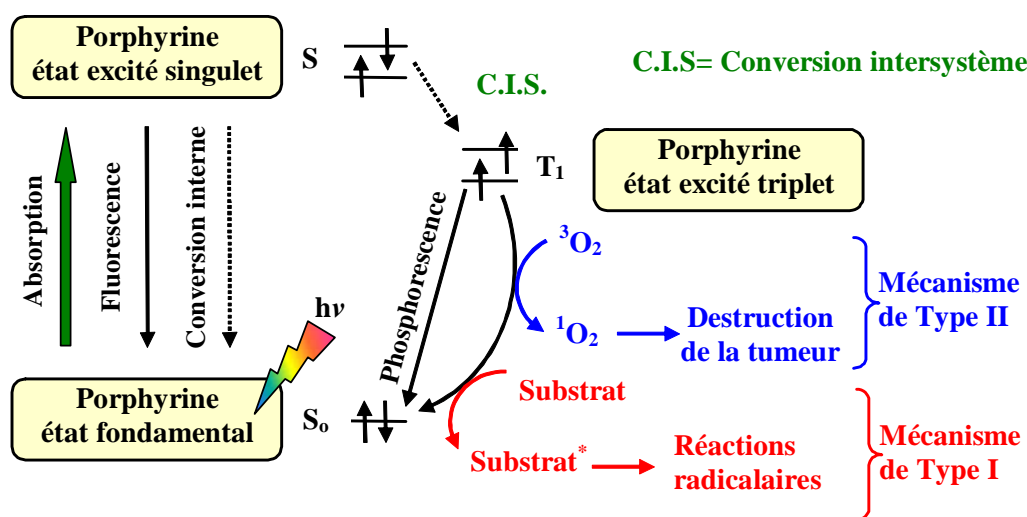


Figure I-54 : Mécanisme photochimique de la PDT

L'oxygène singlet peut réagir avec pratiquement toutes les biomolécules présentant des liaisons π telles que les phospholipides, le cholestérol, les acides aminés (tryptophane, histidine, méthionine) ainsi que certaines bases nucléiques (guanine) (Figure I-55).⁶⁷

⁶⁵ N. Kaul, H. J. Forman; *Toxicology of Human Environment*, **2000**, 311-335.

⁶⁶ C. S. Foote; *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 659.

⁶⁷ E. D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brückner; *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151-4202.

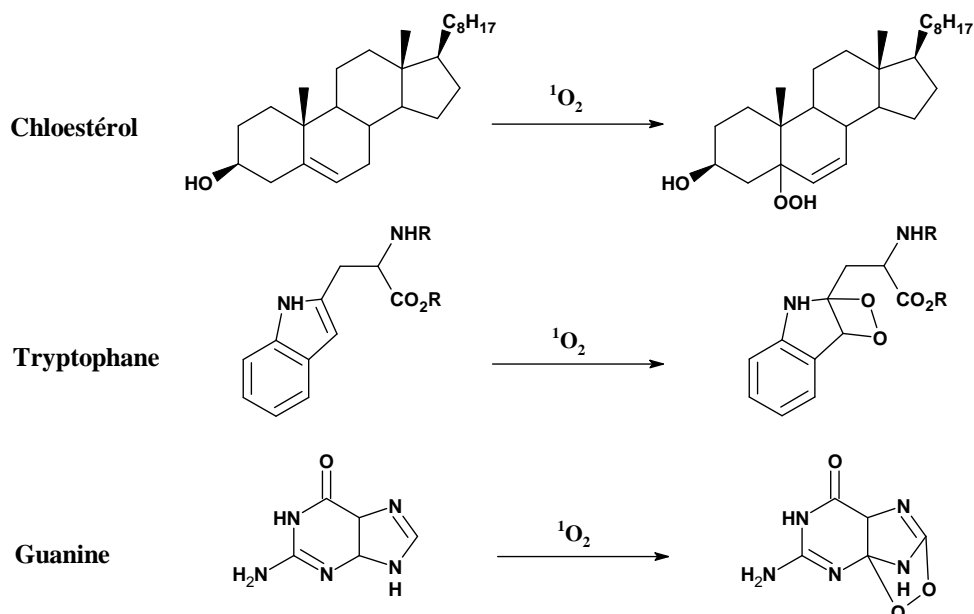


Figure I-55 : Exemples d'oxydation et de cycloaddition des composants cellulaires menant à la destruction de la tumeur⁶⁷

Cependant son temps de vie étant très court (de l'ordre de la nanoseconde), son rayon d'action se limite à son site de formation.⁶⁸ Les organites cellulaires atteints dépendent alors du site d'accumulation du photosensibilisateur utilisé. La nature de celui-ci joue donc un rôle important dans les sites d'attaque de l'oxygène singulet.⁶⁹ L'ensemble de ces processus va provoquer l'inactivation d'un grand nombre de constituants cellulaires importants, d'un point de vue structural mais aussi métabolique, ce qui va entraîner la mort de la cellule.

d) Les mécanismes de la photodestruction

Les photosensibilisateurs utilisés en PDT ont la capacité de se concentrer majoritairement dans les cellules tumorales. Bien que ce mécanisme fasse l'objet de nombreuses études, il demeure encore mal compris. C'est, sans doute, la capacité des sensibilisateurs d'extravasation (fuite de la molécule hors du vaisseau sanguin dans lequel elle est injectée), leur affinité pour les cellules endothéliales en prolifération et la possibilité de formation de liaisons covalentes avec les récepteurs LDL (Low-Density Lipoprotein), jointes à l'absence de drainage lymphatique au niveau tumoral qui sont le mieux à même d'expliquer ce phénomène. La destruction des cellules tumorales se fait par photodestruction selon deux types de mécanismes. Le premier est direct provoquant des dommages cellulaires irréversibles

⁶⁸ J. Moan; *Photochem. Photobiol.*, **1990**, 6, 343-347.

⁶⁹ W. Henderson, T. J. Dougherty; *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 55, 145-147.

(apoptose et nécrose), et le deuxième indirect provoquant des dommages vasculaires et immunitaires (Chapitre IV-2).

e) Les photosensibilisateurs utilisés en PDT

La recherche et le développement de nouveaux photosensibilisateurs sont un problème complexe car ils doivent répondre à des critères bien définis :

- être non-toxique en absence de lumière
- être de composition parfaitement définie
- avoir une grande sélectivité vis à vis des cellules tumorales
- posséder une absorption optimale entre 650 et 800 nm pour une plus grande pénétration de la lumière dans les tissus
- avoir un rendement quantique en oxygène singulet élevé
- être amphiphile pour s'incorporer au mieux dans les organites cellulaires
- avoir une durée de vie plasmatique suffisamment longue

Les molécules les plus couramment utilisées en tant qu'anticancéreux se répartissent en plusieurs classes :

- de première génération : les molécules d'origine naturelle
- de deuxième génération : les molécules de synthèse
- de troisième génération : les molécules vectorisées

✓ *Photosensibilisateurs de première génération :*

Les photosensibilisateurs de première génération regroupent l'hématoporphyrine associée à ses dérivés et notamment le Photofrin[®]. L'hématoporphyrine (Figure I-49) est isolée à partir de l'hémoglobine traitée en milieu acide. C'est un produit aisément obtenu mais qui ne présente pas de sélectivité vis à vis des cellules cancéreuses. Le dérivé d'hématoporphyrine (HpD) est obtenu par traitement acide (acide acétique et acide sulfurique) de l'hématoporphyrine puis par saponification des produits acétylés. Une étude par chromatographie liquide haute performance (HPLC) montre que ce mélange contient de l'hématoporphyrine (20%), de l'hydroxyéthylvinyldeuteroporphyrine (20-30%), de la protoporphyrine (3-5%) ainsi que des oligomères de porphyrines (2 à 6 unités) reliées entre eux par des ponts éther, esters et/ou carbone-carbone. Les monomères semblent avoir une activité anti-tumorale réduite. Dougherty et coll.⁶³ parviennent alors à obtenir, par purification

partielle du dérivé de l'hématoporphyrine, un mélange, appelé Photofrin[®] (Figure I-51), composé essentiellement de dimères, telle que la dihématoporphyrine (DHE), et d'oligomères dont les unités sont reliées par un pont éther ou ester. Ce mélange de composés est utilisé dans le traitement de tumeurs présentes au niveau des bronches et de l'œsophage. Cependant, ce traitement nécessite un délai assez long entre l'injection des photosensibilisateurs de première génération et l'exposition lumineuse. De plus cette pharmacocinétique est couplée avec une biodégradation relativement lente du photosensibilisateur. La médication avec ces molécules reste contraignante puisque le patient doit éviter une exposition à la lumière durant quatre à huit semaines.⁷⁰

✓ *Photosensibilisateurs de deuxième génération :*

Devant le peu de sélectivité de ces composés vis-à-vis des cellules cancéreuses et une application restreinte aux tumeurs superficielles, de nombreux travaux se sont orientés vers des photosensibilisateurs plus spécifiques et capables d'absorber des lumières de longueurs d'ondes plus élevées afin d'obtenir un traitement lumineux efficace pour des tumeurs plus profondes. Les recherches se sont tournées vers des photosensibilisateurs de structure bien définie. Ces photosensibilisateurs, dits de seconde génération, possèdent l'avantage d'être éliminés rapidement par l'organisme, évitant ainsi une photosensibilité prolongée du patient. Ils comprennent plusieurs classes de molécules telles que les chlorines (Foscan[®], Npe6[®]), les purpurines (Purlytin[®]), les texaphyrines (Xcytrin[®], Lutrin[®]) ou encore des précurseurs de porphyrines (5-ALA). La tétra-(*meta*-hydroxyphényl)chlorine (*m*-THPC), commercialisée en 2002, pour le traitement du cancer du cou et de la tête, sous le nom de Foscan[®] (Figure I-33), possède un coefficient d'absorption très élevé dans le rouge ($\epsilon = 29600 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans le méthanol)⁷¹ et sa durée de vie, relativement longue de l'état excité, lui confère un rendement quantique important en oxygène singulet. Seulement, la *m*-THPC reste peu sélective vis-à-vis des tumeurs. Une illumination très précise de la cible à traiter doit être alors de rigueur pour épargner au maximum les tissus voisins et ce composé s'est avéré être un bon candidat pour le traitement des cancers de la prostate ou du pancréas.^{72, 73}

⁷⁰ M. M. Ressler, R. K. Pandey; *CHEMTECH*, **1998**, 28, 39-45.

⁷¹ R. Bonnett, B. D. Djelal, A. Nguyen; *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5, 652-661.

⁷² 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. Urol.*, **2002**, 168, 1427-1432.

⁷³ 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.

Des dérivés de la chlorophylle sont également étudiés pour leurs applications en PDT et notamment la chlorine e_6 (Figure I-56). Outre une absorption intéressante vers 660 nm, cette molécule présente une pharmacocinétique et une biodégradation rapide, l'irradiation devant intervenir peu de temps après l'injection.⁷⁴ Associée à l'acide L-aspartique, la chlorine e_6 devient alors un photosensibilisateur sélectif puisque 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 du composé.⁷⁵ La mono-L-aspartylchlorine e_6 est testée (phase I et II) pour le traitement de tumeurs cutanées.⁷⁶

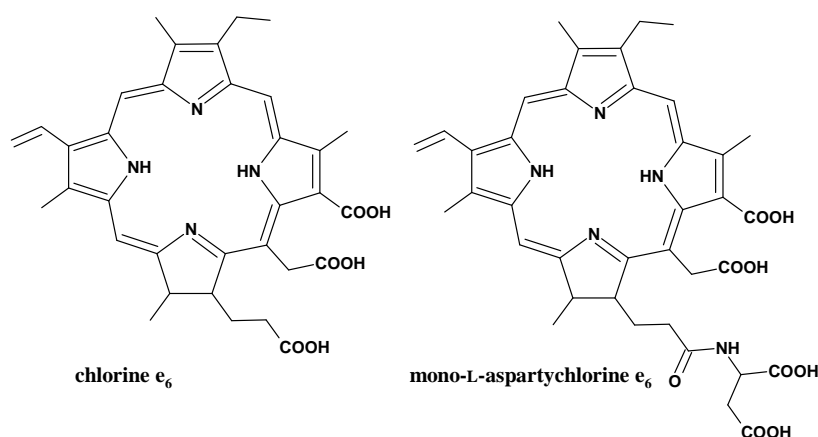


Figure I-56 : Structures de la chlorine e_6 et de la mono-L-aspartylchlorine e_6

Les purpurines sont des molécules de la famille des chlorines qui possèdent un cycle accolé au squelette porphyrinique de base. La stabilité recherchée pour les chlorines de synthèse est ainsi obtenue et l'exocycle confère à cette molécule une absorption vers 660 nm. L'éthylétiopurpurine d'étain est un dérivé commercialisé sous le nom de Purlytin[®] (Figure I-57). Il est étudié pour lutter contre le cancer de la prostate⁷⁷ et est utilisé pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Cependant la faible stabilité de cette molécule dans l'eau pose un problème pour le traitement *in vivo*. Les recherches se sont orientées vers une dilution de ces composés avec des agents émulsifiants constitués d'acides gras (Cremophor[®]).⁷⁸

⁷⁴ G. A. Kostenich, I. N. Zhuravkin, E. A. Zhavrid; *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 22, 211-217.

⁷⁵ K. Aizawa, T. Okunaka, T. Othani, H. Kawabe, Y. Yasunaka, S. O'Hata, N. Ohtomo, K. Nishimiya, C. Konaka, H. Kato, Y. Hayata, T. Saito; *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 46, 789-793.

⁷⁶ T. J. Dougherty; *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 58, 895-900.

⁷⁷ S. H. Selman, D. Albrecht, R. W. Keck, P. Brennan, S. Kond; *J. Urology*, **2001**, 165, 1795-1801.

⁷⁸ M. Kreimer-Birnbaum; *Seminars in Hematology*, **1989**, 26, 157-173.

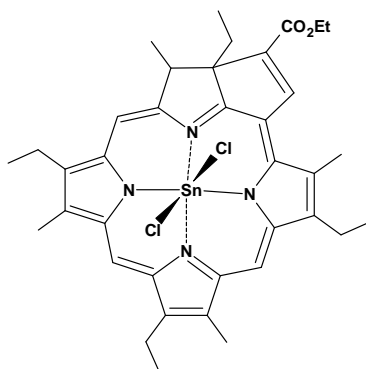


Figure I-57 : Structure de la Purlytin®

Contrairement aux porphyrines, les texaphyrines ne sont pas des composés tétrapyrroliques mais tripyrroliques (Figure I-58). Ces molécules peuvent se complexer, à différents degrés d'oxydation, avec une large série de métaux et notamment avec ceux de la série des lanthanides.⁷⁹ Plusieurs molécules de ce type sont actuellement commercialisées sous les noms de Xcytrin®, dérivé de Gadolinium (+III) utilisé contre des tumeurs métastatiques du cerveau ou Lutrin®, dérivé de lutetium (+III) préconisé pour le traitement de cancers récurrents du sein.

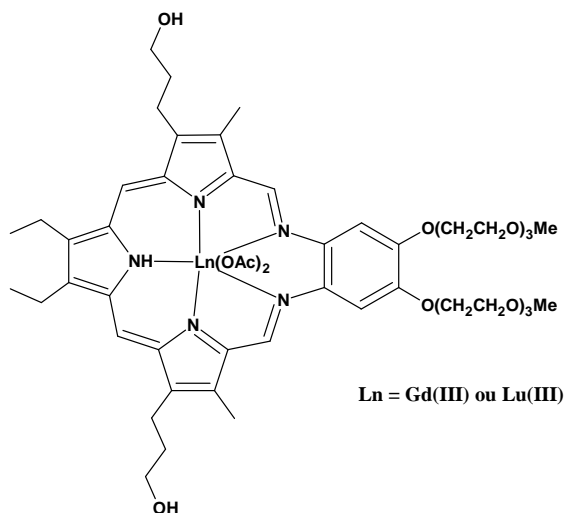


Figure I-58: Structures du Xcytrin® et du Lutrin®

Ces métallotexaphyrines présentent une très bonne sélectivité pour les cellules tumorales ainsi qu'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

⁷⁹ J. L. Sessler, R. A. Miller; *Biochem. Pharm.*, **2000**, 59, 733-739.

une production efficace en oxygène singulet.⁸⁰ L'irradiation peut être effectuée trois heures après l'injection de ces molécules et leur élimination rapide par l'organisme assure une photosensibilité réduite du patient.

Une autre approche utilisée en photothérapie dynamique est la synthèse de porphyrines endogènes. Ainsi l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) est un précurseur de la biosynthèse de l'hème et par conséquent de la protoporphyrine IX, agent photosensibilisateur (Figure I-59). La conversion relativement lente de la protoporphyrine IX en hème, ainsi qu'un apport exogène de 5-ALA, permet d'obtenir des concentrations élevées en protoporphyrine IX dans les cellules. Il est possible alors d'irradier la tumeur afin de déclencher le processus photochimique de la PDT.⁸¹ De plus ces porphyrines se dégradent rapidement avec l'oxygène singulet qu'elles produisent (photoblanchiment), réduisant les phénomènes de photosensibilité du patient.

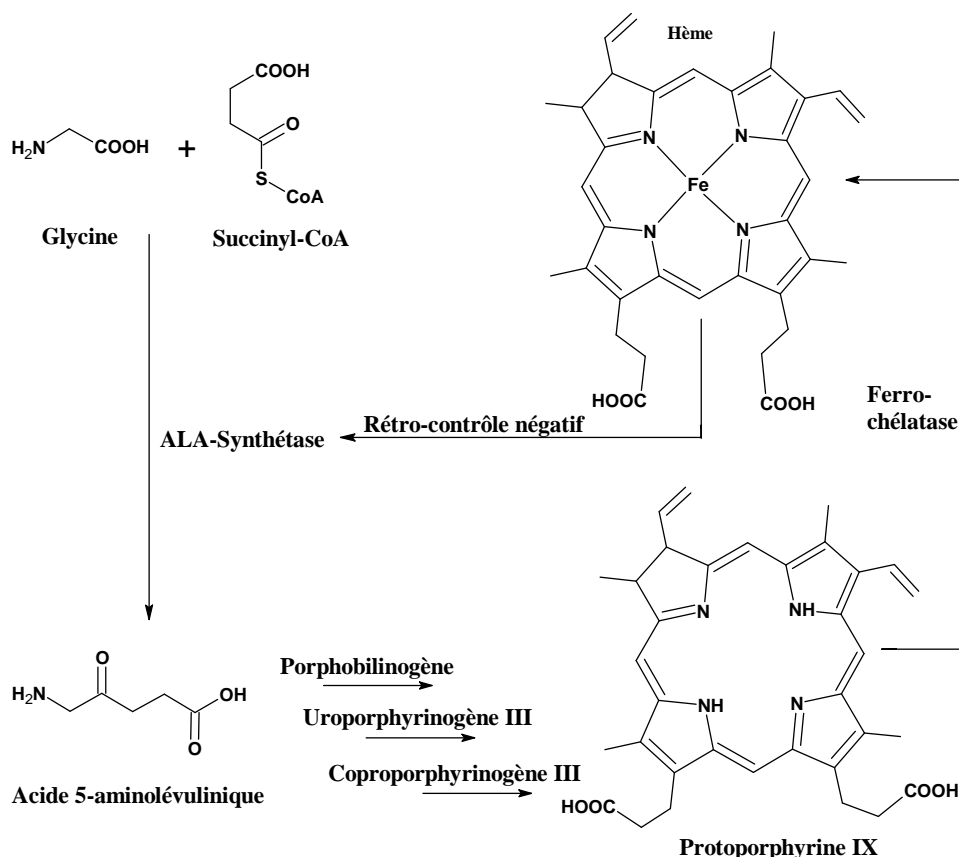


Figure I-59 : Schéma simplifié de la biosynthèse de l'hème

⁸⁰ A. Harriman, B. G. Maiya, T. Murai, G. Hemmi, J. L. Sessler, T. E. Thomas; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1989**, 5, 314-316.

⁸¹ C. J. Kelty, N. J. Brown, M. W. R. Reed, R. Ackroyd; *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 1, 158-168.

L'acide 5-aminolévulinique s'avère très efficace dans le traitement des cancers cutanés.⁸² L'activation lumineuse s'effectue trois à six heures après l'application locale de cet aminoacide.

✓ *Photosensibilisateurs de troisième génération :*

Les photosensibilisateurs de troisième génération reposent sur le même principe mais, comme nous l'avons indiqué précédemment, le colorant est muni d'un substituant ou vecteur apte à reconnaître spécifiquement les cellules cancéreuses (Figure I-60).

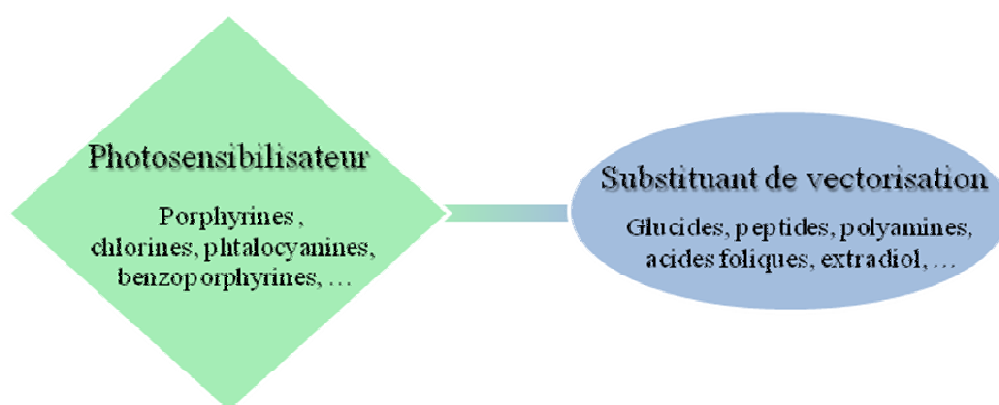


Figure I-60 : photosensibilisateurs de troisième génération

Parmi cette nouvelle classe de photosensibilisateurs, nous pouvons citer le complexe estradiol-porphyrine qui est composé d'un noyau de type tétraphénylporphyrine relié à l'estradiol par le biais d'un bras espaceur (Figure I-61).

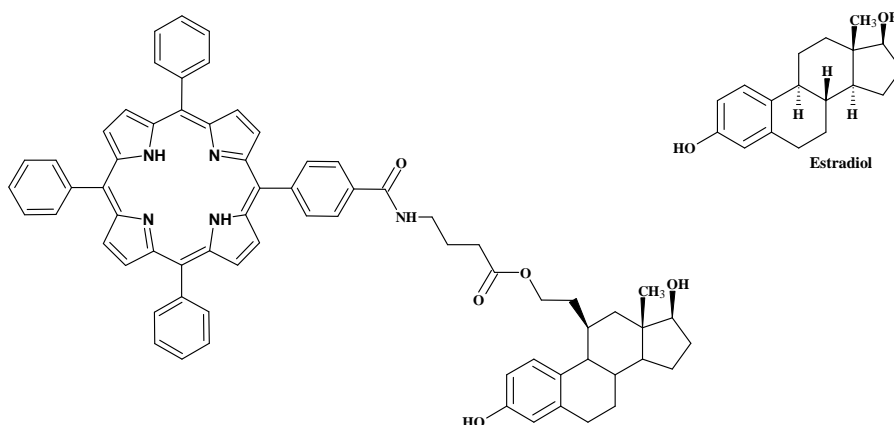


Figure I-61 : Complexe estradiol-porphyrine⁸³

⁸² 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.

Cette molécule reconnaît les récepteurs à œstrogènes qui sont surexprimés par les cellules dans certains cancers (cerveau, ovaires, seins). Les résultats montrent que les récepteurs à œstrogènes reconnaissent sélectivement le photosensibilisateur bien que l'activité photodynamique soit encore faible en raison du noyau porphyrine peu actif.⁸³

De même, le complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique est une molécule ciblant les récepteurs à acide folique (Figure I-62). Ces récepteurs sont en effet surexprimés à la surface de nombreuses cellules cancéreuses (cancer du cerveau, des ovaires, des poumons...) et sont difficiles d'accès à la surface des cellules saines. Cela fait d'elles des cibles privilégiées. Durant les tests *in vitro*, le complexe montre une forte affinité pour ces récepteurs, même si le mécanisme de transport de l'acide folique à l'intérieur de la cellule n'a pas été élucidé. De plus, l'activité photodynamique du complexe est très supérieure à celle du photosensibilisateur seul.⁸⁴

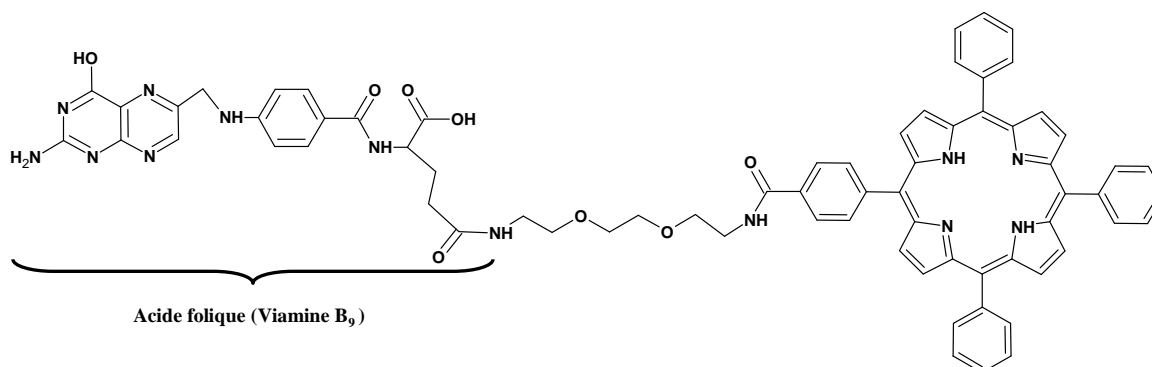


Figure I-62 : Complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique⁸⁴

Parmi les vecteurs spécifiques couplés aux molécules photosensibilisantes, les polyamines apparaissent depuis peu comme une nouvelle classe permettant d'améliorer la sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. En effet, celles-ci sont indispensables à la division cellulaire et leur métabolisme est amplifié dans les cellules tumorales, du fait de la surexpression du gène codant l'ornithine décarboxylase (Figure I-63).⁸⁵ Ce gène est une enzyme libérant le groupement carboxyle de l'acide aminé ornithine produisant la putrescine (polyamine), conduisant à une forte concentration en polyamine (spermidine et spermine).

⁸³ D. A. James, N. Swamy, N. Paz, R. N. Hanson, R.I. Ray; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9(16), 2379-2384

⁸⁴ R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemain, J. F. Mueller, M. Barberi-Heyob; *Bioorg. & Med. Chem.*, **2005**, 13(8), 2799-2808.

⁸⁵ M. Auvinen, A. Paasinen-Sohns, A. Kangas, L. Kangas, O. Saksela, L. C. Andersson, E. Holta; *Cancer Res.*, **1997**, 57, 3016-3025.

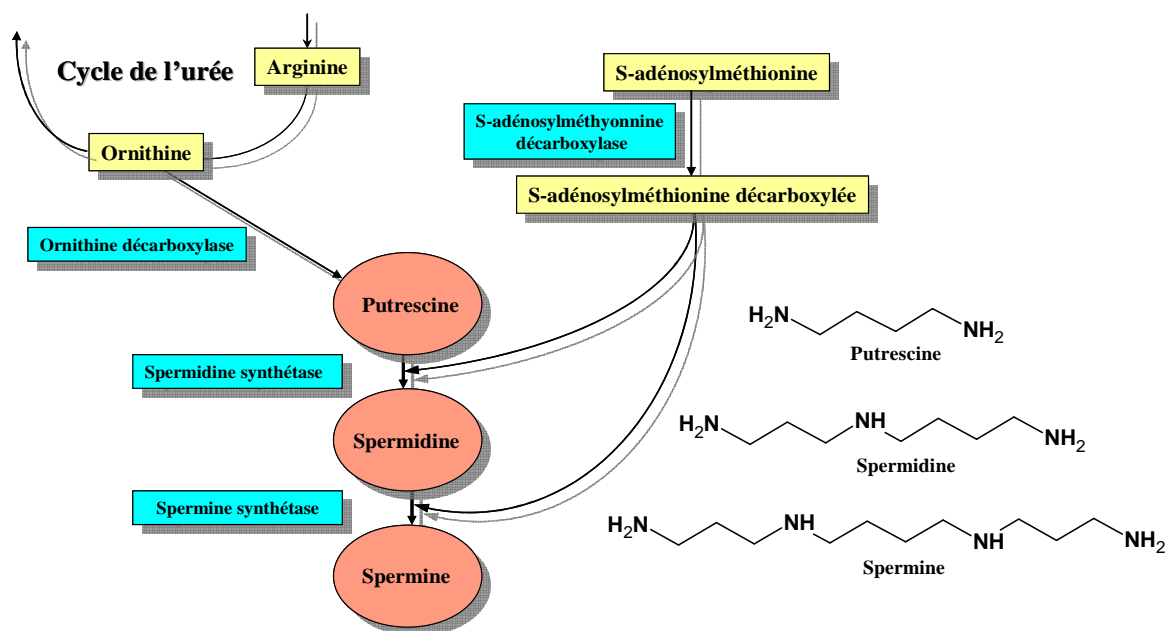


Figure I-63 : Cycle des polyamines⁸⁶

L'étude du métabolisme des polyamines met en évidence des cibles prometteuses. L'une d'entre elle consiste endiguer la production endogène des polyamines en inhibant les enzymes responsables de leur synthèse. Le méthylglyoxal-bis(guanyl)hydrazone (MGBG, Figure I-64), par exemple, permet d'inhiber l'adénosylméthionine décarboxylase et de bloquer, de ce fait, une partie de la biosynthèse. De même, le DFMO (α -difluorométhylornithine, Figure I-64) inhibe l'ornithine décarboxylase, stoppant ainsi la production intracellulaire de putrescine, véritable facteur de croissance. Cependant les cellules cancéreuses s'adaptent aux effets de l'inhibiteur et puisent alors les polyamines circulant dans le sang, garantissant ainsi un stock suffisant pour la croissance et le fonctionnement cellulaire.

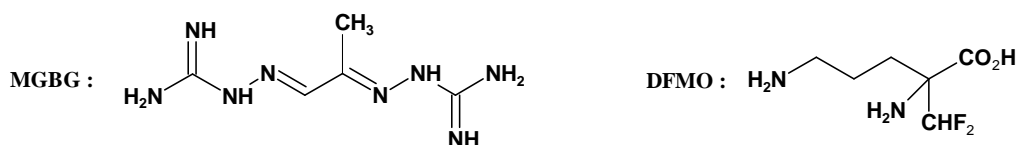


Figure I-64 : Structure d'inhibiteurs du cycle des polyamines

La thérapie antitumorale semble donc s'orienter vers une combinaison de mesures propres à réduire les différentes sources endogènes et exogènes de polyamines. Cette combinaison permet de réduire la prolifération cellulaire cancéreuse mais, en aucun cas, elle ne réduit la

⁸⁶ V. Catros-Quemener, L. Chamaillard, F. Bouet; *médecine/sciences*, **1999**, 15, 1078-1085.

masse tumorale. Cependant ce ralentissement de croissance de la tumeur permet de stimuler les défenses immunitaires⁸⁷ et de réduire la dissémination métastatique⁸⁸. De surcroît, cette carence en polyamines, associée à la présence de molécules anticancéreuses, permet d'amplifier l'efficacité de celles-ci et constitue une autre approche thérapeutique intéressante.⁸⁹ De plus ces dernières possèdent un système de transport des polyamines exogènes caractérisé à la fois par une haute affinité et une faible spécificité. Ainsi de nombreux travaux se sont attachés à fixer des polyamines sur des molécules actives afin d'en améliorer la sélectivité. Les polyamines conjuguées sont reconnues par le système de transport au même titre que les polyamines naturelles. Ainsi, une fois internalisées, les molécules jouent leur rôle anticancéreux. Sur ce principe, Phanstiel et *coll.*⁹⁰ ont synthétisé plusieurs séries d'acridines et d'anthracènes conjugués à des polyamines (Figure I-65). Ces molécules inhibent l'activité des topoisomérases conduisant ainsi à la mort cellulaire. Cohen et *coll.*⁹¹, quant à eux, ont utilisé les propriétés intercalantes du chlorambucil et la présence des polyamines (Figure I-65) pour cibler l'ADN.

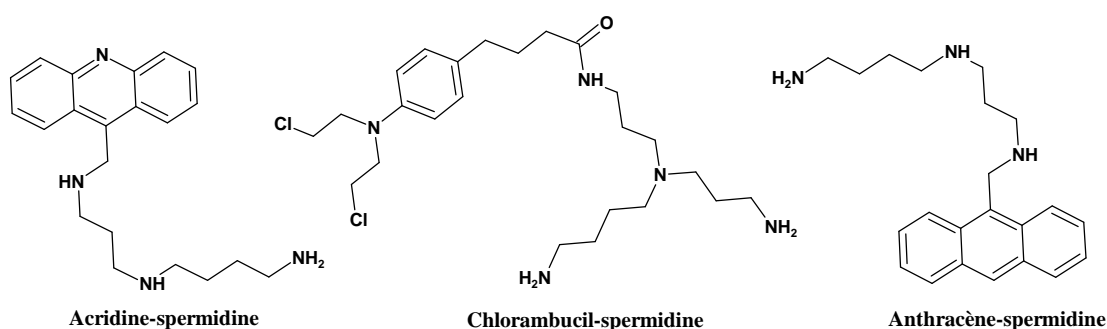


Figure I-65 : Exemples de structures actives conjuguées à des polyamines⁹⁰⁻⁹¹

De même, notre laboratoire s'est intéressé à ces nouveaux vecteurs afin d'augmenter la sélectivité de nos photosensibilisateurs utilisés en PDT. Les dernières synthétisées sont des porphyrines (tritolylporphyrine et protoporphyrine IX), substituées par une ou deux unités

⁸⁷ L. Chamailard, V. Quemener, R. Havouis, J. P. Moulinoux; *Anticancer Res.*, **1993**, 13, 1027-1033.

⁸⁸ N. Seiler, S. Sarhan, C. Grauffel, R. Jones, B. Knodgen, J. P. Moulinoux; *Cancer Res.*, **1990**, 50, 5077-5083.

⁸⁹ V. Quemener, J. P. Moulinoux, R. Havouis, N. Seiler; *Anticancer Res.*, **1992**, 12, 1447-1453.

⁹⁰ O. Phanstiel IV, H. L. Price, L. Wang, J. Juusola, M. Kline, S. M. Shah; *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5590-5599.

⁹¹ a) J. L. Holley, A. Mather, R. T. Wheelhouse, P. M. Cullis, J. A. Hartley, J. P. Bingham, G. M. Cohen; *Cancer Res.*, **1992**, 52, 4190-4195. b) G. M. Cohen, P. M. Cullis, J. A. Hartley, A. Mather, M. C. R. Simons, R. T. Wheelhouse; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 298-300.

spermidines ou spermines (Figure I-66)⁹², et des porphyrines ou chlorines portant deux ou quatre motifs sperminés ou spermidinés (Figure I-67)⁹³.

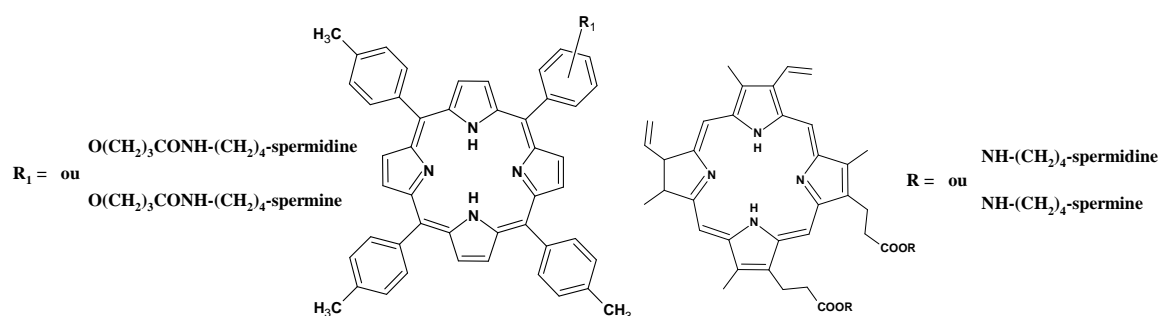


Figure I-66 : Porphyrines polyaminées⁹²

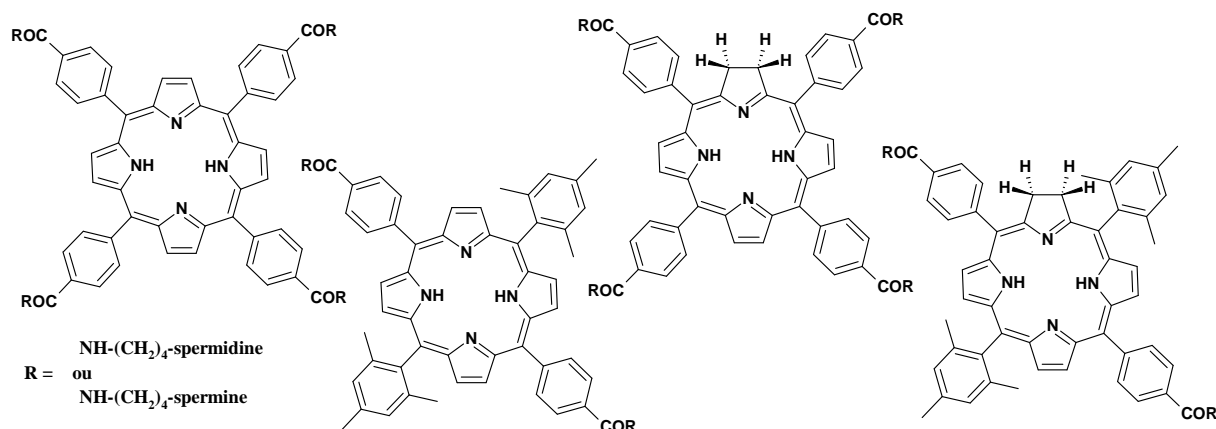


Figure I-67 : Porphyrines et chlorines di et tétrapolyaminées⁹³

Ces molécules, contrairement à leur analogue protégé ou dépourvu de ces vecteurs, ont exprimés une photoactivité comparable au Photofrin[®] vis-à-vis de la lignée cellulaire K562. Ainsi il apparaît que les fonctions amines libres sur les polyamines semblent avoir un rôle prépondérant dans l'acheminement du photosensibilisateur dans la cellule. Actuellement des études complémentaires et approfondies sur le processus de mort cellulaire ainsi que des tests *in vitro* et *in vivo* sur différentes lignées cellulaires sont en cours, et s'avèrent nécessaires pour conduire à une application thérapeutique potentielle.

⁹² V. Sol, F. Lamarche, G. Garcia, M. Enache, R. Granet, M. Guilloton, J.C. Blais, P. Krausz *Bioorg. Med. Chem.*, 14, **2006**, 1364-1377.

⁹³ G. Garcia, V. Sol, F. Lamarche, R. Granet, M. Guilloton, Y. Champavier, P. Krausz; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 3188-3192.

Depuis une vingtaine d'année, la présence d'unités osidiques sur un principe actif a fait l'objet d'un nombre important de travaux. En effet, Monigny et coll.⁹⁴ ont clairement montré que les membranes cellulaires contiennent diverses protéines, parmi lesquelles des récepteurs lectines capables de reconnaître spécifiquement les résidus glycosidiques. Ces récepteurs sont spécifiques d'un sucre, par exemples le récepteur lectine DC-SIGN est spécifique du mannose de même que les monocytes U937 ainsi que les cellules leucémiques K562 sont des récepteurs spécifiques du glucose.⁹⁴ De plus, la présence d'un dérivé polyhydroxylé sur médicament augmente son caractère amphiphile et donc améliore sa durée de vie plasmatique.⁹⁵ Ainsi des photosensibilisateurs glycosylés ont été développés. En effet, les glycoporphyrines présentent par rapport à leur homologue non glycosylés des propriétés physico-chimiques supplémentaires se traduisant par la présence éventuelle d'un centre de chiralité et par un bon équilibre hydrophile/hydrophobe facilitant son transport membranaire.⁹⁶ De surcroît, les unités osidiques peuvent également par encombrement stérique, protéger la cavité du macrocycle et ainsi limiter les phénomènes de dimérisation observés sous leur forme anionique en solution dans l'eau. Par l'étude de la phototoxicité *in vitro* de nombreux macrocycles tétrapyrroliques glycoconjugués, Maillard⁹⁷ a montré que les macrocycles substitués dissymétriquement par deux ou trois monosaccharides sont les plus photocytotoxiques. Plusieurs générations de macrocycles tétrapyrroliques se sont ainsi succédées. Elles diffèrent par la nature de leurs substituants, leur position mais surtout par le type de liaison dans lesquelles les glucides sont engagés sur le macrocycle. Ces dernières sont caractéristiques des méthodes de glycosylation employées. Ce sont principalement des liaisons hétéroatomiques du type éther, ester, thioéther, ou amine, mais on trouve également des liaisons du type C-C.

♦ *O*-glycosylporphyrines : Cette catégorie de porphyrines est la plus développée. Elle est constituée de molécules fonctionnalisées sur les positions β -pyrroliques^{96, 98} ou *meso*-

⁹⁴ a) C. Keda, M. Monigny, *Invasion and Metastasis*, **1986**, 6, 347-366. b) M. Monigny, A. C. Roche, P. Midoux, C. Kiedaet, R. Mayer; in *Lectins and glycoconjugates in oncology : structure, function, clinical application*, eds : H. J. Gabius, G. A. Nagel, Springer-Verlag Heidebberg, **1988**, 25-47.

⁹⁵ A. Gabizon, D. Papahadjopoulos; *Proc. Natl. Sci. USA*, **1988**, 85, 6949-6953.

⁹⁶ K. R. Adams, M. C. Berenbaum, R. Bonnet, A. N. Nizhnik, A. Salgado, M. A. Vallès; *J. Chem. Perkin Trans.*, **1992**, 1, 1465-1470.

⁹⁷ G. Csik, E. Balog, I. Voszka, F. Tolgyesi, D. Oulmi, Ph. Maillard, M. Momenteau; *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **1998**, 44(3), 216-224.

⁹⁸ a) A. F. Mironov, G. M. Isaeva, V. I. Shvets, R. P. Evstihneeva, A. N. Stepanov, A. A. Perov, S. E. Kupriyanov; *Inorganicheskaya Khimiya*, **1978**, 4, 1410-1413. b) R. Bonnett, A. N. Nizhnik, M. Berenbaum; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1822-1823. c) G. Fülling, D. Schröder, B. Franck, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1990**, 28, 1519. d) A. Bourhim, S. Czernercki, P. Krausz, A. Viari, P. Vigny; *Carbohydr. Chem.*, **1990**, 9, 761-765. e) J. H. Fuhrhop, C. Demoulin, C. Boettcher, J. Köning, U. Siggel; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4159-4165.

porphyriniques⁹⁹⁻¹⁰⁰. Ces composés présentent des symétries variables, ils peuvent être mono ou polyglycosylés. Les glucides *O*-liés sont engagés dans des liaisons éthers ou esters à partir de carbones anomériques ou des fonctions alcools primaires ou secondaires. Dans tous les cas ils sont reliés au macrocycle porphyrinique par l'intermédiaire d'un groupement espaceur. Celui-ci est en général une chaîne alkyle pour les porphyrines substituées en position β -pyrrolique et un groupement aryle dans le cas des *meso*-porphyrines (Figure I-68).

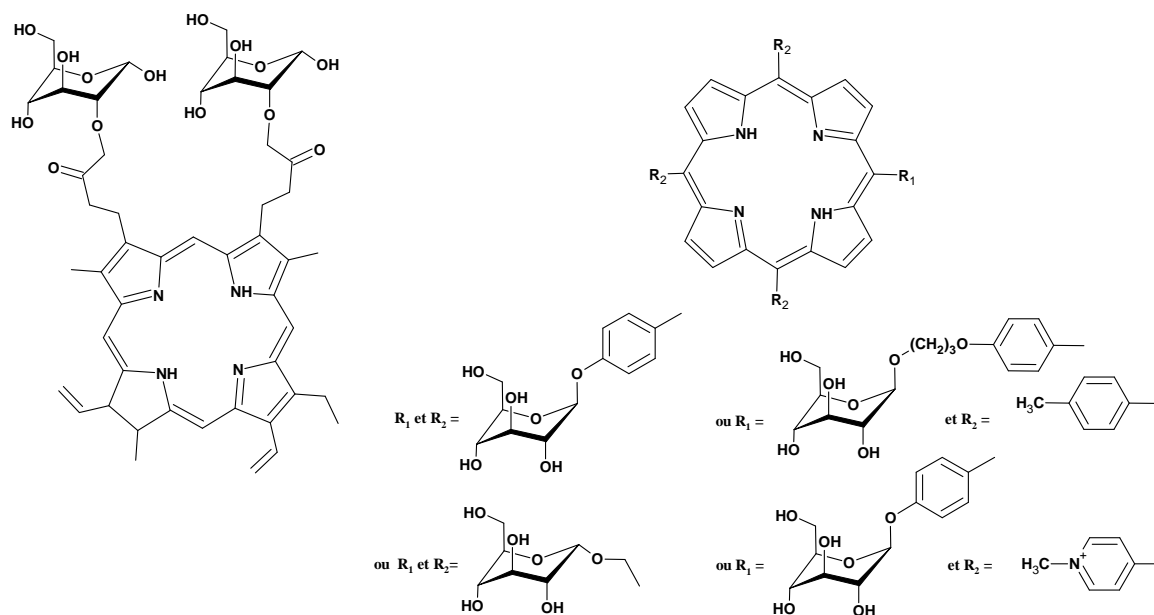


Figure I-68 : Exemples de *O*-glycosylporphyrines⁹⁸⁻⁹⁹

Une autre porphyrine, candidate potentielle pour le traitement curatif du rétinoblastome, est à rattacher à cette série (Figure I-69). Le rétinoblaste est la tumeur maligne intraoculaire la plus commune de l'enfant, touchant un bébé sur 20 000 naissances. Le traitement actuel de cette maladie orpheline est basé sur l'utilisation d'anticancéreux mutagènes (tel que le carboplatine) qui augmente le risque de développement de tumeurs secondaires. Même si cette porphyrine *para*-triglucoconjuguée n'est pas aussi efficace que le Foscan[®], elle présente à l'obscurité une toxicité *in vitro* inférieure à celui-ci.⁹⁷

⁹⁹ a) M. B. Gonzalez, A. C. Weedon, *Can J. Chem.*, **1984**, 63, 602-608. b) Ph. Maillard, J. L. Guerquin-Kern, M. Momenteau, S. Gaspard, *J. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 9125-9127. c) Y. Kuroda, T. Hiroshige, T. Sera et H. Ogoshi, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 192, 347-350. d) K. Driaf, P. Krausz, B. Verneuil, M. Spiro, J. C. Blais et G. Bolbach; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 1027-1030. e) A. Bourhim, O. Gaud, R. Granet, P. Krausz, M. Spiro; *Synlett*, **1993**, 563-564.

¹⁰⁰ Utilisation de la métathèse des alcènes pour la synthèse de porphyrines *O*- et *C*-glycosylées éthyléniques- Application à la photothérapie dynamique. *Thèse soutenue par L. Gachard-Bouty*, Université Limoges, LCSN, **2003**.

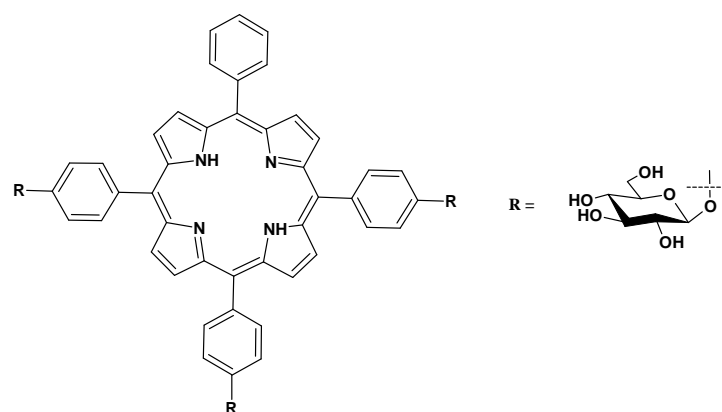


Figure I-69: Porphyrine *para*-triglucoconjuguée présentant une bonne activité *in vitro* dans le traitement du rétinoblastome⁹⁷

◆ *N*- ou *S*-glycoporphyrines : Les rares exemples rapportés dans la littérature correspondent tous à des *meso*-arylglycosylporphyrines.¹⁰¹ Quelques exemples comme les *N*-glycosylporphyrines neutres et cationiques synthétisées par Czuchajowski^{101c} ainsi qu'une "cyclodextrin-sandwiched porphyrin" synthétisées par Kuroda et *coll.*^{101d} sont représentés sur la figure I-65 et figure I-66.

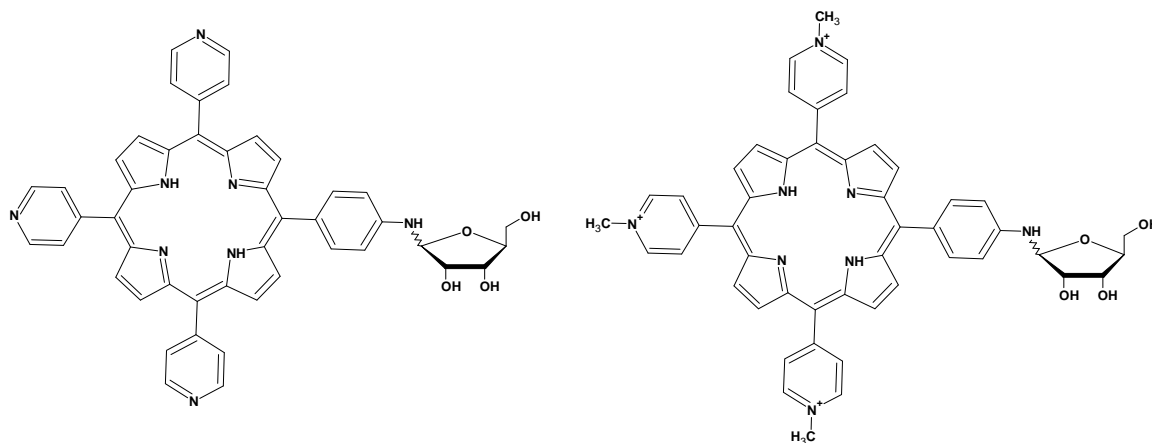


Figure I-70 : Exemples de *N*-glycosylporphyrines¹⁰¹

¹⁰¹ a) Y. Kuruda, T. Hiroshige, T. Sera, Y. Shirowa, H. Tanaka et H. Ogoshi; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 1912. b) L. Czuchajowski, H. Li; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 1629-1630. c) Y. Kuruda, H. Ogoshi; *Synlett*, **1994**, 319-324.

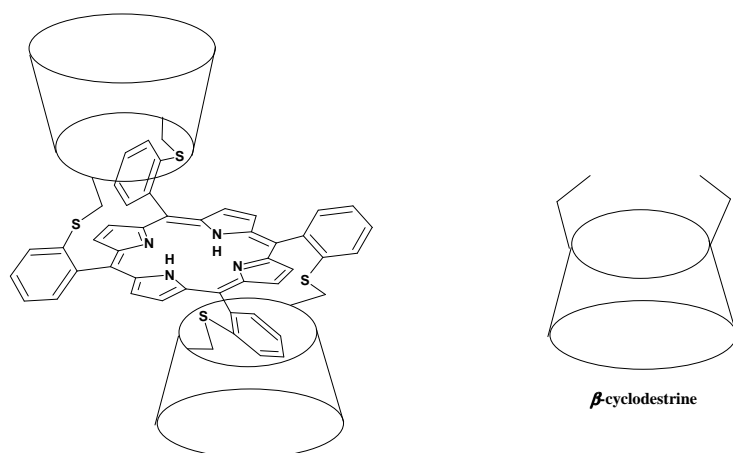


Figure I-71 : Exemple de *S*-glycosylporphyrines^{101d}

♦ C-glycosylporphyrines : Cette classe de glycosylporphyrines est également peu représentée.¹⁰⁰⁻¹⁰² Dans cette catégorie de glycosylporphyrines, les unités glucidiques sont directement liées au macrocycle. Les rares travaux effectués par Maruyama et *coll.*^{102a} et Cornia et *coll.*^{102d} ont conduit à l'obtention de glycosylporphyrines *meso*- et β -substituées (Figure I-72).

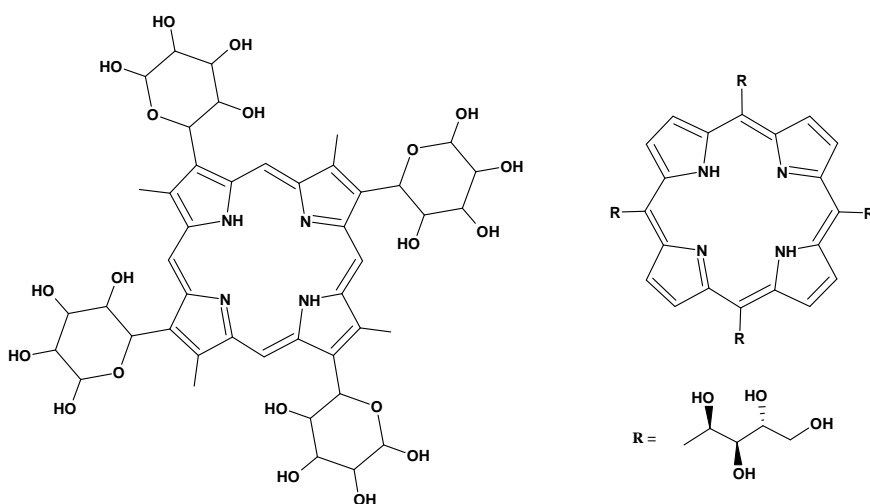


Figure I-72 : Exemples de C-glycosylporphyrines¹⁰²

Parmi la classe des glycoporphyrines, on trouve aussi des porphyrines cationiques. Ces molécules, synthétisées aussi au sein de notre laboratoire, sont préparées pour cibler les récepteurs osidiques augmentant par la même occasion leur amphiphilie (Figure I-73).^{99d}

¹⁰² a) N. Ono, M. Bougauchi, K. Maruyama; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 1629-1632. b) G. Casiraghi, M. Cornia, G. Rassu, C. Del Sante, P. Spanu, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 48, 5619-5928. c) M. Cornia, G. Casiraghi, S. Binacchi, F. Zanardi et G. Rassu; *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 1226-1230. d) G. Casiraghi, M. Cornia, F. Zanardi, G. Rassu, E. Ragg, R. Bortolini; *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 1801-1808.

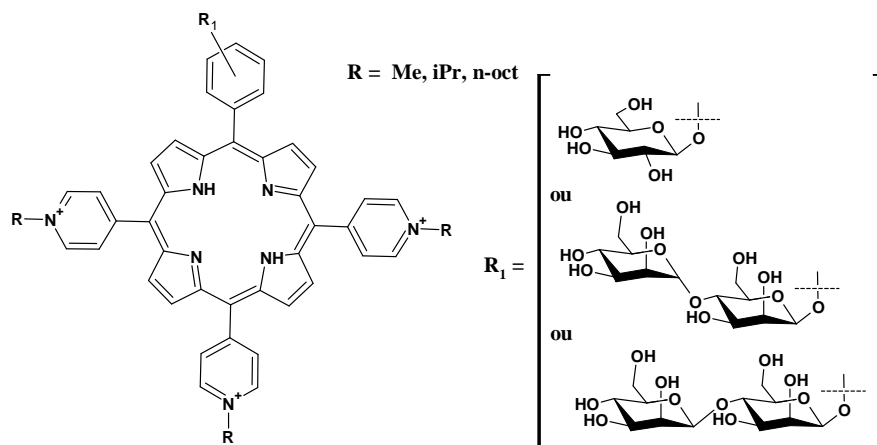


Figure I-73 : Porphyrines glycosylées cationiques⁹⁹

Plus récemment des glycoporphyrines à bras espaceur sont apparues. Ainsi Pandey et *coll.*¹⁰³, ont montré que des chlorines liées à un β -galactose via un bras espaceur ont une forte affinité pour les récepteurs galectines tout en présentant une bonne activité photodynamique (Figure I-74).

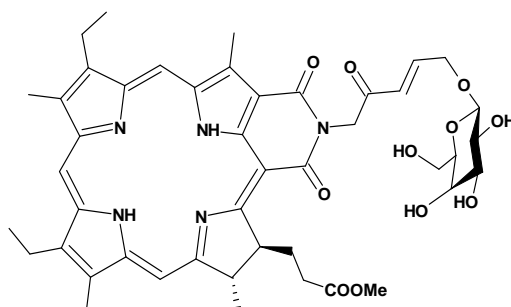


Figure I-74 : Chlorine β -galactose¹⁰³

De même, Maillard et *coll.*⁹⁷ ont développé de nouvelles molécules triglycoconjuguées capables de cibler spécifiquement - *in vitro* - les lectines surexprimées sur les cellules de rétinoblastome.¹⁰⁴ A travers ces travaux, ils ont démontré que la glycosylation, sur le macrocycle muni d'un bras espaceur, augmente significativement l'activité photodynamique de ce dernier (Figure I-75).

¹⁰³ G. Zheng, A. Graham, M. Shibata, J. R. Missert, A.R. Oseroff, T. J. Dougherty, R. K. Pandey; *Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 66(26), 8709-8716.

¹⁰⁴ I. Laville, S. Pigaglio, J.C. Blais, F. Doz, B. Loock, P. Maillard, D. S. Grierson, J. Blais, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49(8), 2558-2567.

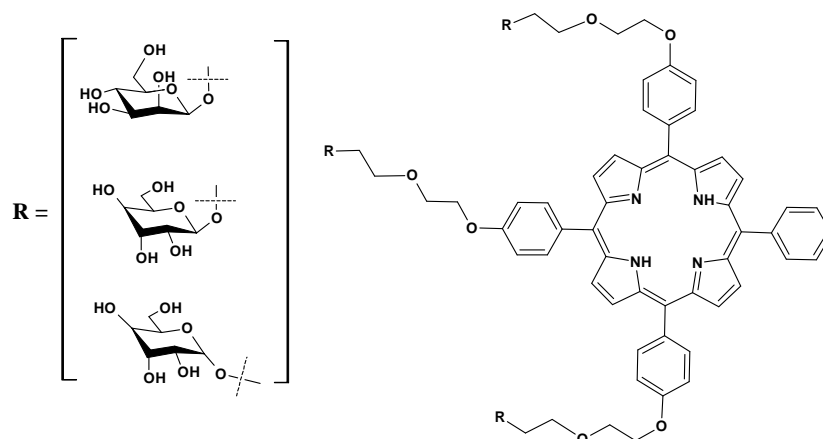


Figure I-75 : Porphyrine triglycoconjuguée liée à un bras espaceur diéthylène glycol¹⁰⁴

Il existe aussi des porphyrines glycosylées présentant un motif dérivé d'acide aminé. Ces molécules hybrides, synthétisées au sein de notre laboratoire, portant un ou plusieurs acides aminés (alanine), ont été préparées afin de cibler des récepteurs glycosidiques mais également des sites spécifiques à ces acides aminés (Figure I-76).¹⁰⁵

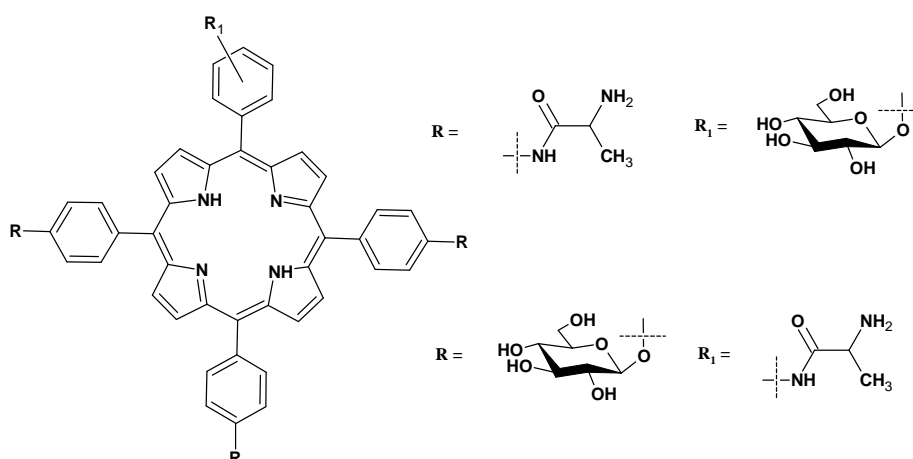


Figure I-76 : Porphyrines substituées par des acides aminés et par des unités osidiques¹⁰⁵

Le LCSN a également élaboré la synthèse des porphyrines possédant un petit peptide à 3 ou 5 unités comportant la séquence RGD (arginine, glycine, acide aspartique).¹⁰⁶ En effet cette dernière permet de cibler spécifiquement les intégrines de surfaces des cellules endothéliales lors de la néovascularisation (métastase) et plus particulièrement le récepteur $\alpha_v\beta_3$ (Figure I-77).

¹⁰⁵ V. Sol, J. C. Blais, V. Carre, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz; *Journal of Organic Chemistry*, **1999**, 64(12), 4431-4444.

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

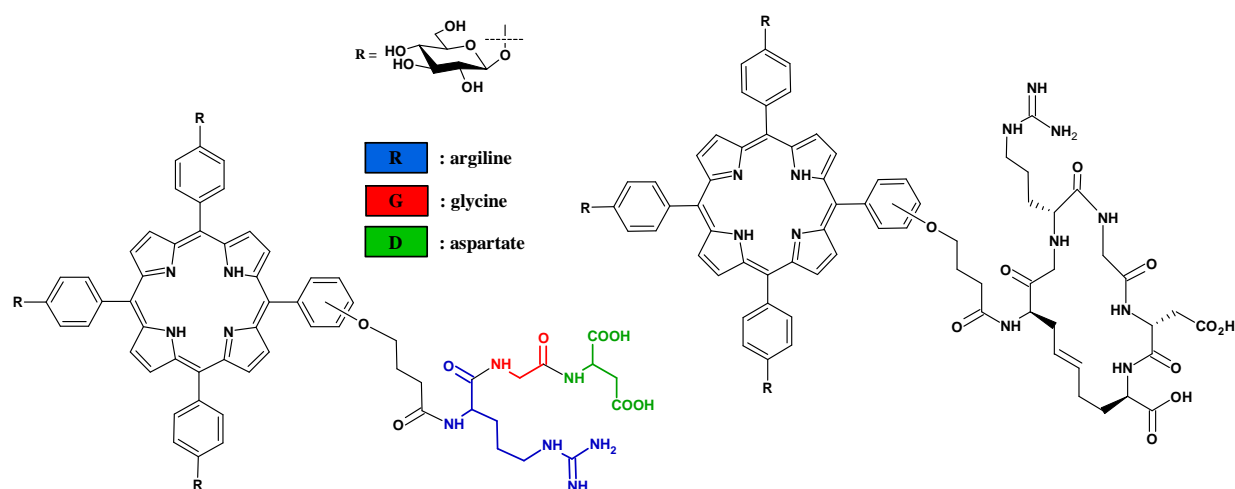


Figure I-77 : Complexe linéaire RGD-porphyrine-glucose et cyclisé RGD-porphyrine-glucose¹⁰⁶

Enfin, Parmi la classe des photosensibilisateurs de troisième génération il existe des macrocycliques tétrapyrroliques liées à des groupements protéiques permettant le ciblage de cellules malignes. A titre d'exemple, il existe une molécule "chimère" obtenue par liaison covalente entre la sous-unité B de la toxine de Shiga (Figure I-78) et une porphyrine.¹⁰⁷ Les mesures de son activité photodynamique *in vitro* montrent que celle-ci est dépendante de la présence, sur les membranes des cellules utilisées, de récepteurs transmembranaire de la toxine. La toxine de Shiga est composée de deux unités : A et B. La sous-unité B se lie à certains glycolipides spécifiques de la membrane (le globotriaosylceramide (Gb3)) ce qui permet au photosensibilisateur de se lier spécifiquement à la cellule visée.

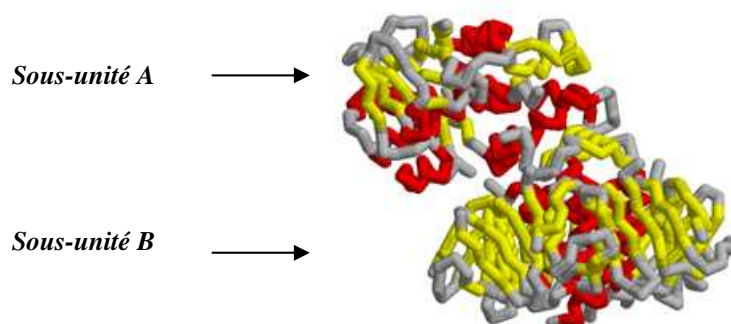


Figure I-78 : Toxine de Shiga¹⁰⁷

¹⁰⁷ M. T. Tarrago-Trani, S. Jiang; K. C. Harich; B. Storrie; *Photochemistry and photobiology*, **2006**, 82(2), 527-37

f) Autres applications thérapeutiques

Les photosensibilisateurs et la photothérapie dynamique trouvent des applications dans d'autres domaines que les traitements anticancéreux. L'exemple le plus marquant est l'utilisation d'un dérivé de benzoporphyrine dans un traitement de la cécité. La vertéporfine est commercialisée dans une formulation liposomiale sous le nom de Visudyne[®] (Figure I-79).

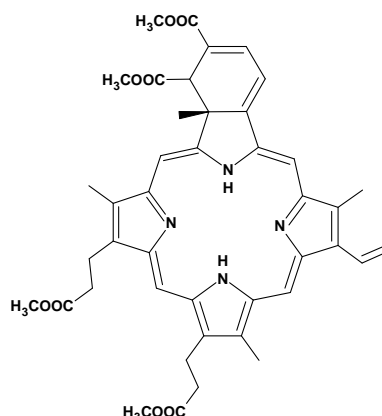


Figure I-79 : Structure de la vertéporfine

Cette molécule est indiquée dans les cas de la DMLA chez les patients présentant une néovascularisation choroïdienne causant une perte de vision centrale. La DMLA touche essentiellement les personnes de plus de 50 ans.¹⁰⁸ La sélectivité de cette molécule s'effectue essentiellement par le biais des lipoprotéines de faible densité (LDL) dont les récepteurs sont surexprimés au niveau de la néovascularisation choroïdienne. La vertéporfine forme des complexes avec les LDL et ceux-ci sont acheminés vers les néo-vaisseaux. La formulation liposomiale permet d'augmenter la solubilité et la sélectivité vis-à-vis des protéines sanguines. La molécule est irradiée à la longueur d'onde de 689 nm par une lumière laser, 15 à 30 minutes après l'injection.¹⁰⁹ L'oxygène actif (oxygène singulet) cause alors des dommages aux néo-vaisseaux aboutissant à la vasoconstriction et l'occlusion de ceux-ci.

Une autre utilisation des photosensibilisateurs, développée en particulier dans notre laboratoire, est la photochimiothérapie antimicrobienne (PACT).¹¹⁰ Le processus

¹⁰⁸ G. Soubrane, N. M. Bressler; *Br. J. Ophthalmol.*, **2001**, 85, 483-495.

¹⁰⁹ K. J. Messmer, S. R. Abel; *Ann. Pharmacother.*, **2001**, 35, 1593-1598.

¹¹⁰ V. Sol, P. Branland, V. Chaleix, R. Granet, M. Guilloton, F. Lamarche, B. Verneuil, P. Krausz; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 4207-4211.

photochimique générant l'oxygène singulet endommage l'ADN et les sites membranaires bactériens. Cependant en raison de la nature de la paroi bactérienne, certains photosensibilisateurs semblent inadéquats. En effet, pour les Gram⁻, les photosensibilisateurs anioniques sont inefficaces. Les photosensibilisateurs cationiques, quant à eux, montrent une activité antibactérienne vis-à-vis des types Gram⁻ et les Gram⁺.¹¹¹ De plus, la photochimiothérapie peut être un traitement alternatif aux maladies où les bactéries présentent des résistances multiples aux drogues. Ainsi l'hématoporphyrine et la tétra-(*N*-méthylpyridyl)-porphyrine (Figure I-80) photoinactive, respectivement les bactéries, *Staphylococcus aureus*, (Gram⁺) et *Acinetobacter baumannii* (Gram⁻), responsables de très nombreuses infections nosocomiales.^{112, 113}

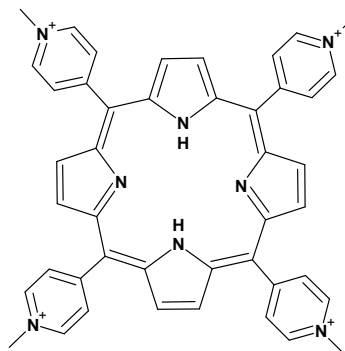


Figure I-80 : Structure de la tétra-(*N*-méthylpyridyl)-porphyrine (TMPyP)¹¹²⁻¹¹³

Toutefois les macrocycles n'ont pas besoin d'être systématiquement activés par la lumière pour posséder une application thérapeutique. Ainsi, certaines porphyrines sulfonées possèdent des propriétés antivirales, notamment contre le VIH (virus d'immunodéficience humaine). Elles interfèrent dans la liaison virus-récepteurs cellulaires, inhibant ainsi la réplication du virus.¹¹⁴ D'autres porphyrines, métallées et chargées, peuvent se fixer à l'ADN et couper celui-ci. Le rôle de catalyseur d'oxydation du macrocycle métallé est alors utilisé, en présence d'un donneur d'oxygène, pour endommager les bases nucléiques.¹¹⁵

¹¹¹ K. O'Riordan, O. E. Akilov, T. Hasan; *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2005**, 2, 247-262.

¹¹² G. Bertoloni, F. M. Lauro, G. Cortella, M. Merchat; *Biochem. Biophys. Acta*, **2000**, 1475, 169-174.

¹¹³ Y. Nitzan, H. Ashkenazi; *Curr. Microbiol.*, **2001**, 42, 408-414.

¹¹⁴ D. W. Dixon, A. F. Gill, L. Giribabu, A. N. Vzorov, A. B. Alam, R. W. Compas; *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99, 813-821.

¹¹⁵ B. Mestre, A. Jakobs, G. Pratviel, B. Meunier; *Biochemistry*, **1996**, 35, 9140-9149.

6. Finalité du travail

Le cancer étant la deuxième cause de mortalité chez l'homme, la recherche de nouveaux principes actifs de plus en plus efficaces reste un problème d'actualité. De ce fait nous sommes intéressés à la synthèse de nouvelles molécules potentiellement actives en vue de leur application à la photothérapie dynamique, technique innovante qui a été récemment acceptée en clinique pour traiter un certain nombre de cancers et ne présentant pas tous les inconvénients des autres traitements.

Actuellement dans le secteur médical, quelques porphyrines possèdent une affinité élevée pour certaines cellules tumorales et peuvent agir en tant que photosensibilisateurs rendus cytotoxiques par irradiation lumineuse dans la thérapie photodynamique.¹¹⁶ Malheureusement, la lumière est fortement absorbée par les tissus corporels limitant ainsi les applications cliniques. La pénétration la plus forte, au travers des tissus, se fait à des longueurs d'ondes élevées (700 nm) et pour cette raison de nombreux efforts sont dirigés vers le développement de nouveaux photosensibilisateurs efficaces qui absorbent entre 600 et 800 nm.¹¹⁶ La présence de bandes d'absorption plus intenses, dans la région rouge et proche infrarouge, résultant de la modification du chromophore de porphyrine conduit à de nombreuses applications potentielles en PDT.¹¹⁶⁻¹¹⁷ En outre, ces modifications fournissent de nouveaux horizons de synthèses par rapport à la nature de la conjugaison et de l'aromaticité dans des systèmes porphyriniques. Dans ce domaine, les dérivés de porphyrine¹¹⁸ (*meso*- et β -substitués), les oligomères de porphyrines¹¹⁹ et les hydroporphyrines modifiées¹²⁰, telles que les chlorines et les isobactériochlorines, ont été largement étudiés.

D'autres analogues porphyriniques, encore peu étudiés, présentant des caractéristiques très intéressantes pour leur utilisation en tant que photosensibilisateur en PDT sont les benzoporphyrines. Cependant, une étude détaillée de la littérature montre que ces dernières possèdent une faible solubilité pouvant s'avérer être un inconvénient majeur en PDT. En revanche, les tétrabenzoporphyrines substituées sur les positions *meso*, par un groupement

¹¹⁶ a) S. B. Brown, T. G. Truscott, *Chem. Br.*, **1993**, 29, 955-958. b) R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 19-33. c) L. R. Milgrom, S. MacRobert, *Chem. Br.* **1998**, 34 (35), 45-50.

¹¹⁷ a) J. Fabian, H. Nakazumi, M. Matsuoka, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1197-1226. b) S. Anderson, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders; *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 469-475. c) R. W. Wagner, T. E. Johnson, J. S. Lindsey; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 11166-11180. d) M. J. Crossley, P. L. Burn; *J. Chem. Commun.*, **1991**, 1569-1571.

¹¹⁸ a) E. J. Vogel; *Heterocyclic Chem.* **1996**, 33, 1461. b) P. J. Chmielewski, L. Latos-Grazynski, K. Rachlewicz, T. Glowiak; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1994**, 33, 779-781. c) H. Furuta, T. Asano, T. J. Ogawa; *Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 767-768. d) S. J. Narayanan, A. S. Sridevi, T. K. Chandrasekar, R. Roy; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7389-7392.

¹¹⁹ J. Ayub, D. Dolphin; *Chem Rev.*, **1997**, 97, 2267-2346.

¹²⁰ F. P. Montforts, B. Gerlach, F. Höper; *Chem. Rev.*, **1994**, 94, 327-347.

volumineux (cycloalcanes, phényle, hétérocycles), s'avèrent beaucoup plus solubles. Ce gain de solubilité est dû en partie à leur conformation non plane induite par l'encombrement stérique.¹²¹ En effet cette distorsion diminue l'effet de stacking de ces molécules. Pour ces raisons nous avons opté pour la tétraphényltétrabenzoporphyrine en tant que base structurale pour nos photosensibilisateurs. Par la suite et afin d'obtenir des molécules photosensibilisantes de troisième génération, cette base structurale a été substituée par des fonctions de vectorisation telles que des polyamines (Figure I-81) ou des glucides (Figure I-82).

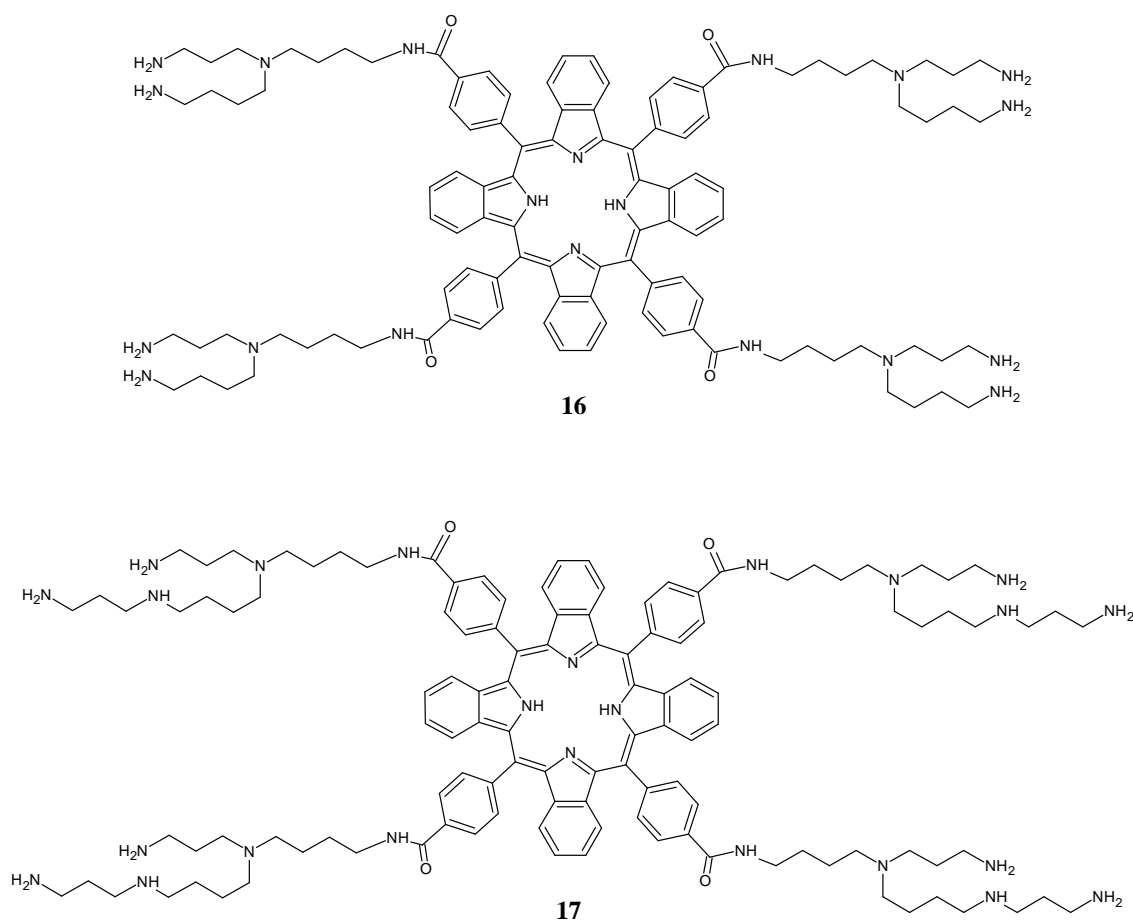


Figure I-81 : Structures des composés polyaminés finaux synthétisés au cours de ce travail

¹²¹ a) R. J. Cheng, Y. R. Chen, S. L. Wang, C. Y. Cheng; *Polyhedron* **1993**, 12, 1353. (b) O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, P. J. Carroll, S. Dalosto, S. A. Vinogradov; *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 6944-6946.

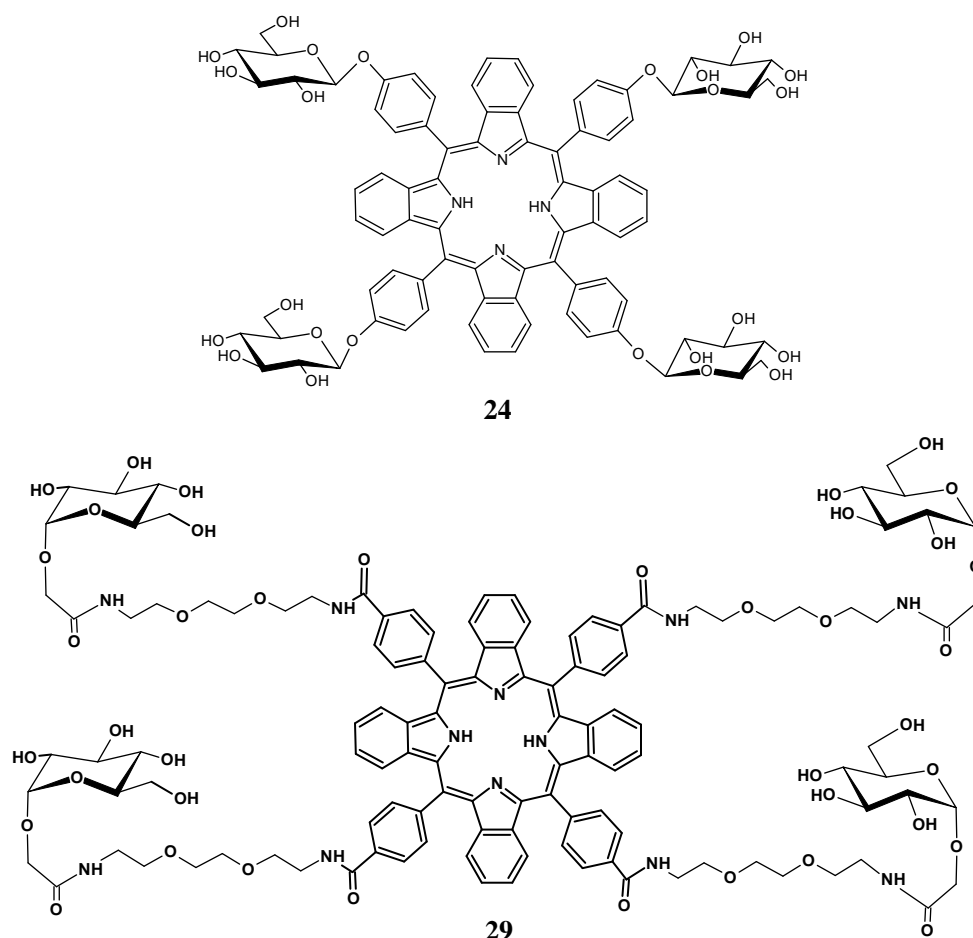


Figure I-82 : Structures des composés glucosylés finaux synthétisés au cours de ce travail

Compte tenu du rôle majeur des unités polyaminées pour le transport de molécules biologiques et le ciblage des cellules tumorales, nous avons pensé que la fixation de telles structures sur des photosensibilisateurs devrait assurer la reconnaissance des tumeurs cancéreuses, réduisant ainsi les problèmes liés au manque relatif de sélectivité qui caractérise la plupart des porphyrines actuellement développées. Ainsi, nous avons mis au point, au laboratoire, la synthèse de tétrabenzoporphyrines portant quatre motifs polyaminés. Afin d'optimiser le ciblage des cellules cancéreuses, via le système de transport des polyamines et/ou l'interaction avec l'ADN, plusieurs caractéristiques semblent nécessaires, dont une distance appropriée entre les deux fonctions amine primaire, pour permettre la fixation d'une chaîne flexible de quatre carbones sur les polyamines, ceci afin de favoriser le transport de ces molécules ainsi qu'un minimum de trois charges positives afin d'assurer l'affinité avec l'ADN.¹²² Nous avons choisi comme polyamines la spermidine et la spermine qui fixées au

¹²² C. W. Porter, J. Miller, R. J. Bergeron; *Cancer Res.*, **1984**, 44, 126-128.

macrocycle benzoporphyrinique, au moyen d'un bras espaceur en position N^4 , permet de renforcer le caractère basique de l'azote central et, de ce fait, d'améliorer son incorporation cellulaire.⁹¹ De plus, la chaîne aliphatique permet d'éloigner le macrocycle du vecteur afin de faciliter le contact avec les récepteurs cellulaires. Du fait de la présence d'une bande d'absorption plus intense vers 650 nm, la formation de tétrabenzoporphyrines de synthèse permet l'utilisation de ces complexes photosensibilisateur-polyamines dans le traitement de cancers plus profonds.

Suite aux travaux de Monsigny précédemment présentés (Paragraphe 5-3-e), de nombreuses études, dont certaines effectuées au sein de notre laboratoire^{105-106,123}, ont montré que les porphyrines glycosylées sont de bonnes candidates à la photothérapie dynamique (Chapitre I-5-3). En effet la présence d'unité(s) glucidique(s) assure une meilleure sélectivité et permet d'accroître le caractère amphiphile de la molécule, ce qui favorise d'une part le transport du photosensibilisateur vers la tumeur et d'autre part sa pénétration et sa rétention au sein des cellules cancéreuses.¹²⁴ Ainsi, sur la base de ces résultats, nous nous sommes intéressés tout d'abord à la synthèse d'une tétrabenzoporphyrine portant des motifs β -D-glucose. Par la suite, des travaux⁸⁴ ont montré que la présence d'un bras éthylène-glycol entre le photosensibilisateur et un agent de ciblage améliore la flexibilité de ce dernier et facilite la reconnaissance par les récepteurs spécifiques des cellules cancéreuses. De plus le caractère hydrosoluble du complexe chromophore-vecteur est augmenté. Dans ce but, la synthèse d'une tétrabenzoporphyrine portant des motifs α -D-glucose relié par un bras espaceur a été réalisée.

Enfin nous présentons les résultats d'une étude préliminaire d'activité biologique de ces nouveaux photosensibilisateurs sur deux lignées cancéreuses humaines du type MCF-7 et HaCaT.

¹²³ a) I. Sylvain, R. Benhaddou, V. Carre, S. Cottaz, H. Driguez, R. Granet, M. Guilloton, P. Krausz; *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **1999**, 3(1), 1-4.

¹²⁴ K. Berg, J. C. Bommer, J. Moan; *Cancer Lett.*, **1989**, 44(1), 7-15.

Chapitre II

Synthèses de tétrabenzoporphyrines tétrapolyaminées

1. Introduction

Nous avons réalisé, dans un premier temps, la synthèse et la caractérisation de tétrabenzoporphyrines portant quatre motifs spermidine **16** ou spermine **17** (Figure II-1). Ces motifs augmentent le caractère amphiphile du macrocycle facilitant son transport en milieu biologique. De plus la présence de bras espaceurs entre l'unité porphyrinique et les unités polyamines va permettre d'accroître la flexibilité des ces derniers pour une meilleure interaction avec la cible cellulaire (ADN, ...).

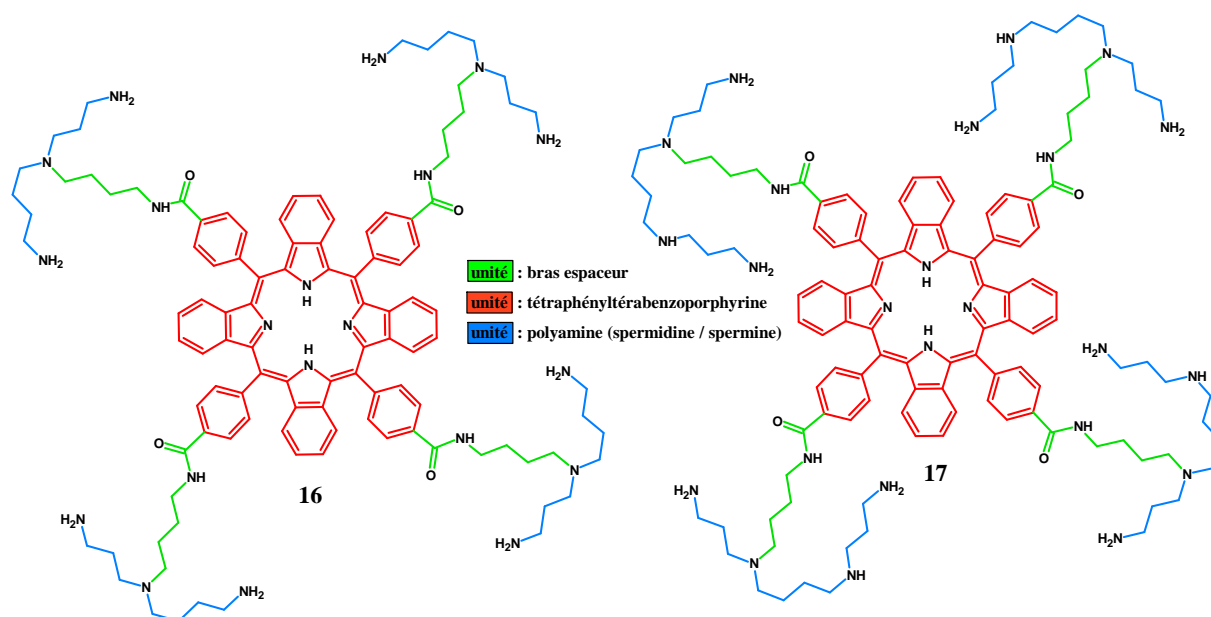


Figure II-1 : Tétrabenzoporphyrines tétrapolyaminées synthétisées

2. Stratégie de synthèse

Les étapes de synthèse sont représentées sur le schéma rétrosynthétique de la figure II-2. Dans ce but, nous nous sommes intéressés tout d'abord à l'élaboration du synthon macrocyclique : la tétracarboxyphényltétabenzoporphyrinique **7** (Figure II-2). Il est obtenu selon la méthode de Vinogradov et *coll.*⁴² par condensation du tétrahydroisoindole sur le 4-carboxyméthylbenzaldehyde suivi d'une réaction d'oxydation. Après fixation d'une chaîne alkyle sur la spermidine et la spermine préalablement protégées par des groupements Boc, les précurseurs polyaminés sont couplés au synthon **7**. Les composés finaux **16** et **17** sont isolés après déprotection des fonctions amines des polyamines.

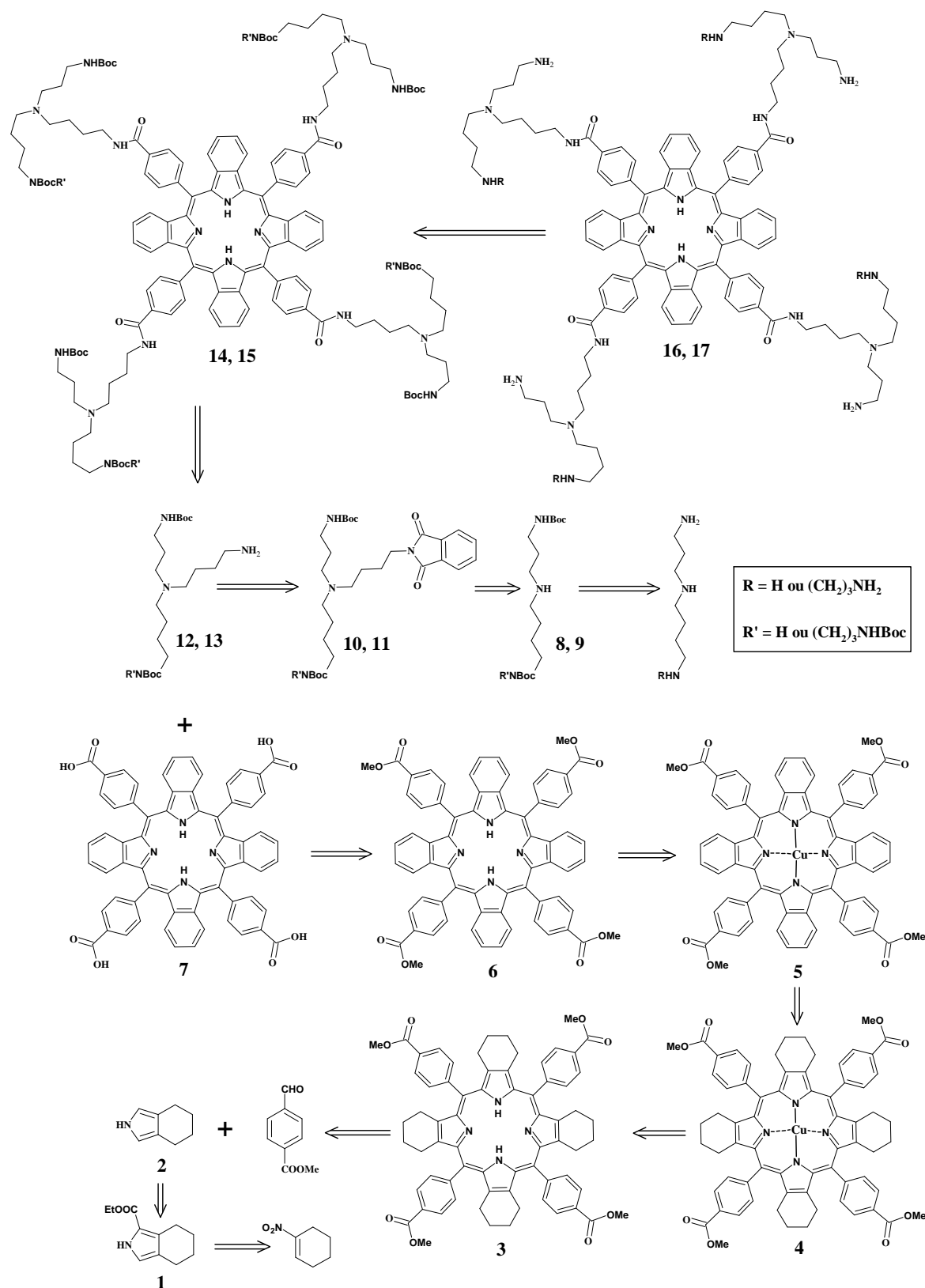


Figure II-2 : Schéma rétrosynthétique

3. Synthèse du synthon tétracarboxyphényltétrabenzoporphyrinique (7)

Le choix de la base structurale de nos photosensibilisateurs s'est orienté vers les tétrabenzoporphyrines pour les raisons énoncées précédemment. Au travers les différentes méthodes de synthèse de tétrabenzoporphyrines *meso*-substituées évoquées dans le chapitre précédent, nous avons choisi celle décrite par Vinogradov et *coll.*⁴². Elle possède l'avantage de ne pas utiliser de groupement activant, s'effectue dans des conditions douces et permet d'obtenir une grande diversité de tétraphényltétrabenzoporphyrines.

3-1 Généralités

Le schéma réactionnel représenté sur la figure II-3 décrit les étapes nécessaires à la formation du macrocycle tétracarboxyphényltétrabenzoporphyrinique 7.

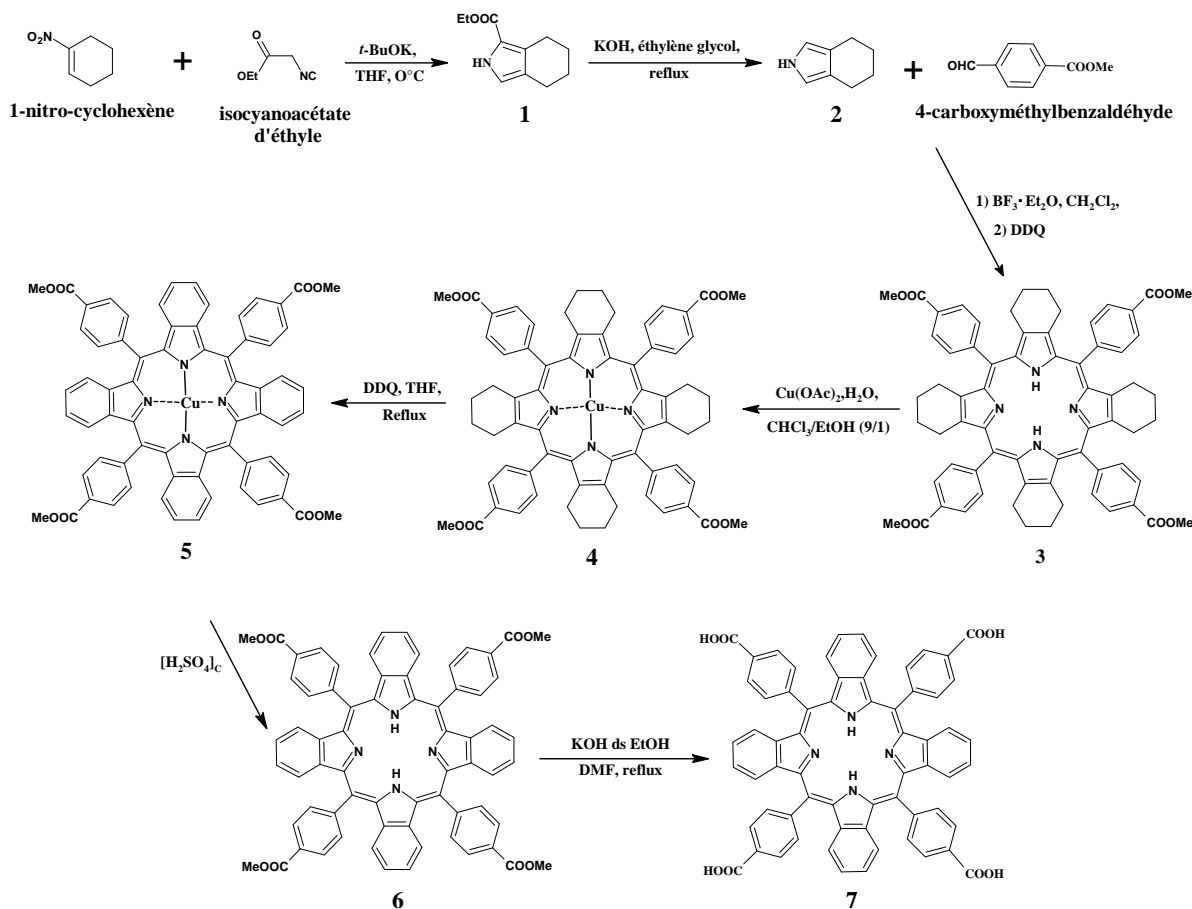


Figure II-3 : Schéma général de la synthèse du synthon tétracarboxyphényltétrabenzoporphyrinique (7)

Le 1-nitro-cyclohexène est d'abord condensé avec l'isocynoacétate d'éthyle pour former l'ester tétrahydroisindole **1** qui fournit, après saponification et décarboxylation, la tétrahydroisindole **2**. Cette dernière, instable, est directement additionnée, dans les conditions de Lindsey, au 4-carboxyméthylbenzaldéhyde pour former le macrocycle tétracyclohexènoporphyrine **3**. Ce composé est ensuite métallé par le cuivre (**4**), puis oxydé (**5**) et enfin démétallé en milieu acide concentré pour fournir la benzoporphyrine **6**. Celle-ci est finalement saponifiée afin de libérer les fonctions carboxyliques conduisant alors au composé désiré **7**.

3-2 Synthèse de l'ester tétrahydroisindole (**1**)

Cette réaction est basée sur la méthode de Barton-Zard³⁵ (Figure II-4). Le 1-nitrocyclohexène est condensé sur l'isocynoacétate d'éthyle en présence d'une base, le *tert*-butylate de potassium, dans le tétrahydrofurane anhydre.

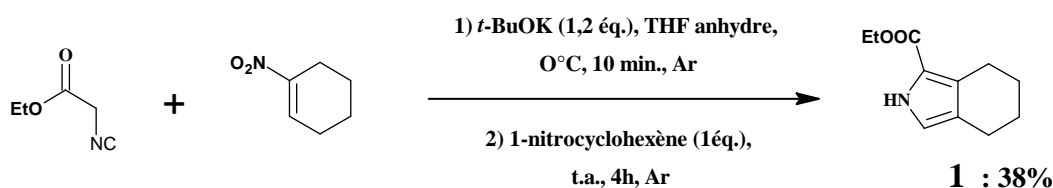


Figure II-4 : Formation du 2-éthoxycarbonyl-4,5,6,7-tétrahydroisindole (**1**)

Après 4 heures de réaction à température ambiante sous atmosphère l'ester **1** est obtenu avec un rendement de 38 % en produit pur. Ce rendement modeste est probablement dû aux deux recristallisations qui se sont avérées nécessaire lors de la purification. Les études spectroscopiques (IR, masse, RMN du proton et du carbone 13), nous ont permis de confirmer la structure.

Le mécanisme réactionnel de cette étape est indiqué sur la figure II-5. Dans un premier temps, la base déprotone en α du carbonyle ce qui permet de créer la première liaison C-C. Le produit (**c**) qui en résulte peut alors se cycliser par une attaque intramoléculaire du nitronate sur l'isonitrile. L'intermédiaire cyclique (**e**), résultat d'un échange de proton, subit ensuite une élimination du groupe nitro, qui après aromatisation par migration sigmatropique [1,5] d'hydrogène donne le pyrrole attendu (**f**).

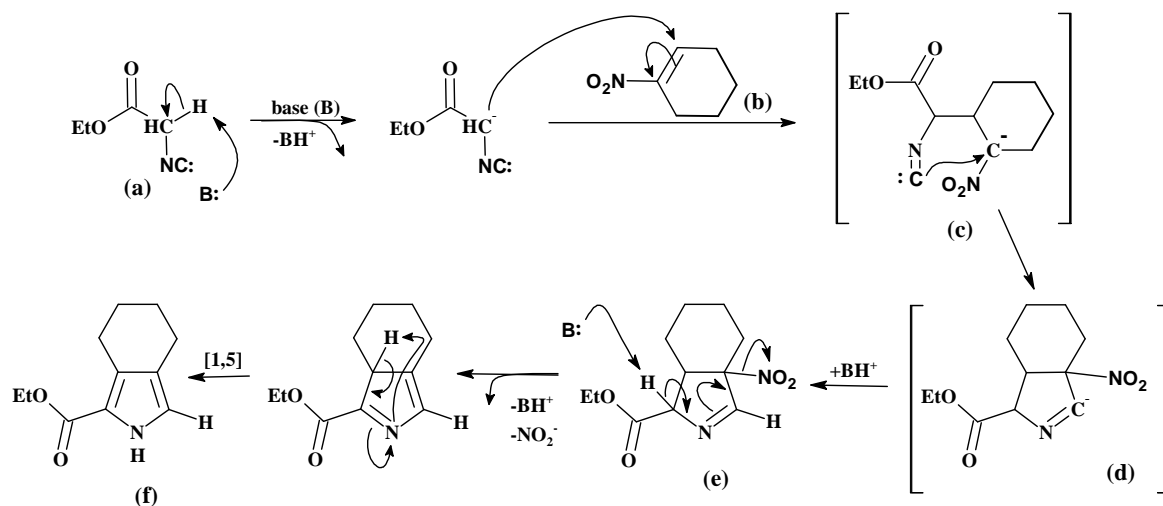


Figure II-5 : Synthèse de pyrroles à partir de nitrooléfines selon Barton et Zard³⁵

Cette méthode est très utilisée pour obtenir des pyrroles trisubstitués en positions 2, 3 et 4.

3-3 Synthèse de la tétracarboxyméthylphényltétracyclohexènoporphyrine (**3**)

Le tétrahydroisoindole **2** est obtenu, par saponification puis décarboxylation, à partir de l'ester tétrahydroisoindole **1** par reflux de ce dernier en présence d'un excès d'hydroxyde de potassium dans l'éthylène glycol. L'isoindole **2** résultant, instable, est directement condensé avec le 4-carboxyméthylbenzaldehyde (Figure II-6), selon la méthode de Lindsey (Chapitre I-3), dans le dichlorométhane à température ambiante et sous atmosphère inerte, en présence d'un acide de Lewis ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$).¹⁶

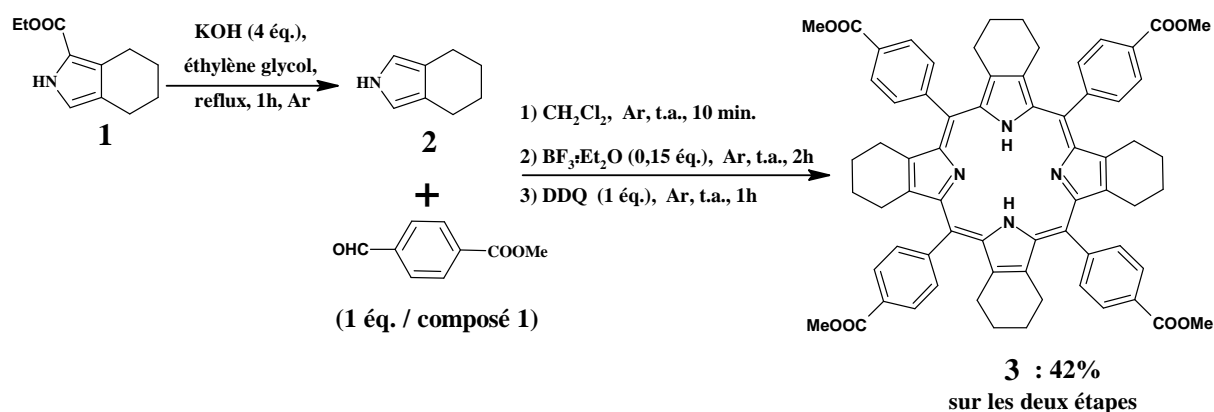


Figure II-6 : Formation du macrocycle porphyrinique

Après oxydation du porphyrinogène préalablement formé par une quinone (DDQ), puis purification, la tétracarboxyméthylphényltétracyclohexènoporphyrine **3** est obtenu avec 42% de rendement global pour ces deux étapes. Ces rendements sont proches de ceux obtenus généralement par la méthode de Lindsey. La structure du composé **3** a été confirmée par spectroscopie UV, RMN du proton et spectrométrie de masse MALDI.

3-4 Formation de la tétracarboxyméthylphényltétrabenzoporphyrine (**6**)

L'oxydation d'une cyclohexènoporphyrine en benzoporphyrine nécessite au préalable sa conversion en sa forme "métallée".³⁴ En effet, le métal augmente la durée de vie du cation radicalaire π correspondant à l'état de transition nécessaire à l'aromatisation.¹²⁵ Il empêche également la protonation des azotes internes du macrocycle favorisant ainsi l'oxydation.¹²⁶

Le choix du métal (Cu, Ni, Pd, Zn, ...), utilisé pour ces réactions, varie selon la stabilité de nos composés en milieu acide. En effet, la démétallation s'effectue à des pH plus ou moins important en fonction du métal employé. La démétallation du composé chélaté par le cuivre (chélatant fort) demande un traitement en milieu acide sulfurique, à l'inverse des métaux comme le zinc (chélatant faible) qui peuvent se dissocier dans des conditions plus douces (HCl, 10M). Par ailleurs, notons que plus le complexe benzoporphyrine-métal est stable plus les rendements lors de l'étape d'oxydation sont élevées. Ainsi l'oxydation par le cuivre apporte de meilleurs résultats qu'avec le zinc.

Dans notre cas, le composé **3** (Figure II-7) étant stable en condition acide, la métallation s'effectue en présence d'acétate de cuivre, en solution dans un mélange de solvants (CHCl₃/MeOH : 9/1). Après neutralisation et purification, la porphyrine métallée **4**, obtenue avec un rendement de 85%, est ensuite oxydé en présence de DDQ durant une heure à reflux dans le THF. Le rendement de cette étape est de 43% et fournit la benzoporphyrine métallée **5** qui est ensuite démétallée en milieu acide sulfurique concentré. On obtient ainsi la benzoporphyrine **6** attendu avec un rendement de 75%.

¹²⁵ a) J. H. P. Utley, G. G. Rozenberg; *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5251-5265. b) C. Inisan, J. Y. Sailard, R. Guillard, A. Tabard, Y. Le Mest; *New J. Chem.*, **1998**, 22, 823-830.

¹²⁶ a) C. J. Medforth, M. D. Berber, K. M. Smith, J. A. Shelnut; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 3719-3722. b) C. J. Medforth, K. M. Smith; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 5583-5586. c) K. M. Barkigia, M. D. Berber, J. Fajer, C. J. Medforth, M. W. Renner, K. M. Smith; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 8851-8857. d) J. Takeda, T. Ohya, M. Sato; *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 2877-2880.

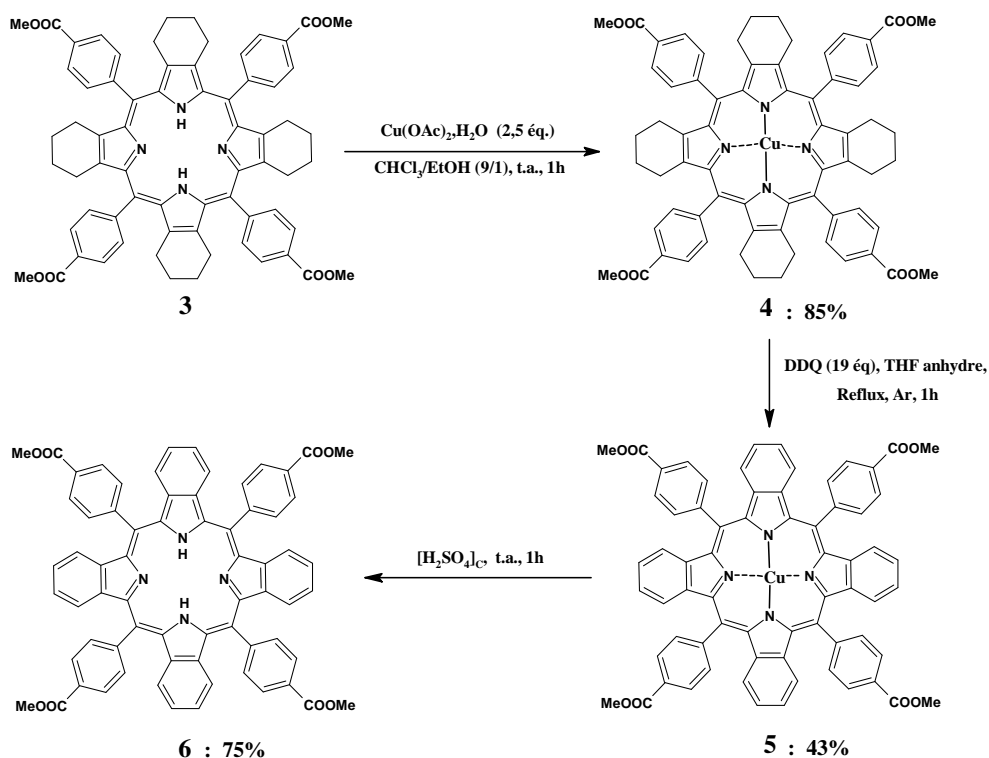


Figure II-7 : Oxydation de la cyclohexénoporphyrine en benzoporphyrine

Le rendement global sur les trois étapes conduisant à l'aromatisation est de l'ordre de 27%. Il est comparable à ceux rencontrés pour des méthodes utilisant le cuivre comme chélate et est supérieur à ceux obtenus avec des métaux moins stables tels que le nickel, le palladium ou le zinc.⁴²

3-5 Saponification des fonctions esters (7)

Les fonctions acides sont libérées par simple saponification dans le diméthylformamide en présence d'une solution éthanolique de potasse (Figure II-8).

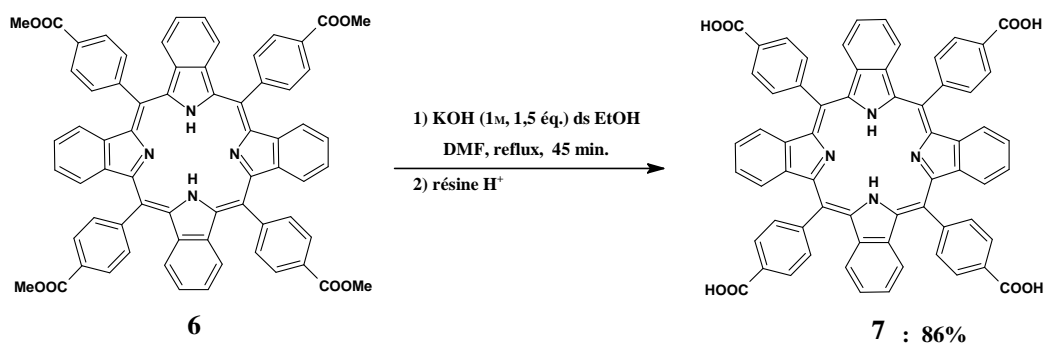


Figure II-8 : Saponification des fonctions esters

Après neutralisation par une résine acide, la benzoporphyrine **7** précipite et des cristaux verts sont isolés avec un rendement de 86%. L'analyse spectroscopique UV, RMN du proton, ainsi que la spectrométrie de masse MALDI a permis de confirmer la structure des produits formés.

4. Synthèses des précurseurs polyaminés (12 et 13)

4-1 Quelques éléments sur la chimie des polyamines

Notre finalité étant de fixer des polyamines sur des tétrabenzoporphyrines, nous proposons de faire un état des lieux des polyamines tant sur le plan chimique que sur le plan biologique.

Les polyamines linéaires, telles que la putrescine, la spermidine et la spermine (Figure I-63) sont des molécules présentes dans toutes les cellules vivantes, qu'elles soient procaryotes comme les bactéries ou eucaryotes comme les champignons, les cellules végétales et animales. Elles possèdent une chaîne carbonée aliphatique comportant au moins deux fonctions amines et sont essentielles pour la croissance et le fonctionnement des cellules vivantes.¹²⁷

La spermidine et la spermine ont été découvertes, en 1678, par van Leeuwenhoek qui les a extraites du liquide séminal humain. Il fallut cependant attendre 1924 pour que leurs structures chimiques soient clairement établies.¹²⁸ Longtemps considéré comme des composés terminaux de la dégradation tissulaire, d'où certains noms peu engageants tels que la cadavérine ou putrescine, les polyamines interviennent surtout au cours des étapes de prolifération et de différenciation cellulaires.¹²⁹ Dans l'organisme, à pH physiologique, les polyamines se protonnent et possèdent ainsi des caractéristiques semblables aux cations inorganiques tels que Ca^{2+} et Mg^{2+} . Cependant, contrairement à ces ions, les charges positives sont distribuées le long de la chaîne aliphatique leur permettant d'interagir spécifiquement avec les composés biologiques chargés négativement. Ainsi les polyamines sont susceptibles de condenser l'ADN. En effet l'agrégation ou la condensation du matériel génétique est important dans la transmission et la protection de l'information génétique.¹³⁰ L'ARN est

¹²⁷ A. E. Pegg; *Cancer Res.*, **1988**, 48, 759-774.

¹²⁸ H. M. Wallace, A. V. Fraser, A. Hughes; *Biochem. J.*, **2003**, 376, 1-14.

¹²⁹ U. Bachrach; *Amino Acids*, **2004**, 26, 307-309.

¹³⁰ H. Deng, V. A. Bloomfield; *Biophys. J.*, **1999**, 77, 1556-1561.

également un site de fixation des polyamines. Celles-ci stabilisent, par exemple, les acides ribonucléiques de transfert (ARNt), qui interviennent lors de la traduction du génome.¹³¹

D'autres macromolécules comme les protéines sont aussi la cible d'interaction avec les polyamines. L'albumine du sérum voit sa conformation altérée¹³² tandis que l'activité de certaines kinases est modifiée.¹³³ Elles ont aussi de multiples effets sur les récepteurs membranaires tels que les récepteurs au *N*-méthyl-D-aspartate.¹³⁴ Les polyamines créent également des interactions électrostatiques avec les composés anioniques et les phospholipides chargés négativement des membranes.¹³⁵

Devant l'intérêt que suscitent les polyamines, de nombreuses études se sont orientées vers la synthèse de ces molécules et de leurs dérivés afin d'étudier leurs activités biologiques. Ainsi la synthèse de la spermidine (Figure II-9) et de ses analogues a été réalisée par Bergeron et coll.¹³⁶ à partir de la benzylamine.

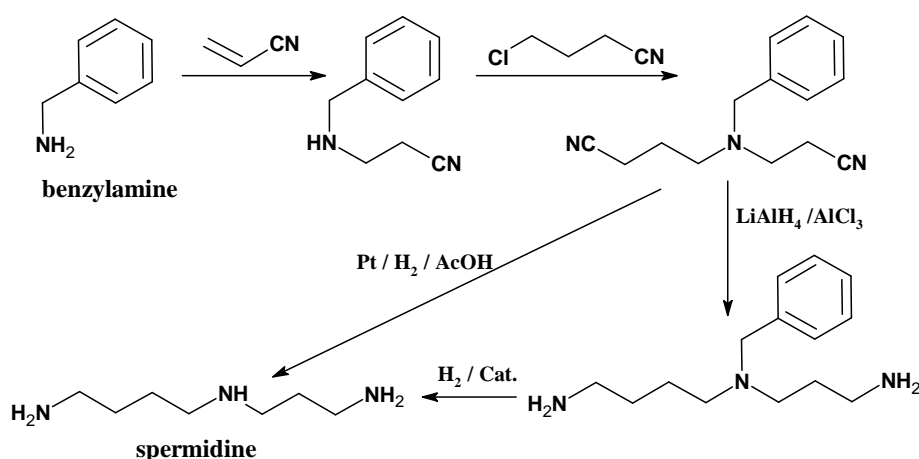


Figure II-9 : Synthèse de la spermidine par Bergeron et coll.¹³⁶

La synthèse des dérivés polyaminés (Figure II-10) requiert une attention particulière en ce qui concerne la réactivité des différents azotes. Dans le cas de la spermidine, les deux atomes d'azotes primaires ne sont théoriquement pas identiques et sont, bien sûr, différents de l'azote

¹³¹ C. O. Fernandez, G. Buldain, K. Samejima; *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1476, 324-330.

¹³² A. Ahmed Ouameur, E. Mangier, S. Diamantoglou, R. Rouillon, R. Carpentier, H. A. Tajmir-Riahi; *Biopolymers*, **2004**, 73, 503-509.

¹³³ H. M. Zhang, J. N. Rao, X. Guo, L. Liu, T. Zou, D. J. Turner, J. Y. Wang; *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 2539-2547.

¹³⁴ T. A. Sharma, I. J. Reynolds; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, 289, 1041-1047.

¹³⁵ F. Schuber; *Biochem. J.*, **1989**, 260, 1-10.

¹³⁶ R. J. Bergeron, P. S. Burton, K. A. McGovern, S. J. Kline; *Synthesis*, **1981**, 732-733.

secondaire. De nombreux travaux ont ainsi été menés pour modifier et protéger les fonctions amines présentes sur les polyamines.¹³⁷

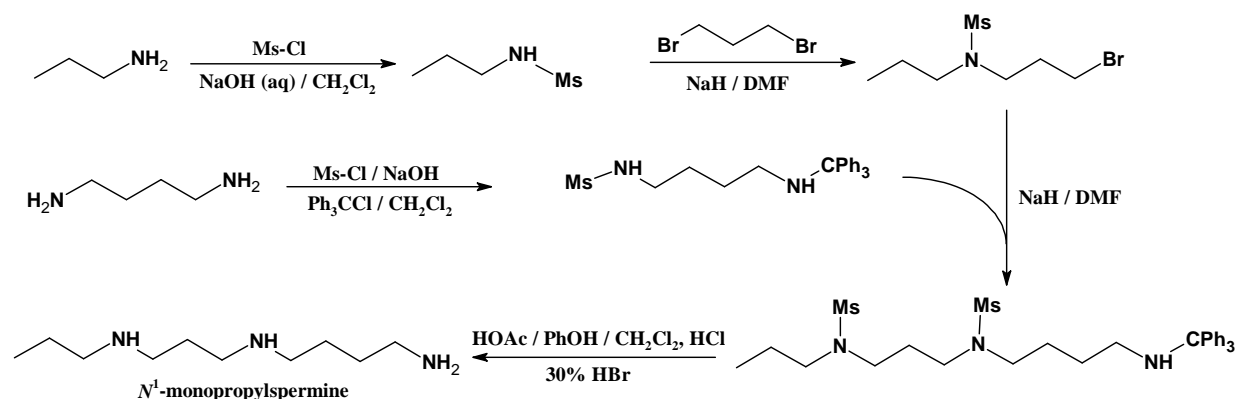


Figure II-10 : Synthèse de polyamine *N*-alkylée¹³⁷

Les groupements protecteurs couramment utilisés sont le *tert*-butyloxycarbonyl (Boc) (sous forme de 2-(*tert*-butyloxycarbonyloxyimine)-2-phénylacétonitrile (Boc-ON, Boc₂O ou BocN₃)¹³⁸ ainsi que le trifluoroacétate.¹³⁹ Les fonctions amides formées peuvent être, par la suite, clivées par traitement acide (Boc) ou basique (trifluoroacétate). Par contre, certains groupements sont utilisés pour leur stabilité dans ces conditions acides ou basiques. Le *N*-1-(4,4-diméthyl-2,6-dioxocyclohexylidène)-éthyl (Dde) est généralement employé en synthèse sur phase solide. Il se fixe sélectivement sur les fonctions amine primaire et peut-être déprotégé dans des conditions douces avec des bases telles que l'hydrazine dans le diméthylformamide.¹⁴⁰

Une réaction intéressante d'alkylation des amines primaires terminales (Figure II-11) a été décrite par van Arman.¹⁴¹ Cette réaction de bis-benzylation ne nécessite pas de protection préalable et ne génère pas de produits secondaires.

¹³⁷ R. J. Bergeron, Y. Feng, W. R. Weimar, J. S. McManis, H. Dimova, C. Porter, B. Raisler, O. Phanstiel; *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 1475-1494.

¹³⁸ J. B. Hansen, M. C. Nielsen, U. Ehrbar, O. Buchardt; *Synthesis*, **1982**, 404-405.

¹³⁹ M. C. O'Sullivan, D. M. Dalrymple; *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 3451-3452.

¹⁴⁰ B. Kellam, B. W. Bycroft, S. R. Chhabra; *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 4849-4852.

¹⁴¹ J. A. Scalfani, M. T. Maranto, T. M. Sisk, S. A. Van Arman; *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3221-3222.

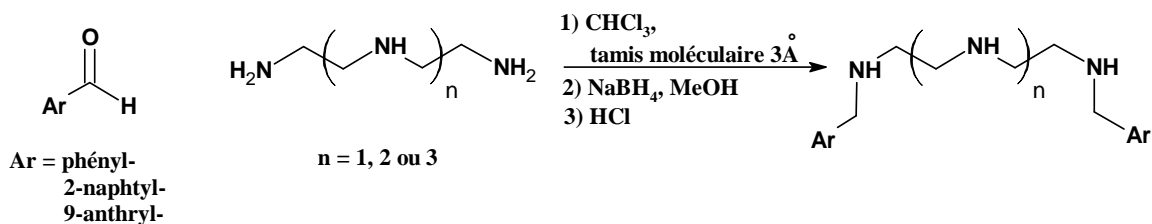


Figure II-11 : Alkylation des amines primaires par la méthode de van Arman¹⁴¹

Généralement la fonctionnalisation de l'azote secondaire est obtenue par une protection/déprotection des amines primaires. Ainsi l'addition de type Michaël des polyamines sur l'acrylonitrile, suivie généralement d'une hydrogénation catalytique du groupement nitrile en présence de Ni, PtO_2 ou LiAlH_4 a été utilisée par Cullis et *coll.*⁹¹ afin d'obtenir un dérivé de la spermidine comme intermédiaire clé dans la synthèse d'analogue du chlorambucil (Figure II-12).

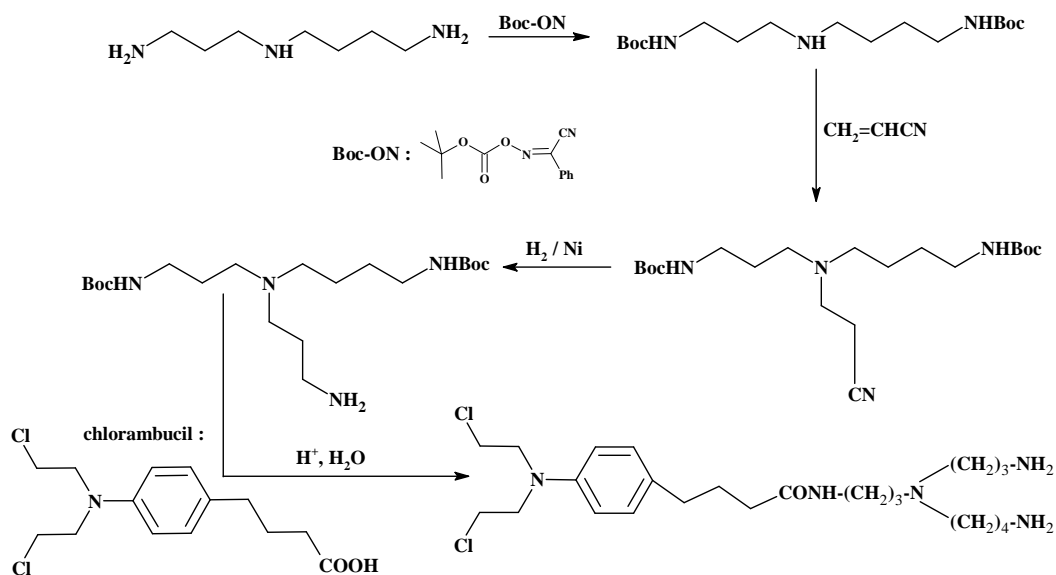


Figure II-12 : Synthèse d'analogue du chlorambucil par addition de type Michaël⁹¹

Par ailleurs Edward et *coll.*¹⁴² ont mis en évidence l'importance de centres chiraux potentiels présents sur les polyamines. Pour cela ils ont synthétisé, par la réaction de Mitsunobu, une tétraamine optiquement active (Figure II-13). Cette tétraamine s'est révélée particulièrement intéressante pour son potentiel antitumoral.

¹⁴² M. L. Edwards, D. M. Stermerick, J. R. McCarthy; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 3417-3420.

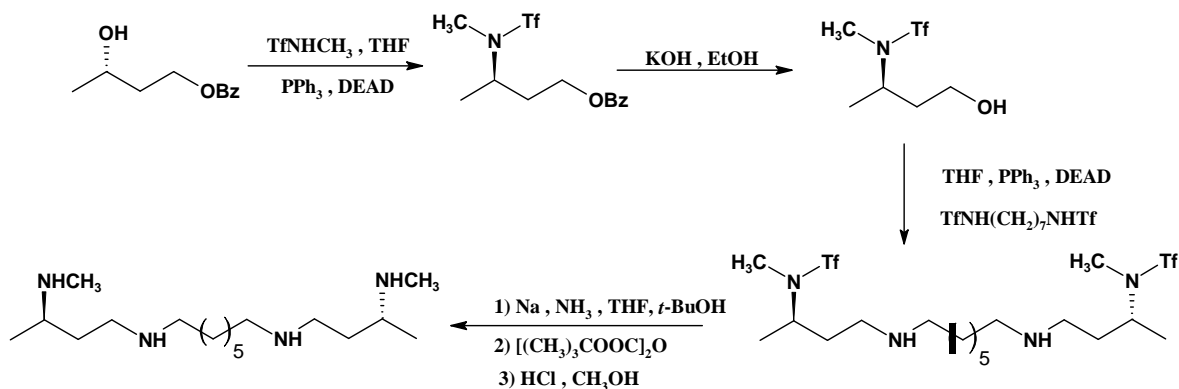


Figure II-13 : Synthèse d'une tétraamine optiquement active par la réaction de Mitsunobu¹⁴²

Au cours de ces travaux et en tenant compte des résultats de la littérature, nous nous sommes attachés à synthétiser des précurseurs polyaminés constitués de spermidine et de spermine alkylé par un bras espaceur sur le ou l'un de leur azotes secondaires. Ceci afin d'accroître la flexibilité des polyamines pour une meilleure incorporation dans les organites cellulaires.

4-2 Schéma général

La synthèse des précurseurs polyaminés **12** et **13** (Figure II-14) se déroule en trois étapes à partir de la spermidine et de la spermine.⁹²

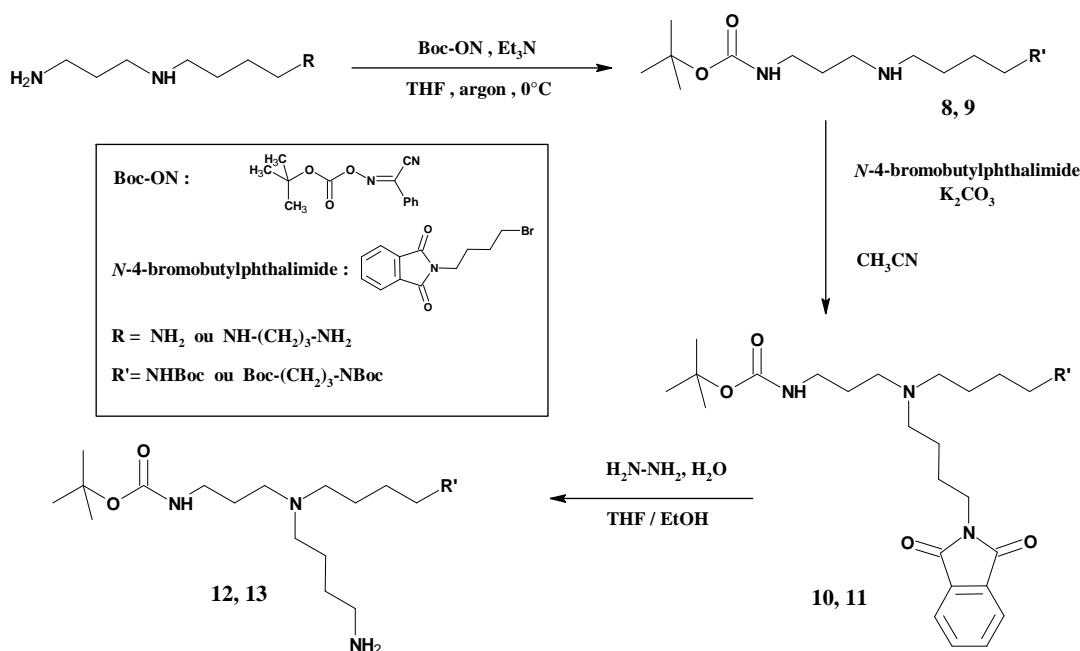


Figure II-14 : Schéma général de la synthèse des précurseurs polyaminés⁹²

Cette stratégie consiste tout d'abord à protéger sélectivement les deux fonctions amines primaires de la spermidine et de la spermine, ainsi qu'une des deux fonctions secondaires dans le cas de la spermine. Ainsi, nous avons opté pour l'utilisation du groupement protecteur *tert*-butylcarbonyle (Boc)⁸² qui présente l'avantage d'être facilement éliminé en milieu acide.¹⁴³ La suite des synthèses se déroulant en milieu basique ou neutre, ce groupement restera présent jusqu'à la dernière étape. Dans une seconde phase, nous avons introduit un bras espaceur aminé à quatre atomes de carbone sur la fonction amine secondaire libre des polyamines.

4-3 Synthèse de la spermidineBoc₂ (**8**) et de la spermineBoc₃ (**9**)

Pour réaliser la protection des polyamines par le groupement Boc, nous avons utilisé le 2-(*tert*-butyloxycarbonyloxyimine)-2-phénylacétonitrile (Boc-ON). Rappelons que les fonctions amines, par le doublet non liant de l'azote, sont de bons nucléophiles. D'après les valeurs des pK_a de nos polyamines (Figure II-15), l'amination de la spermidine et de la spermine sur le Boc-ON conduit prioritairement à la protection des amines primaires.¹⁴⁴ De plus cette sélectivité est contrôlée d'une part par les quantités stœchiométriques de Boc-ON introduite et d'autre part cinétiquement par les conditions opératoires (0°C). Dans le cas de la spermine l'excès de Boc-ON réagit ensuite sur l'une des fonctions amines dialkylées plus basiques que les fonctions amides nouvellement formées.

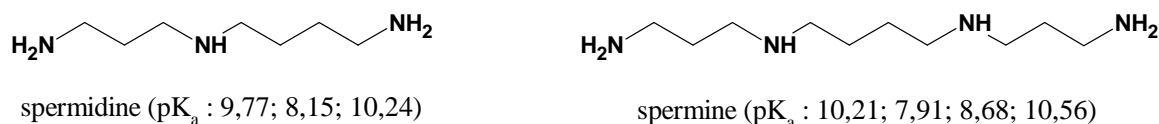


Figure II-15: pK_a de quelques polyamines usuelles¹⁴⁴

Les réactions se déroulent dans le THF anhydre à 0°C pendant 18 heures (Figure II-16). La spermidineBoc₂ **8** et la spermineBoc₃ **9** sont obtenues, après purification, avec des rendements respectifs de 67% et 62%. Les données physiques de ces produits sont conformes à celles de la littérature.⁹²

¹⁴³ I. Levchine, P. Kajan, M. Borloo, W. Bollaert, A. Haemers; *Synthesis*, **1994**, 1, 37-39.

¹⁴⁴ O. Rosenheim, *Biochem. J.*, **1924**, 18, 1265-1272.

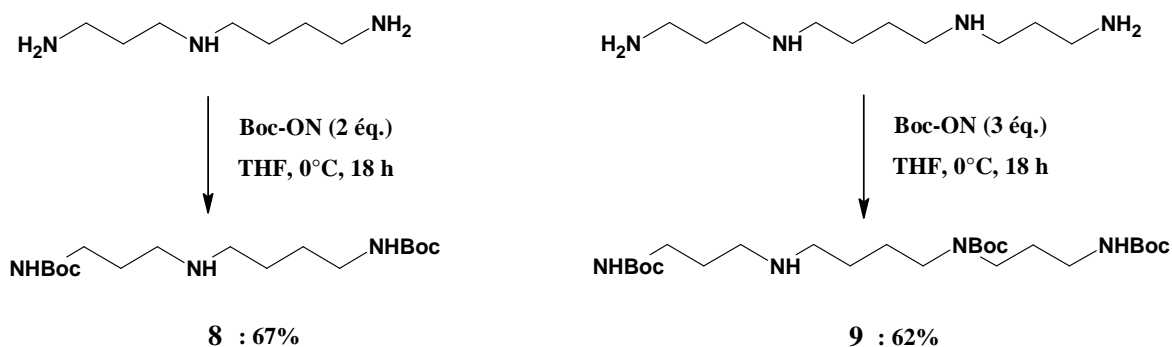


Figure II-16: Protection des polyamines par le Boc-ON

Avec la spermine, en pr\u00e9sence de trois \u00e9quivalents de Boc-ON, le compos\u00e9 t\u00e9tra-substitu\u00e9 n'est observ\u00e9 qu' \u00e0 l' \u00e9tat de traces.

4-4 Fixation du *N*-(4-bromobutyl)phtalimide (**10** et **11**)

L' alkylation de la spermidineBoc₂ et de la spermineBoc₃ est r\u00e9alis\u00e9e par le *N*-(4-bromobutyl)phtalimide par une substitution nucl\u00e9ophile (Figure II-17). Cette r\u00e9action s' effectue dans l' ac\u00e9tonitrile anhydre en pr\u00e9sence de K₂CO₃.¹⁴⁵ Cette base faible permet de neutraliser l' acide bromhydrique form\u00e9 en fin de r\u00e9action.

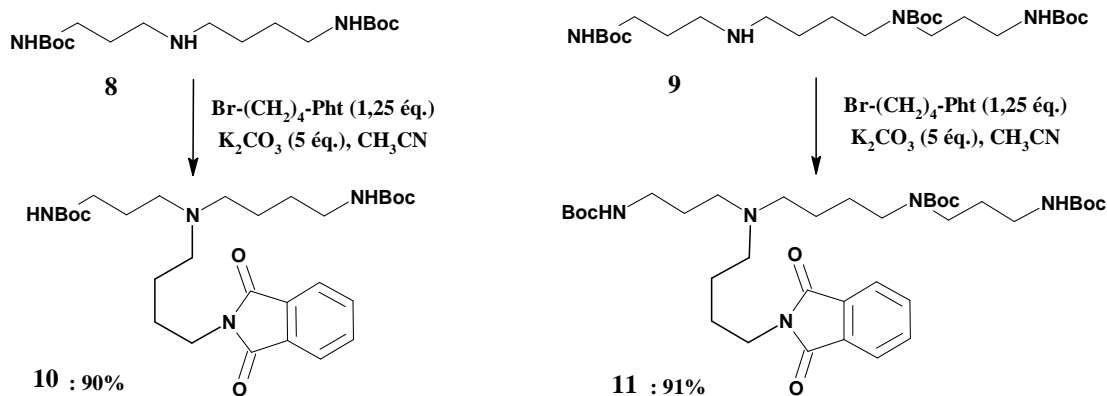


Figure II-17 : Fixation d' un bras \u00e0 quatre carbones sur les polyamines

Apr\u00e8s purification, les compos\u00e9s **10** et **11** sont obtenus avec des rendements quantitatifs.

¹⁴⁵ P. P. Kung, R. Bharadwaj, A. S. Fraser, D. R. Cook, A. M. Kawasaki, P. D. Cook; *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 1846-1852.

4-5 Déprotection du groupement phtalimide (12 et 13)

La réaction d'hydrazinolyse est réalisée en additionnant un large excès d'hydrazine monohydrate (Figure II-18). Après purification, les composés attendus sont isolés avec des rendements respectifs de 83% et 82%.

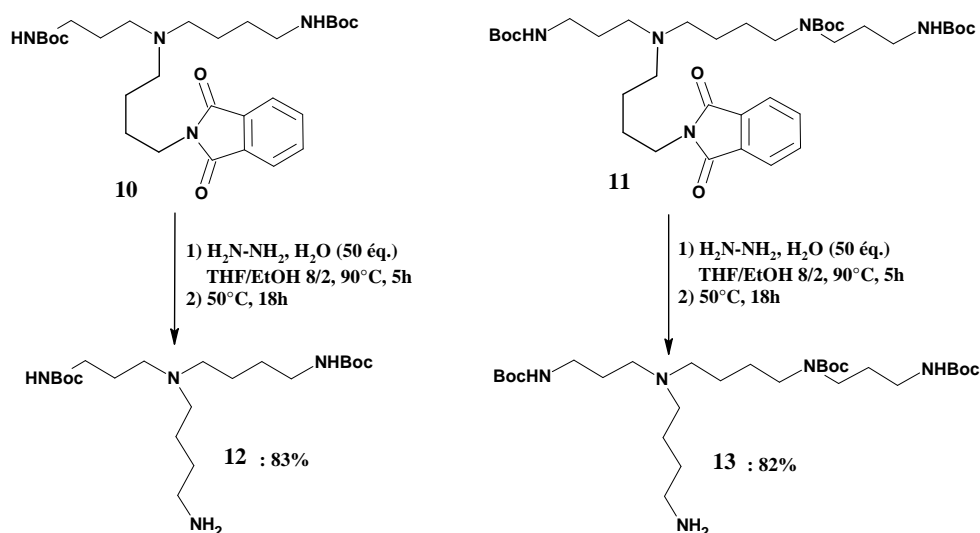


Figure II-18 : Synthèse des précurseurs polyaminés terminaux

La structure des produits a été confirmée par spectroscopie IR, RMN du proton, RMN du carbone 13 et spectrométrie de masse haute résolution. La figure II-19 indique le mécanisme de déprotection du groupement phtalimide par l'hydrazine monohydrate.¹⁴⁶

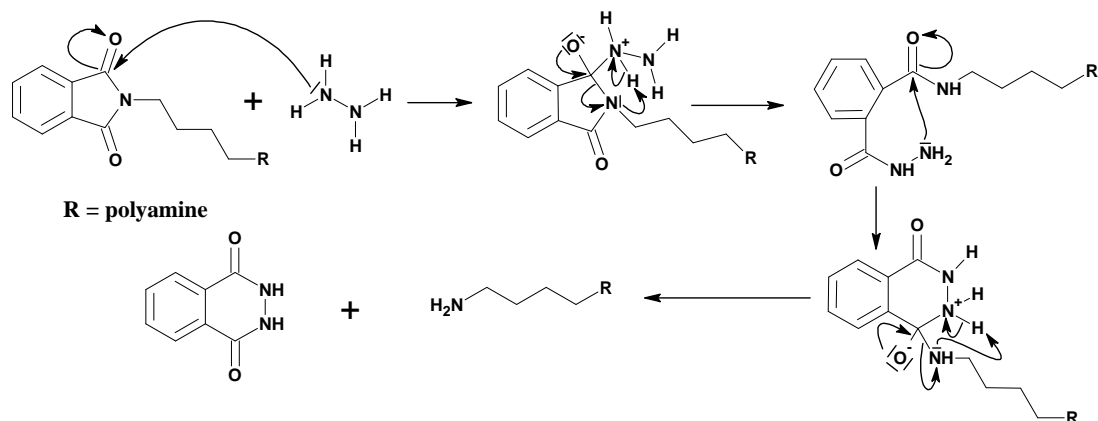


Figure II-19 : Mécanisme de déprotection du groupement phtalimide

¹⁴⁶ R. Sundaramoorthi, C. Marazano, J. L. Fourrey, B. C. Das; *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3191-3194.

Cette déprotection s'effectue en deux étapes. Une molécule d'hydrazine réagit, tout d'abord, sur un des carbonyles du phthalimide puis il se produit une élimination intramoléculaire. Les produits résultant de cette réaction sont le phthalhydrazide et l'amine primaire alkylée.

5. Synthèses des benzoporphyrines tétrapolyaminées (16 et 17)

5-1 Fixation des précurseurs polyaminés sur la benzoporphyrine (14 et 15)

La fixation de quatre unités polyaminées (spermidine ou spermine) à été réalisée sur le précurseur **7** en s'appuyant sur des stratégies utilisées en synthèse peptidique. Ainsi, la benzoporphyrine **7** est mise à réagir, dans le DMF et à température ambiante, avec de 4,4 équivalents de DCC et 4,4 équivalents de HOBt. Ensuite sont rajoutés 4,4 équivalents de précurseurs polyaminés **12** et **13** (Figure II-20).

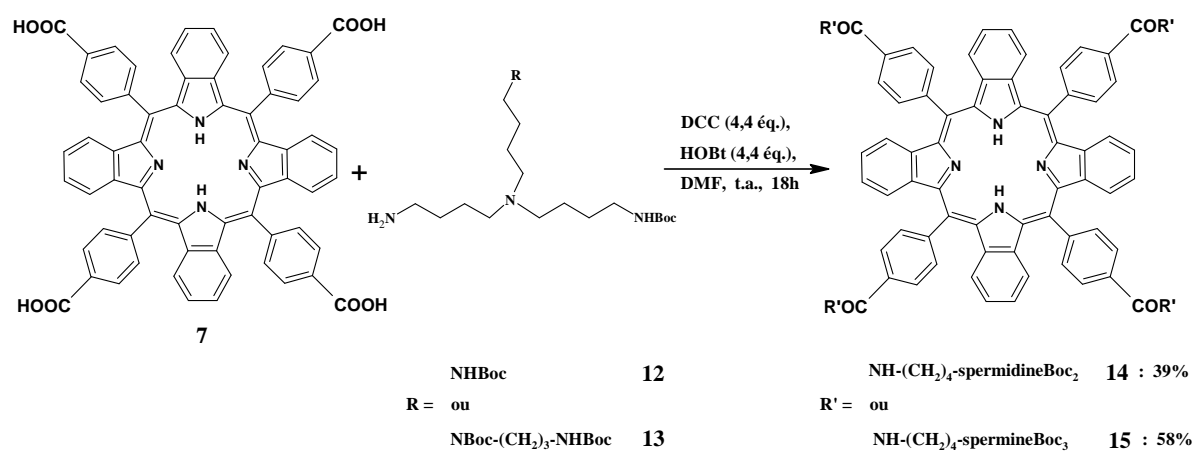


Figure II-20 : Fixation des précurseurs polyaminés sur la benzoporphyrine

Après 18 heures de réaction, filtration du dérivé de l'urée formé à partir du DCC et purification, les tétrabenzoporphyrines tétrakistriaminées protégées **14** et tétrakistétraaminées protégées **15**, sont obtenues avec des rendements respectifs de 39% et 58%. Ils sont comparables aux rendements obtenus lors de la fixation de ces vecteurs sur des structures porphyriniques, telles que la porphyrine tétraspermidine protégée (42%) ou pour la porphyrine tétraspermine protégée (51%) synthétisées dans notre laboratoire.⁹³

Ce mécanisme réactionnel repose sur l'activation des fonctions acides carboxyliques de la porphyrine réalisée en présence du dicyclohexylcarbodiimide (DCC). Le composé activé, mis en solution avec du 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), permet de substituer l'anhydride formé par un excellent groupe partant. La figure II-21 présente le mécanisme classique de l'activation par le système DCC/HOBt. L'addition de l'acide carboxylique sur la double liaison C=N du DCC conduit à la formation d'une *O*-acylisourée α . Cette dernière réagit ensuite rapidement avec le HOBt (très bon nucléophile) afin de former un ester très réactif β qui sera capable de réagir avec la fonction amine primaire du précurseur polyaminé.

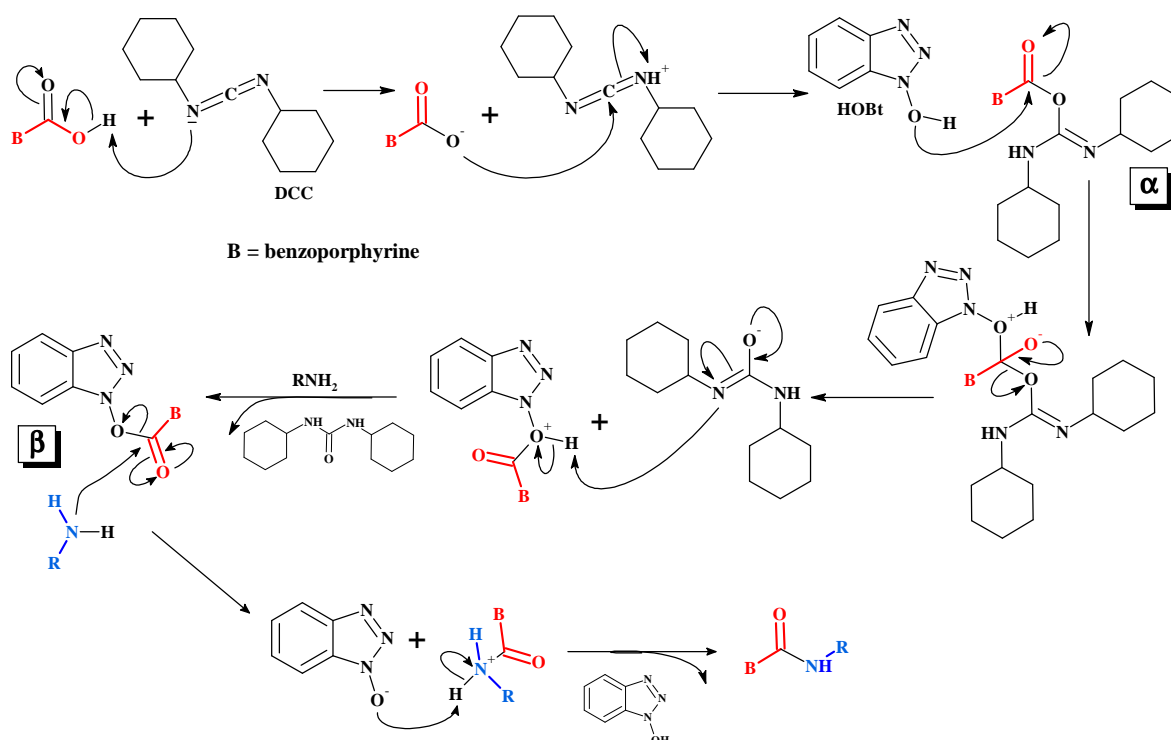


Figure II-21 : Mécanisme d'activation par le système DCC/HOBt

Dans la littérature, ce même ester peut être également obtenu par l'action de l'hexafluorophosphate de benzotriazoloyloxy-tri-(diméthylamino)phosphonium, BOP ou bien encore par le PyBOP[®] (l'hexafluorophosphate de benzotriazoloyloxy-tri(pyrrolidino)phosphonium) avec des rendements similaires.¹⁴⁷

¹⁴⁷ a) B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve; *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 14, 1219-1222. b) J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 205-208.

5-2 Déprotection des benzoporphyrines tétrapolyaminées (**16** et **17**)

La dernière étape consiste à éliminer le groupement protecteur Boc afin de libérer les fonctions amines primaires. La liaison amide présente entre l'azote de la polyamine et la fonction carbonyle du Boc est très sensible à l'hydrolyse acide par l'acide trifluoroacétique. Les produits protégés sont placés, à température ambiante, dans un mélange de solvant : CH₂Cl₂/TFA 8/2 (Figure II-22). Quel que soit le macrocycle et la polyamine fixée, une hydrolyse acide de 2 heures est suffisante pour assurer une déprotection complète du groupement Boc.

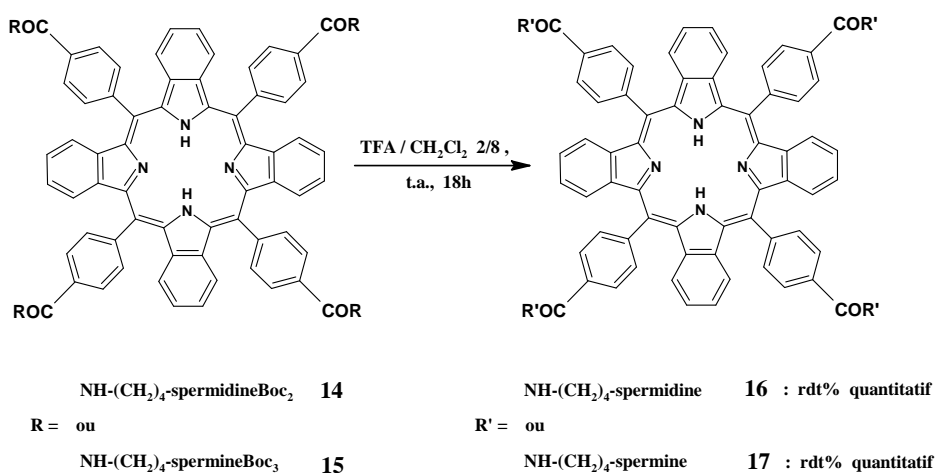


Figure II-22 : Déprotection des fonctions amines

Après évaporation du TFA et neutralisation par résine basique, les composés déprotégés sont obtenus avec des rendements quantitatifs. Ces composés sont solubles dans les solvants protiques tels que le mélange méthanol/eau, cependant leur solubilité reste partielle en milieu purement aqueux.

6. Caractérisations spectroscopiques

L'ensemble des porphyrines et benzoporphyrines synthétisées a été caractérisé par spectroscopie UV-visible, spectrométrie de masse et par spectroscopie RMN du proton.

6-1 Spectroscopie UV-visible

Les spectres de nos composés tétrapolyaminés protégés sont réalisés dans le chloroforme et ceux des produits déprotégés dans le méthanol et le diméthylformamide (composé **7**). Comme attendu, les spectres des benzoporphyrines présentent une forte bande de Soret vers 465 nm, et trois bandes Q de plus faibles intensités vers 600, 645 et 700 nm, notées respectivement QIII, QII et QI (Figure I-37).

Une étude comparative de ces spectres avec ceux obtenus pour différents macrocycles tétrapyrroliques (substitués en position *meso* par des groupements identiques tels que la porphyrine **A** et la tétracyclohexènoporphyrine **3**), montre que la présence de cycles en position β -pyrrolique modifie l'allure du spectre caractéristique des *meso*-arylporphyrines. En effet, on observe un déplacement global du spectre vers le rouge, une modification du nombre de bandes Q ainsi qu'une amplification des coefficients d'extinction molaire (Figure II-24). L'ensemble de ces modifications traduit une augmentation de la densité électronique du macrocycle. Celle-ci est due à la présence de substituants donneurs (cycloalanes ou cyclo-diènes) sur les positions β -pyrroliques. De plus, dans le cas des benzoporphyrines l'augmentation de la conjugaison ($22 \text{ } \epsilon \pi$) accroît ces modifications.

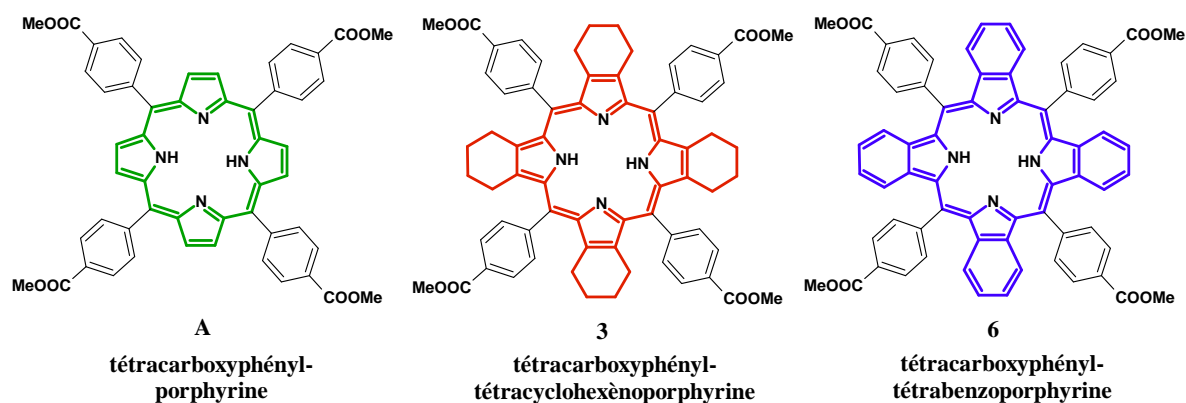


Figure II-23 : tétracarboxyphényl porphyrine **A**, tétracyclohexènoporphyrine **3** et tétrabenzoporphyrine **6**

Tableau II-1 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visible des macrocycles tétrapyrroliques dans le CHCl_3 : (λ_{max} (nm) [coefficient d'extinction molaire ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)], à 20°C)

Composés "tétracarboxyphényl"	Bande de Soret	Q IV	Q III	Q II	Q I
porphyrine A	419 (138,8)	514 (7,0)	549 (3,5)	589 (2,3)	647 (1,7)
tétracyclohexènoporphyrine 3	473 (257,7)			617 (21,4)	674 (33,6)
tétrabenzoporphyrine 6	468 (484,4)		598 (42,1)	646 (74,8)	701 (37,6)

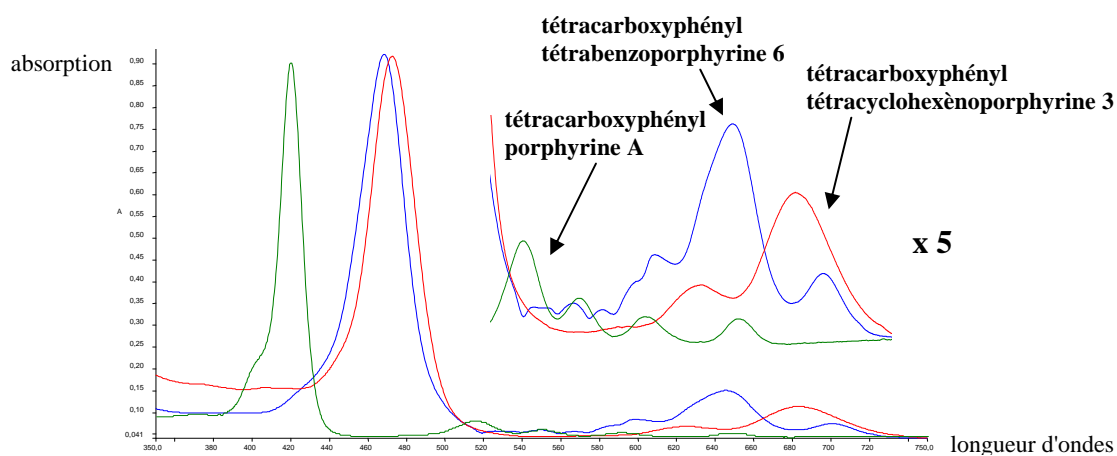


Figure II-24 : Bandes caractéristiques des spectres UV -visible des composé **3** et **6** et de l'analogue porphyrinique **A**

Les spectres obtenus pour les produits finaux protégés et déprotégés sont comparables aux spectres attendus pour de telles structures et leurs valeurs sont illustrées dans le tableau ci-dessous (Tableau II-2).

Tableau II-2 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visible des composés **7**, **14**, **15**, **16** et **17** (λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)], à 20°C)

Composés	Bande de Soret	Q III	Q II	Q I
7^a	468 (303,7)	592 (22,9)	642 (40,4)	698 (15,2)
14^b	467 (126,9)	603 (12,1)	648 (19,1)	699 (8,8)
15^b	469 (173,8)	605 (10,8)	655 (21,6)	710 (9,2)
16^c	462 (73,0)	594 (4,6)	639 (9,1)	696 (2,8)
17^c	462 (55,5)	592 (5,7)	639 (8,1)	697 (4,5)

Solvants : ^a DMF; ^b CHCl₃; ^c MeOH

Une deuxième étude comparative de spectres de différents macrocycles tétrasperminées (porphyrine **C**, chlorine **B** et benzoporphyrine **17**), confirme que les benzoporphyrines et les chlorines fonctionnalisées possèdent une bande d'absorption QI ou QII vers les 645 nm plus intense que celle de leur analogue porphyrinique (Tableau II-3 et figure II-26). Celle-ci leur permet d'absorber dans le domaine du visible, et plus précisément dans le rouge (Figure II-25).

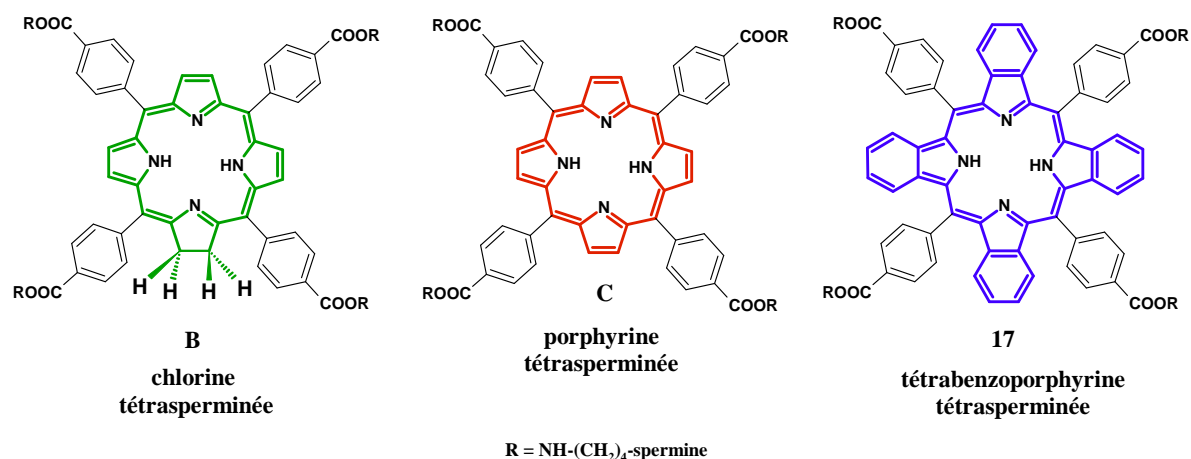


Figure II-25 : macrocycles tétrasperminés: chlorine **B**, porphyrine **C** et tétrabenzoporphyrine **17**

Tableau II-3 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visible des macrocycles tétrasperminés porphyrine **C**, chlorine **B**, benzoporphyrine **17**
λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption (ε x 10⁻³ mol⁻¹.L.cm⁻¹)], à 20°C

Composés tétrasperminés	Bande de Soret	Q IV	Q III	Q II	Q I
Porphyrine C ^b	415 (204,7)	513 (8,6)	547 (4,7)	588 (2,7)	645 (1,5)
Chlorine B ^b	418 (121,0)	518 (10,2)	544 (7,4)	598 (4,1)	652 (21,7)
Tétrabenzoporphyrine 17 ^a	467 (126,9)		603 (12,1)	648 (19,1)	699 (8,8)

Solvant : ^a CHCl₃; ^b MeOH

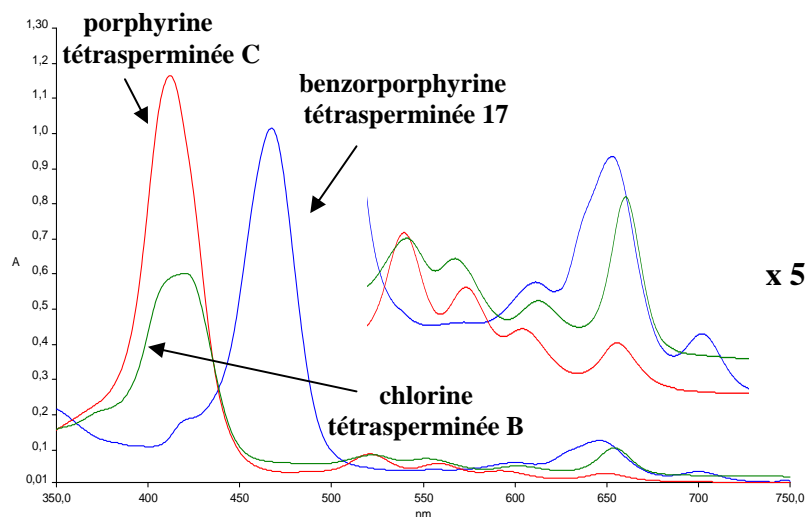


Figure II-26 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visible des différents macrocycles tétrasperminés chlorine **B**, porphyrine **C**, benzoporphyrine **14**

Ces bandes intenses QI ou QII leur confèrent ainsi des caractéristiques intéressantes pour une utilisation en PDT.

6-2 Spectrométrie de masse MALDI

L'analyse structurale des benzoporphyrines a été poursuivie par l'étude de leur spectre de masse. Comme mentionné au chapitre I, ces composés, non volatils, ne se prêtent pas aux techniques classiques d'ionisation chimique. Pour cette raison, nous nous sommes tournés vers une technique de désorption-ionisation laser assistée par une matrice (méthode MALDI). Cette méthode permet l'observation de l'ion quasi-moléculaire généralement avec peu de fragmentations. Les résultats obtenus pour les macrocycles **3**, **6**, **7**, **14**, **15**, **16** et **17** sont présentés dans le tableau II-4.

Tableau II-4 : Spectrométrie de masse MALDI des macrocycles **3**, **6**, **7**, **14**, **15**, **16** et **17**

Composés	Masse molaire calculée (g.mol ⁻¹)	Masse de l'ion observé (uma)
3	1062,46	1063,22 (MH ⁺)
6	1046,33	1046,46 (MH ⁺)
7	991,00	991,55 (MH ⁺)
14	2583,57	2585,22 (MH ⁺)
15	3214,18	3217,86 (MH ⁺)
16	1783,15	1784,72 (MH ⁺)
17	2011,38	2012,13 (MH ⁺)

A titre d'exemple, nous donnons, sur les figures ci-dessous, le spectre du composé **14** et l'agrandissement du composé **16**.

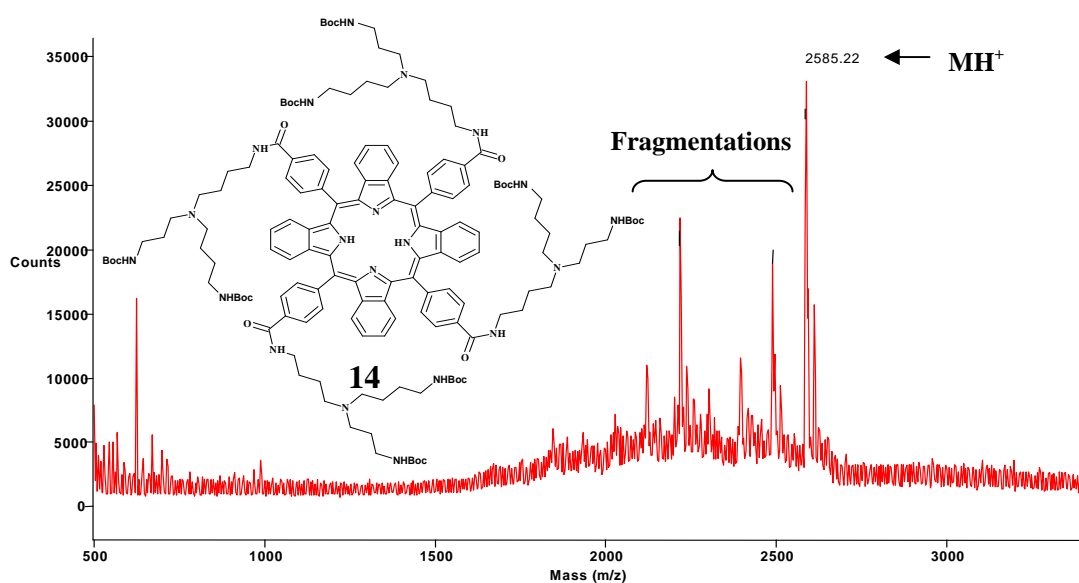


Figure II-27 : Spectre de masse MALDI du composé **14**

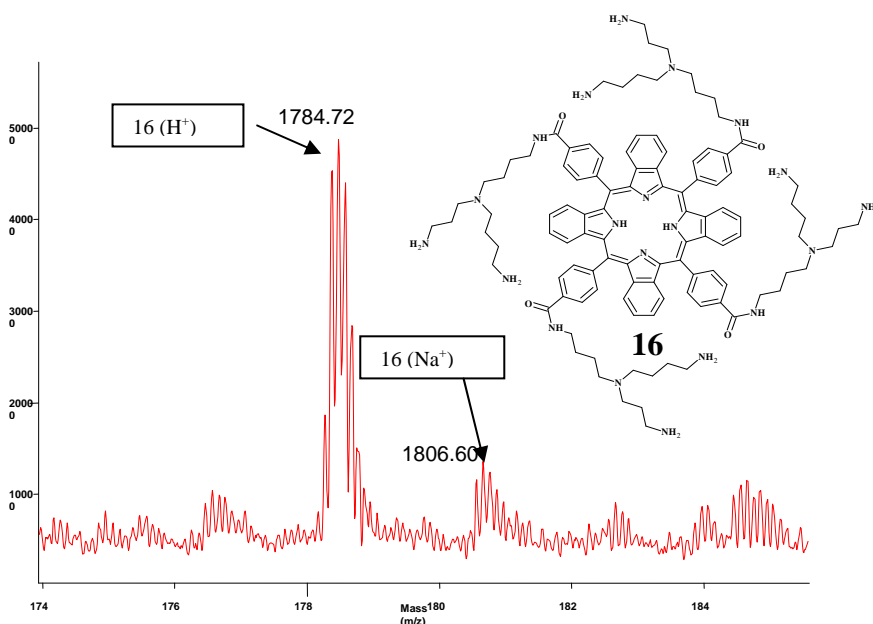


Figure II-28 : Agrandissement du spectre de masse MALDI du composé **16**

Tous les spectres présentent le pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$. Cependant, nous constatons également la présence d'ions fragments primaires et secondaires correspondants au départ de groupements protecteurs Boc (*tert*-butyloxycarbonyle) pour les composés protégés. Ces derniers ont été observés sur des composés similaires tels que les porphyrines tétraspermidine et tétraspermine protégées.⁹³ Nous observons aussi, comme dans le cas du composé **16** (Figure II-28), des ions issus du processus de cationisation $[M+Na]^+$.

6-3 RMN du proton

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton de la porphyrine **3**, de la benzoporphyrine **6**, ainsi que des benzoporphyrines tétrapolyaminées **14** (Figure II-29) et **15** ont été enregistrés à la fréquence de 400 MHz dans le chloroforme deutéré. Les spectres des produits déprotégés correspondants **16** et **17** ont, quant à eux, été réalisés dans le méthanol deutéré. Enfin le spectre de la benzoporphyrine **7** a été réalisé dans le DMF deutéré. D'une manière générale, le spectre RMN 1H de tels produits se compose de cinq groupes de signaux:

- Les protons phényles (H_{2'}-3'-4'-5') entre 8,25 et 8,44 ppm
- Les protons du noyau benzénique (H₂¹-2²-2³-2⁴) entre 6,90 et 7,30 ppm
- Les protons de la chaîne carbonée du bras (H_a, H_b, H_c et H_d) et des polyamines (H_a, H_{a'}, H_{a''}, H_β, H_{β'}, H_{β''}, H_γ, H_{γ'}, H_{γ''} et H_δ) entre 1,20 et 3,80 ppm

- Les protons NH pyrroliques ($H_{\text{NH interne}}$) vers -1,1 ppm
- Les protons du *tert*-butoxycarbonyle ($H_{\text{CH}_3 \text{Boc}}$) vers 1,40 ppm

L'attribution de l'ensemble des signaux a été effectuée à partir des intégrations et des constantes de couplage, et les résultats obtenus pour les composés **3**, **6** et **7** sont regroupés dans le tableau II-5 et les résultats obtenus pour les composés **14**, **15**, **16** et **17** sont regroupés quant à eux dans le tableau II-6. Le passage d'un macrocycle tétracyclohexènoporphyrinique (composé **3**) à un macrocycle tétrabenzoporphyrinique (composé **6**) se traduit par un fort déblindage des protons présents sur les cycles en position *meso*.

Tableau II-5 : RMN¹H des benzoporphyrines* **3**, **6**, et **7**

H	3^a		6^a		7^b	
Pényle :						
$H_{3'-5'}$	8,38 (J=7,96 Hz)	d	8,55 (J=7,96 Hz)	d	8,64 (, J=7,00 Hz)	d
$H_{2'-6'}$	8,26 (J=7,96 Hz)	d	8,47 (J=8,00 Hz)	d	8,57 (J=7,44 Hz)	d
Cyclohexyle :						
$H_{2^1-2^4}$	2,2-2,4	m	7,25	s_e	7,33	s_e
$H_{2^2-2^3}$	1,2-1,6	m			7,21	s_e
H_{Me}	4,11	s	4,16	s	-	
H_{COOH}	-		-		13,77	s_e
Azote :						
H_{NH}	-2,3	s_e	-1,09	s_e	-0,69	s_e

Solvants : ^a CDCl₃; ^b DMF

* voir la partie expérimentale pour la numérotation des atomes.

Tableau II-6 : RMN¹H des benzoporphyrines* **14**, **15**, **16** et **17**

H	14^a		15^a		16^b		17^b	
Pényle :								
H _{2'-3'-5'-6'}	8,41	m	8,44	m	8,46-8,40	m	8,40-8,48	m
Cyclohexyle :								
H _{2¹⁻²4}	7,26	s	7,26	s	7,22	s	7,40	s
H _{2²⁻²3}					7,12	s	7,19	s
Bras espaceur :								
H _a	3,15-3,23	m	3,18-3,25	m	2,50-3,10	m	2,50-3,10	m
H _b	1,75-1,95	m	1,60-1,70	m	1,18-1,47	m	1,50-1,90	m
H _c	1,75-1,95	m	1,60-1,70	m	1,18-1,47	m	1,50-1,90	m
H _d	3,75	m	3,60-3,80	m	3,00-3,50	m	3,50-3,70	m
Polyamine :								
H _α	3,15-3,23	m	3,18-3,25	m	2,50-3,10	m	2,50-3,10	m
H _{α'}	3,15-3,23	m	3,18-3,25	m	2,50-3,10	m	2,50-3,10	m
H _{α''}	-		3,60-3,80	m	-		3,50-3,70	m
H _β	1,75-1,95	m	1,60-1,70	m	1,18-1,47	m	1,50-1,90	m
H _{β'}	1,75-1,95	m	1,60-1,70	m	1,18-1,47	m	1,50-1,90	m
H _{β''}	-		3,60-3,80	m	-		3,50-3,70	m
H _γ	1,75-1,95	m	1,60-1,70	m	1,18-1,47	m	1,50-1,90	m
H _{γ'}	3,62	m	3,60-3,80	m	3,00-3,50	m	3,50-3,70	m
H _{γ''}	-		1,60-1,70	m	-		1,50-1,90	m
H _δ	3,70	m	3,60-3,80	m	3,00-3,50	m	3,50-3,70	m
Boc :								
H _{CH₃ Boc}	1,42	s	1,43	s	-		-	
Azote :								
H _{NH}	7,04	s _e	7,19	s _e	-		-	
H _{NHBoc}	4,85 et 5,32	s _e	5,29	s _e	-		-	
H _{NH interne}	-1,1	s _e	-1,1	s _e	-		-	

Solvant : ^a dans le CDCl₃; ^b dans le CD₃OD

* voir la partie expérimentale pour la numérotation des atomes.

Pour les produits déprotégés, nous observons la disparition des signaux des protons méthyliques du groupement protecteur (Boc) et des protons des NH internes qui sont échangé avec le solvant.

Nous avons choisi, à titre d'exemple, de présenter l'étude détaillée du spectre RMN ^1H du composé **14** (Figure II-29).

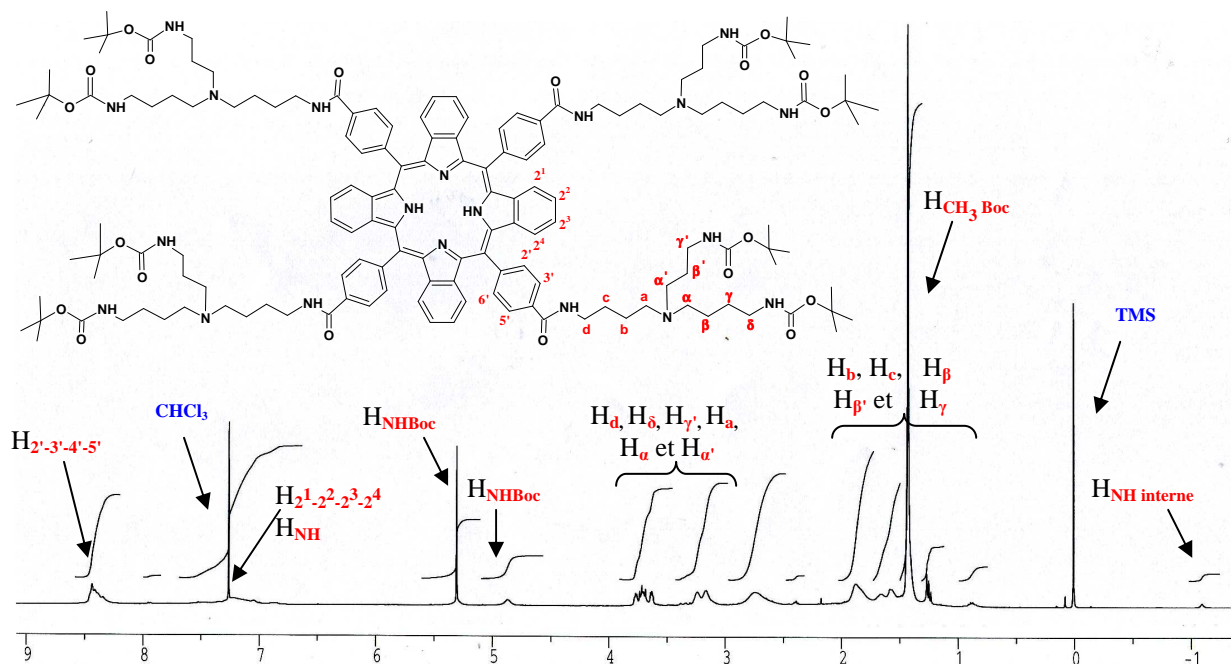


Figure II-29: Spectre RMN ^1H du composé **14**

Les protons portés par les phényles ($\text{H}_{2'-3'-4'-5'}$) résonnent sous la forme de multiplet vers 8,41 ppm ainsi que les protons portés par les benzènes ($\text{H}_{21-22-23-24}$) qui eux résonnent vers 7,26 ppm. Les protons des azotes de la fonction amide, quant à eux, résonnent à 4,85, 5,32 ppm et 7,04 sous la forme d'un singulet élargie. Les protons du bras espaceur (H_a , H_b , H_c et H_d) se situent respectivement sous forme de multiplets entre 3,15 et 3,23 ppm, entre 1,75 et 1,95 ppm et à 3,75 ppm. Nous observons que les protons, portés par les carbones liés aux azotes, se trouvent déblindés par rapport aux protons intermédiaires des bras. Ceci est dû à l'effet inductif attracteur de l'atome d'azote. Concernant la polyamine, les protons, H_a et $\text{H}_{a'}$, proches de l'azote tertiaire, se retrouvent déblindés vers 3,10 ppm. Les protons intermédiaires H_b , $\text{H}_{b'}$ et H_γ , résonnent ensemble vers 1,80 ppm sous la forme d'un multiplet. Quant aux protons $\text{H}_{\gamma'}$ et H_δ , voisins du groupement NH-Boc, ils se situent respectivement à 3,62 ppm et 3,70 ppm et apparaissent sous la forme d'un multiplet. Ce déblindage est dû à l'effet inductif attracteur de la liaison amide. Nous observons les protons méthyliques du Boc vers 1,42 ppm. Enfin, les protons des NH pyrroliques internes, se situant dans le cône d'anisotropie de la porphyrine (Chapitre I-4-3-a), sont fortement blindés à -1,1 ppm.

6-4 RMN du carbone

Afin de confirmer la bonne isomérie de constitution de nos unités polyamines présentes sur les macrocycles tétrabenzoporphyriniques, nous avons auparavant déterminé la structure des précurseurs polyaminés par l'utilisation de la résonance magnétique nucléaire du carbone ^{13}C combinée avec la RMN ^1H . Ainsi les spectres de RMN ^{13}C des composés **8**, **9**, **10**, **11**, **12** et **13** ont été enregistrés à la fréquence de 100,62 MHz dans le chloroforme deutéré. Nous avons choisi, à titre d'exemple, de présenter l'étude détaillée du spectre RMN ^{13}C du composé **13** (Figure II-30). D'une manière générale, le spectre RMN ^{13}C de tels produits se compose de cinq groupes de signaux :

- Les carbones des fonctions esters (C_{CO}) entre 155 et 170 ppm
- Les carbones aromatiques ($\text{C}_{\text{CH}(2,3,4,5 \text{ Ar})}$) entre 120 et 135 ppm
- Les carbones de la chaîne alkyle du bras ($\text{C}_{\text{CH}_2 \text{ a, b, c, d}}$) et des polyamines ($\text{C}_{\text{CH}_2 \alpha, \alpha', \alpha'', \beta, \beta', \beta'', \gamma, \gamma', \gamma'', \delta}$) entre 20 et 55 ppm
- Les carbones des fonctions éthers ($\text{C}_{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$) vers 78 ppm
- Les carbones alkyles primaires ($\text{C}_{\text{C}(\text{CH}_3)_3}$) vers 28 ppm

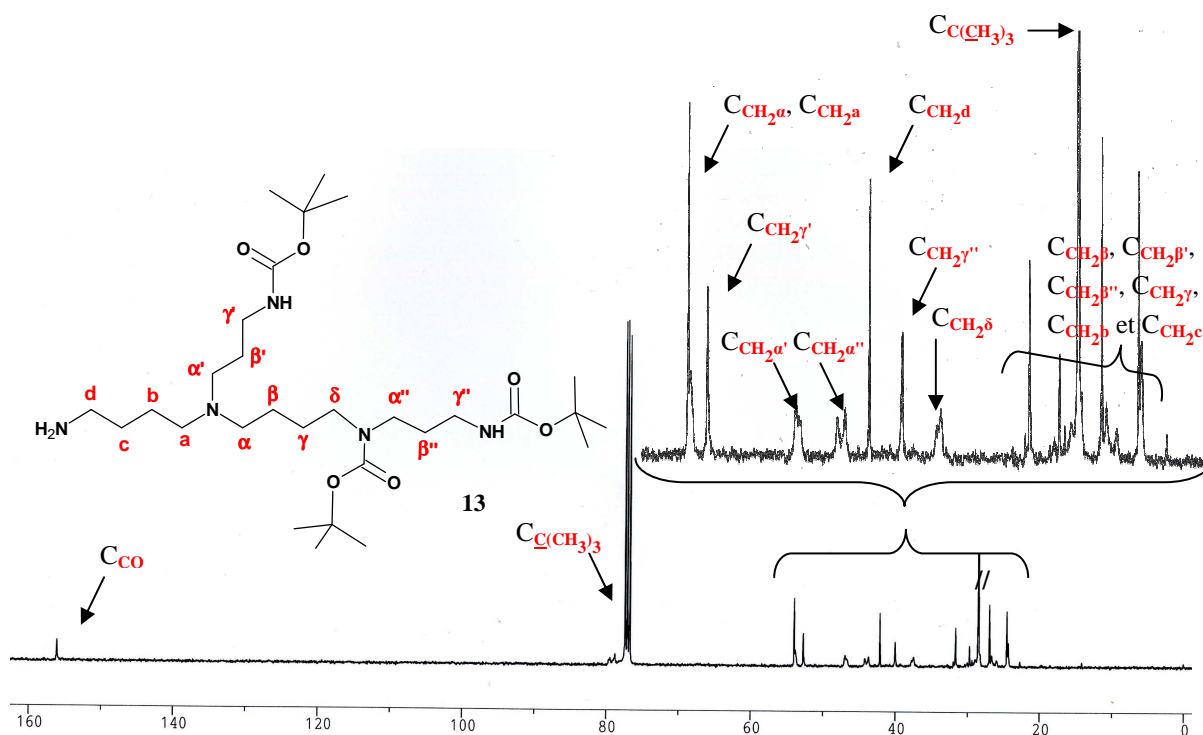


Figure II-30 : Spectre RMN ^{13}C du composé **13**

L'attribution de l'ensemble des signaux a été effectuée à partir des intégrations et les résultats obtenus pour les composés **8**, **9**, **10**, **11**, **12** et **13** sont regroupés dans le tableau II-7.

Tableau II-7 : RMN C¹³ des précurseurs polyaminés* **8**, **9**, **10**, **11**, **12** et **13**; solvant : CDCl₃

C	8	9	10	11	12	13
Carbonyle :						
C _{CO}			168,38	168,42		
C _{CO}			168,38	168,42		
C _{CO}	156,15	156,13	156,08	156,04	156,05	156,09
C _{CO}	156,05	155,98	156,08	156,04	156,05	156,09
C _{CO}		155,44		156,04		156,09
Aromatique :						
C _{CH(3-4 Ar)}			133,41	133,91		
C _{CH(2-5 Ar)}			132,14	132,14		
C _{C(1-6 Ar)}			123,70	123,20		
Ether :						
C _{C(CH₃)₃}	78,93	79,74	79,46	79,46	79,46	79,46
C _{C(CH₃)₃}	78,93	79,45	78,74	78,74	78,76	78,76
C _{C(CH₃)₃}		78,93		77,22		77,35
Alkyle secondaire :						
C _{CH₂^a}	49,45	49,63	53,64	53,74	53,88	53,96
C _{CH₂^{a'}}	47,75	47,71	53,27	53,37	53,64	52,70
C _{CH₂^{a''}}		43,93		43,93		43,69
C _{CH₂^β}	27,85	27,85	24,45	27,04	24,32	31,65
C _{CH₂^{β'}}	29,89	29,96	26,69	26,48	29,60	29,71
C _{CH₂^{β''}}		29,25		25,99		26,94
C _{CH₂^γ}	27,39	26,45	23,98	24,33	24,42	24,52
C _{CH₂^{γ'}}	39,25	37,45	39,85	39,87	40,45	37,47
C _{CH₂^{γ''}}		39,17		43,13		40,00
C _{CH₂^δ}	40,45	46,80	40,51	46,91	42,16	46,93
C _{CH₂^a}			52,25	52,58	52,08	53,71
C _{CH₂^b}			26,89	28,39	27,99	24,32
C _{CH₂^c}			26,47	28,27	26,72	26,94
C _{CH₂^d}			37,83	37,83	40,46	42,13
Alkyle primaire						
C _{C(CH₃)₃} (x 6 ou 9)	28,45	28,45	28,46	28,47	28,46	28,49

* voir la partie expérimentale pour la numérotation des atomes.

7. Conclusions

Nous avons synthétisé deux *meso*-tétraaryltétrabenzoporphyrines tétrapolyaminées afin d'augmenter le ciblage des cellules cancéreuses pour une application en PDT. Dans ce but, deux polyamines naturelles, la spermidine et la spermine ont été fonctionnalisées par l'intermédiaire d'un bras aminobutyle. Les deux précurseurs synthétisés ont ensuite été fixés sur la tétrabenzoporphyrine préalablement synthétisée. Des études caractéristiques (spectrométrie de masse MALDI, spectrométrie UV-visible et RMN du proton) ont permis de confirmer les structures attendues pour ces nouvelles molécules protégées et déprotégées. De plus ces composés présentent tous en UV-visible une forte bande d'absorption vers 700 nm leur conférant une excellente aptitude à la PDT. Cependant, afin d'améliorer les rendements globaux, une autre approche envisageable serait de fixer le précurseur polyaminé directement sur le synthon aldéhydique. Cette solution qui requiert une protection adéquate des fonctions amines primaires résistante aux conditions de démétaillations, demeure une perspective intéressante.

Chapitre III

Synthèses de tétrabenzoporphyrines tétraglucosylées

1. Introduction

Dans le cadre de l'élaboration de nouveaux sensibilisateurs, applicables en PDT et afin d'augmenter leurs potentialités anticancéreuses (Chapitre I-5-3-e), ainsi qu'une bonne balance hydrophile/hydrophobe, nous nous sommes intéressés à la synthèse des benzoporphyrines glucosylées. Nous avons ainsi réalisé, dans un second temps, la synthèse de tétrabenzoporphyrines portant soit quatre unités β -D-glucose **24**, soit quatre unités α -D-glucose relié par un bras espaceur **29** (Figure III-1). Dans ce but nous avons effectué deux synthèses, la première consiste à former un synthon glucidique, qui en présence de la tétrahydroisoindeole **2** conduit à la formation du macrocycle porphyrinique glucosylée (Figure III-2). La seconde consiste à former préalablement le macrocycle puis de fixer les unités glucidiques (Figure III-3). Afin de réaliser cette deuxième synthèse, nous avons opté pour la présence d'un bras espaceur plus hydrophile, le 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-(éthylamine), entre le cycle benzoporphyrinique et les unités glucidiques. Ce bras permettrait d'améliorer la flexibilité de l'unité glucidique mais également d'augmenter le caractère amphiphile du complexe photosensibilisateur-vecteur.

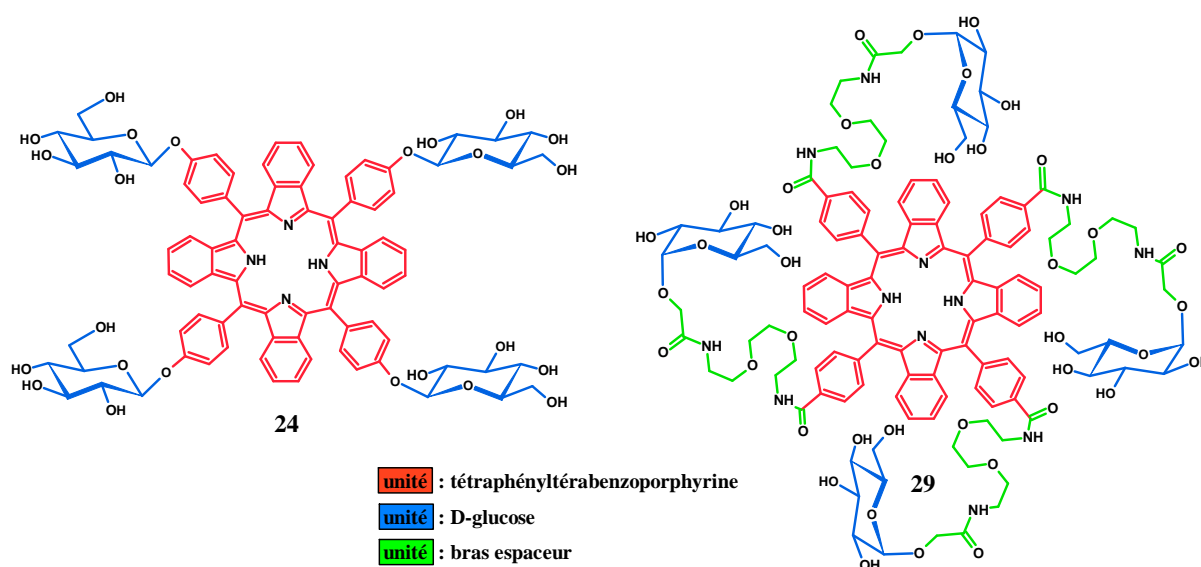


Figure III-1 : Tétrabenzoporphyrines tétraglucosylées synthétisées

2. Stratégies de synthèse

Les stratégies de synthèse sont représentées sur les schémas rétrosynthétiques de la figure III-2 et de la figure III-3.

Les étapes de la première synthèse s'inspirent de celles utilisées pour la formation du synthon benzoporphyrinique décrite au chapitre précédent, mais contrairement à celle-ci, le synthon aldéhydique est directement fonctionnalisé. La tétrabenzoporphyrine tétraglucoacétylée (Figure III-2) est obtenue par condensation de la tétrahydroisoindole **2** sur le benzaldéhyde glucoacétylé **19** suivi d'une réaction d'oxydation. Enfin après déprotection des fonctions acétyle le composé final **24** est isolé.

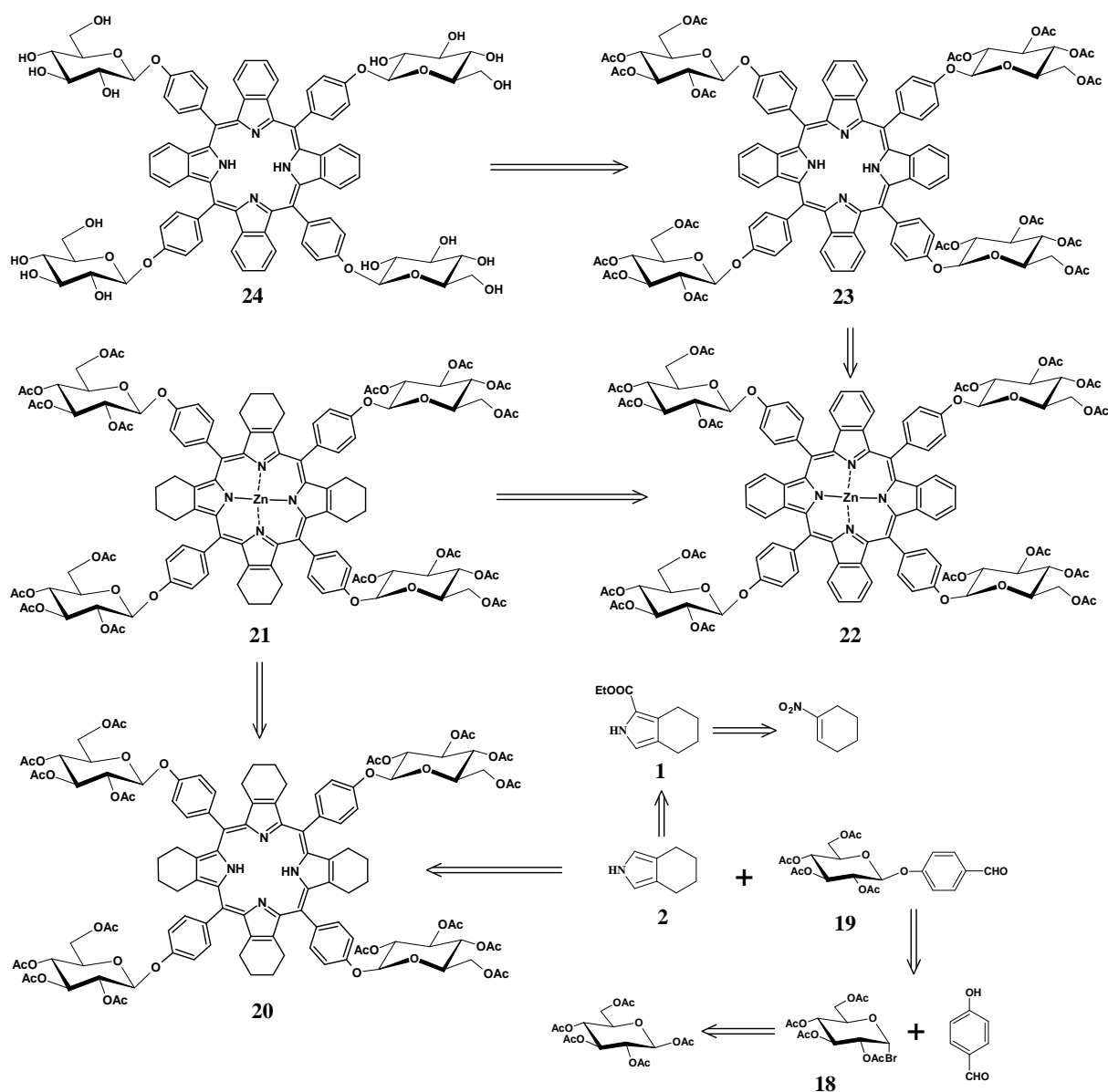


Figure III-2 : Schéma rétrosynthétique (synthèse 1)

La seconde synthèse emploie la tétracarboxyphényltétrabenzoporphyrine **7** (Figure III-3), obtenu selon la méthode décrite au chapitre II-3. Un bras éthylène-glycol **25** est ensuite fixé sur le macrocycle benzoporphyrinique suivant un protocole semblable à l'amidation des polyamines **12** et **13** sur ce même précurseur. Puis les unités glucidiques sont couplées par addition d'une δ -lactone et après déprotection des fonctions acétyles le composé final **29** est isolé.

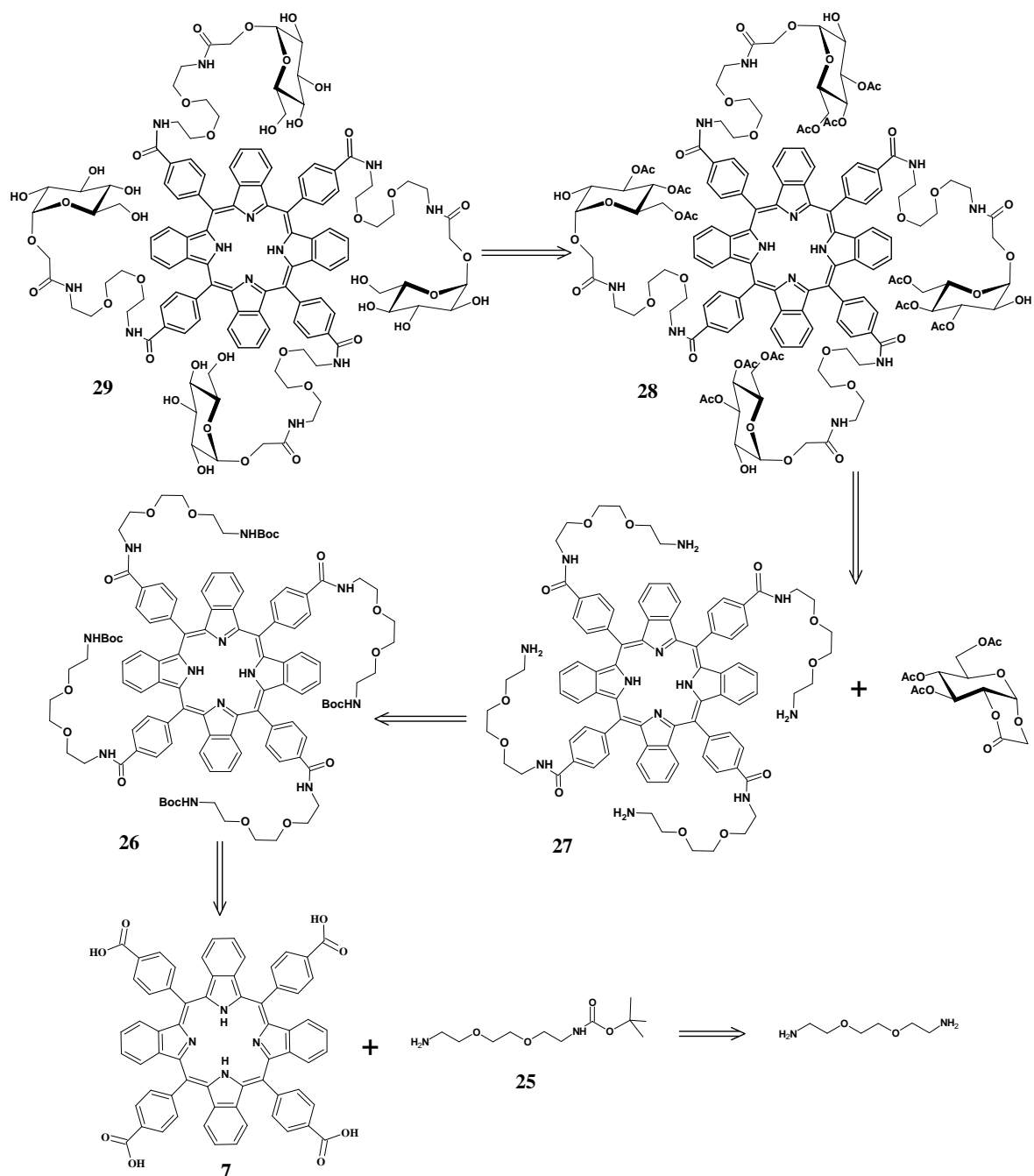


Figure III-3 : Schéma rétrosynthétique (synthèse 2)

3. Tétrabenzoporphyrine tétra- β -glucosylé (24)

Pour former la tétrabenzoporphyrine portant quatre unités β -D-glucose, il est nécessaire dans un premier temps de synthétiser un précurseur aldéhydique glucosylé, le 4-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-benzaldéhyde.

3-1 Synthèse de l'aldéhyde glucoacétylé (19)

a) Rappels bibliographiques sur la glycosylation

Rappelons que la *O*-glycosylation est une réaction qui permet de modifier le carbone anomérique d'un glucide afin d'obtenir un hétéroside non réducteur comprenant le glucide et une partie non saccharidique appelée aglycone (Figure III-4).

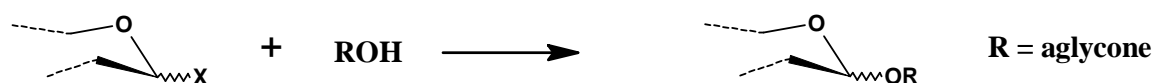


Figure III-4 : *O*-glycosylation

Si les premières *O*-glycosylations ont été réalisées à la fin du XIX^e siècle, celles-ci n'ont connu un développement important qu'au cours des dernières décennies, ceci en raison de leur impact en chimiothérapie et en biochimie. Nous nous proposons de décrire très brièvement les réactions de *O*-glycosylation les plus connues de la littérature. La première *O*-glycosylation, à partir d'un glycosyle hydroxylé, a été réalisée à la fin du XIX^{ème} siècle par Fischer.¹⁴⁸ (Figure III-5).

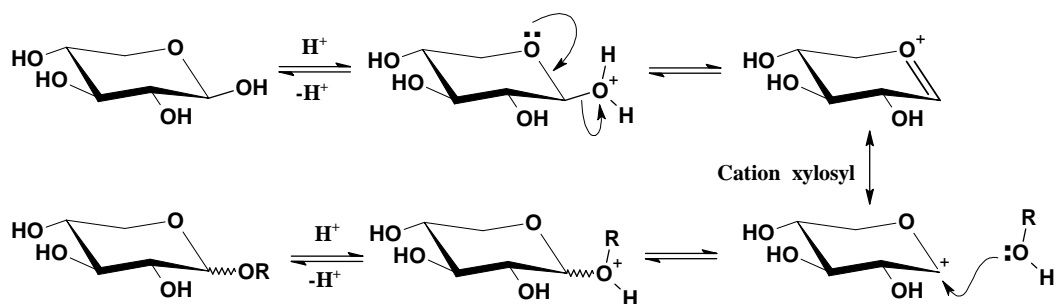


Figure III-5 : Glycosylation de Fischer

¹⁴⁸ E. Fischer *Chem. Ber.* **1893**, 26, 2400-2410

Elle consiste en la protonation de l'hydroxyle anomérique du glucide par un acide fort et en l'attaque nucléophile de l'oxonium formé par l'alcool. Cette méthodologie n'était initialement utilisée que pour des alcools simples (méthyle, benzyle, allyle),¹⁴⁹ puis elle a été appliquée à des alcools possédant des chaînes plus longues. Par la suite, la méthode a été améliorée par l'utilisation d'acides comme les résines et l'acide sulfonique ou de générateur d'acide comme le chlorure d'acétyle fournissant l'acide chlorhydrique. Sans dresser une liste exhaustive des procédés mis au point pour la glycosylation des phénols, nous présentons ceux qui nous semblent les plus représentatifs.

En 1879, Michael¹⁵⁰ présente pour la première fois la synthèse d'un *O*-phénylglucoside de configuration β obtenu par réaction du 1-chloro-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranose avec le phénolate de sodium dans l'éthanol absolu. Puis la glycosylation à partir d'un glycosyle activé a été pour la première fois introduite en 1901 par Koenigs et Knorr¹⁵¹ (Figure III-6) avec l'utilisation d'un sucre halogéné.

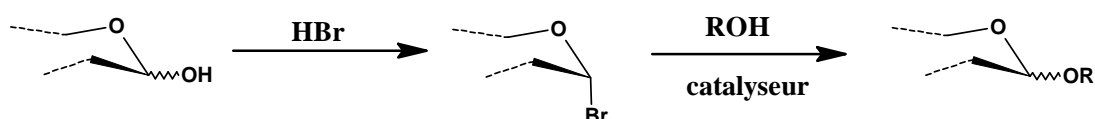


Figure III-6 : Méthode de Koenigs-Knorr

Elle repose sur l'activation du glycosyle halogéné par des acides de Lewis ou des sels de métaux lourds (argent ou mercure), suivit d'une attaque nucléophile de l'alcool. Depuis cette date, plusieurs modifications ont été apportées à cette stratégie permettant l'utilisation d'une plus grande variété de sucres et de phénols. En 1909, Fischer et Raske¹⁵² obtiennent la glucovanilline acétylée par réaction hétérogène d'une solution de 1-bromo-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranose dans l'éther diéthylique avec une solution aqueuse du sel de sodium du 4-hydroxy-3-méthoxybenzaldéhyde. Mauthner, en 1915¹⁵³, a introduit des conditions de réaction homogène en utilisant comme base une solution aqueuse de soude avec de l'acétone comme co-solvant organique. Cette modification de la procédure de Michael trouve encore de nos jours de très nombreuses applications pour synthétiser des glycosides protégés. Cette

¹⁴⁹ B. Fischer, A. Nudelman, M. Ruse, J. Herzig, H. E. Gottlieb; *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4988-4993.

¹⁵⁰ A. Michael, *Am. Chem. J.*, **1879**, 1, 305.

¹⁵¹ W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.*, **1901**, 34, 957.

¹⁵² E. Fischer; Raske K. *Ber.*, **1909**, 42, 1465-1476.

¹⁵³ F. Mauthner; *J. Prakt. Chem.*, **1915**, 91, 174-179.

réaction permet actuellement, de par ces améliorations, d'atteindre des rendements de 90% et avec un seul anomère.¹⁵⁴

b) Synthèse du benzaldéhyde glucoacétylé

Une analyse comparative de la littérature nous a amené à choisir d'appliquer pour cette synthèse le protocole décrit par Toshima et *coll.*¹⁵⁵ adapté de la méthode de Koenigs-Knorr.^{99-d} Bien que le rendement de 40%, dû à la désacétylation partielle de la partie glucidique, soit moyen, la simplicité de la purification dans ce cas reste très intéressante. Pour cela, il faut tout d'abord substituer le carbone anomérique du glucose *peracétylé* par le brome.

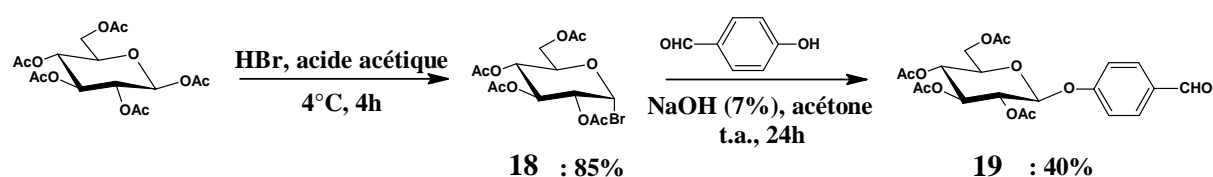


Figure III-7 : Synthèse du 4-(2',3',4',6'tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-benzaldéhyde^{99-d}

Le glucose *peracétylé* est alors dissous dans une solution de bromure d'hydrogène à basse température. Après réaction et recristallisation dans l'éther diisopropylique, le produit attendu **18** est obtenu avec 85% de rendement. Puis la deuxième étape est réalisée en présence de 4-hydroxybenzaldéhyde en milieu basique. Après purification par recristallisation, le produit attendu **19** est obtenu avec un rendement de 40%. Ce rendement faible s'explique en partie par la compétition entre la réaction de substitution et la saponification du carbone anomérique. La RMN du proton, la spectrométrie de masse et l'analyse élémentaire ont confirmé sa structure.

3-1 Synthèse de la tétraphénylporphyrine tétraglucosylée (**20**)

La tétrahydroisoindeole **2**, instable, est directement condensé avec l'aldéhyde glucoacétylé **19** (Figure III-8), selon la méthode de Lindsey¹⁶ (Chapitre I-3-1-a).

¹⁵⁴ a) T. Ogawa, M. Matsui, *Carbohydr. Res.*, **1976**, 51, 13-18., b) A. Lubineau, A. Malleron, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 1713-1716. c) S. Kobayashi, K. Koide, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 2435-2438. d) K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, Y. Iwabuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3126-3128.

¹⁵⁵ a) K. Toshima, K. Tatsuta; *Chem. Rev.*, **1993**, 93(4), 1503-1531. b) C. Kaldapa, J. C. Blais, V. Carre, R. Granet, V. Sol, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz; *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41(3), 331-335.

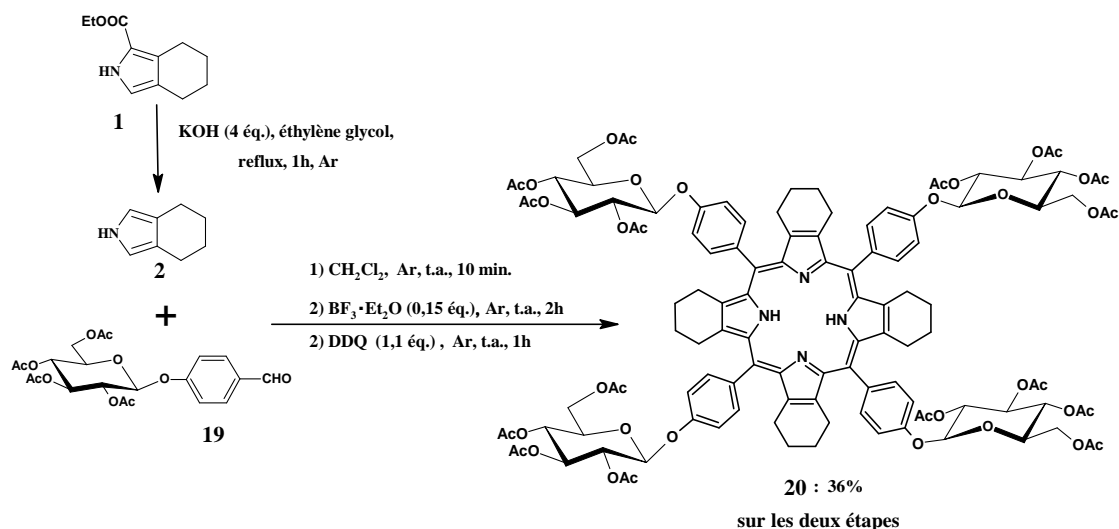


Figure III-8 : Formation du macrocycle porphyrinique

Après oxydation par le DDQ, puis purification, la tétraphényltétracyclohexènoporphyrine tétraglucoacétylée **20** est obtenu avec 36% de rendement global pour ces deux étapes. L'analyse spectroscopique IR, RMN du proton, ainsi que la spectrométrie de masse MALDI a permis de confirmer la structure des produits formés.

3-2 Oxydation de la tétraphénylporphyrine (**20**) en tétrabenzoporphyrine (**23**)

Rappelons que l'oxydation d'une cyclohexènoporphyrine en benzoporphyrine nécessite sa conversion en sa forme "métallée" et que le choix de ce métal dépend de la stabilité du composé final en milieu acide (Chapitre II-3-4). Dans notre cas, la benzoporphyrine **23** attendue porte des motifs glucidiques susceptibles de se cliver en présence d'un acide fort concentré. Nous avons donc choisi une métallation par le zinc nécessitant des conditions plus douces (HCl, 10M) lors de la démétallation. Ainsi, la porphyrine glucoacétylée **20** est mise en présence d'acétate de zinc dans un mélange de solvants $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9/1). La porphyrine métallée **21** est obtenue avec un rendement de 62% après purification. Celle-ci, en solution dans du tétrahydrofurane anhydre, puis oxydée par le DDQ, conduit après une heure d'agitation à reflux à la tétrabenzoporphyrine métallée **22**, avec 37% de rendement. Une fois purifiée, elle est démétallée en milieu acide : acide chlorhydrique à 10% molaire, et après neutralisation du milieu réactionnel, la tétrabenzoporphyrine glucoacétylée **23**, est obtenue avec 76% de rendement (Figure III-9).

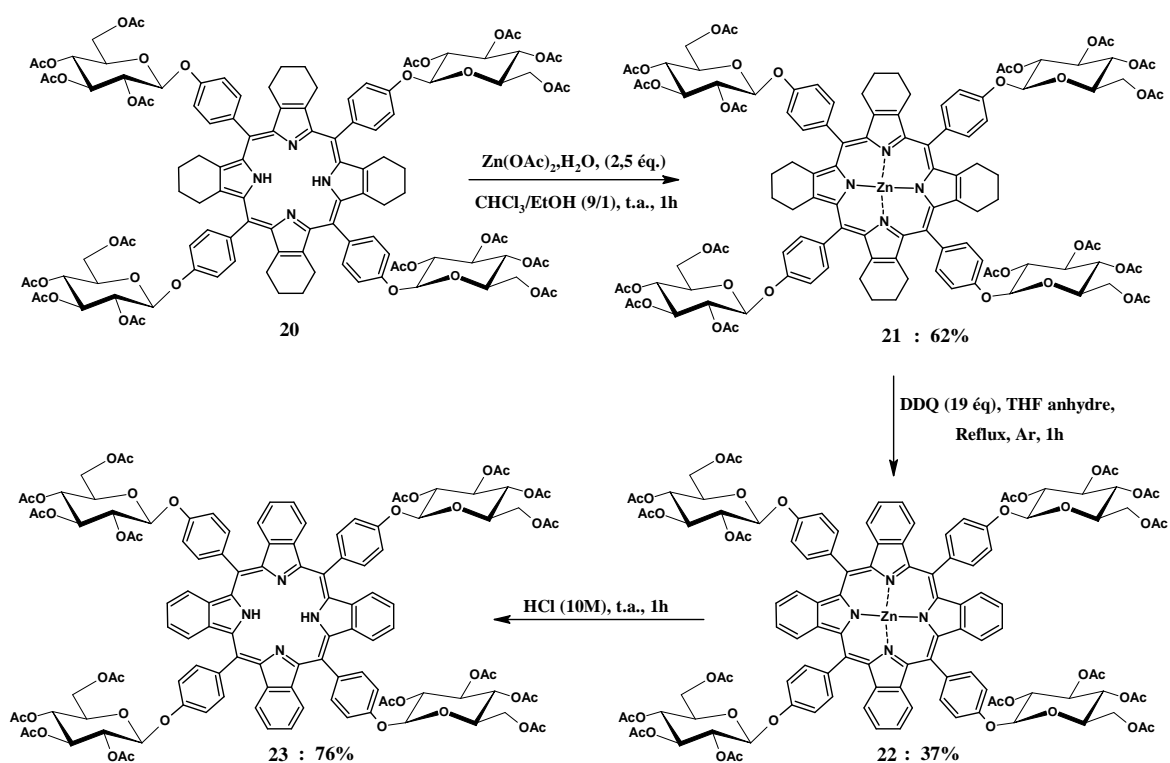


Figure III-9 : Oxydation de l'arylporphyrine (**20**) en benzoporphyrine (**23**)

Le rendement global de l'aromatisation, avec l'utilisation du zinc, de la cyclohex\u00e9noporphyrine **20** en benzoporphyrine **23**, est de l'ordre de 18%. Ce rendement modeste est plus faible que celui obtenu avec le cuivre en raison de la stabilit\u00e9 plus faible du ch\u00e9late porphyrine-zinc limitant ainsi le rendement global d'aromatisation.

3-3 D\u00e9protection de la benzoporphyrine glucosyl\u00e9e ac\u00e9tyl\u00e9e (**24**)

Plusieurs r\u00e9actions de d\u00e9sac\u00e9tylation sont d\u00e9crites dans la litt\u00e9rature. Cette r\u00e9action peut \u00eatre effectu\u00e9e en milieu basique en utilisant par exemple comme base des solutions m\u00e9thaloniques de m\u00e9thylate de sodium, de m\u00e9thylate de baryum, de soude ou de diverses amines telles que la di\u00e9thylamine. Dans notre cas, nous avons r\u00e9alis\u00e9 la r\u00e9action de d\u00e9sac\u00e9tylation dans un m\u00e9lange de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (8/2) en pr\u00e9sence d'une solution m\u00e9thanolique de m\u00e9thylate de sodium. La pr\u00e9sence du dichlorom\u00e9thane permet de solubiliser le produit ac\u00e9tyl\u00e9. La r\u00e9action est totale et ne donne lieu \u00e0 aucune d\u00e9gradation (Figure III-10).

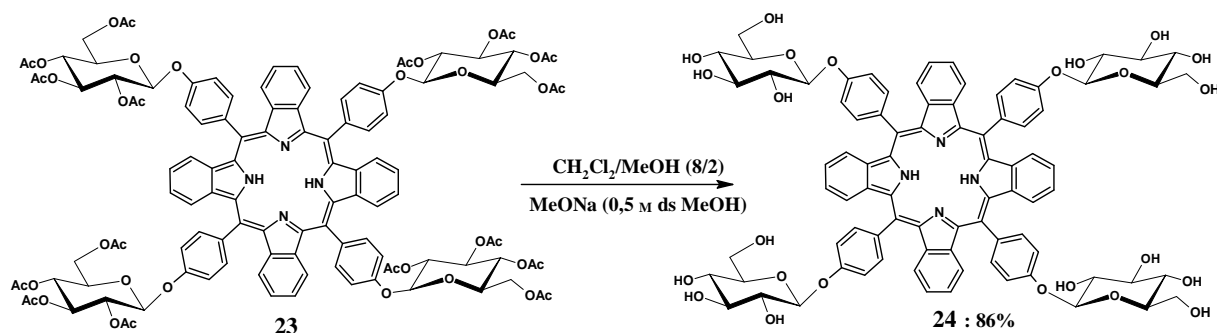


Figure III-10 : Déprotection des fonctions alcools

Après purification sur plaque de silice le composé déprotégé **24** est obtenu avec 86% de rendement. Ce produit est soluble en milieu aqueux et dans les solvants protiques comme le méthanol.

4. Tétrabenzoporphyrine tétra- α -glucosylé (**25**)

Cette synthèse a été réalisée en partant de la tétraphényltétrabenzoporphyrine **7** (Figure III-3) préalablement décrite au cours du Chapitre II-3.

4-1 Synthèse du bras espaceur (**25**)

Pour réaliser la protection de la chaîne alkyle par le groupement Boc, nous avons utilisé le Boc-ON comme pour les composés polyaminés. Le Boc-ON est introduit dans des conditions non-stœchiométriques afin de se limiter à la protection d'une seule des deux fonctions amines (Figure III-11). L'absence totale du produit secondaire permet ainsi de faciliter l'étape de purification. La réaction se déroule dans le dichlorométhane à température ambiante pendant 36 heures.

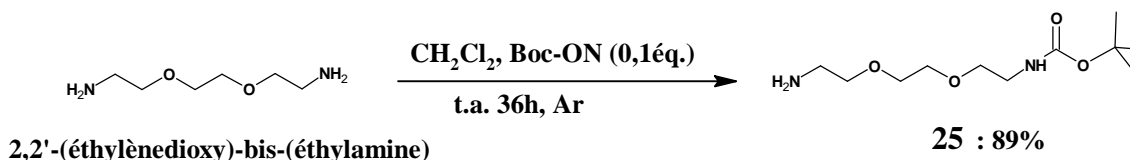


Figure III-11 : Protection d'une fonction amine primaire du bras espaceur

La chaîne alkyle mono-protégée **25** est obtenue, après purification, avec un rendement de 89% par rapport au réactif en défaut : le Boc-ON. Les données physiques de ces produits sont conformes à celles de la littérature.⁸⁴

4-2 Fixation des bras espaceurs sur le macrocycle benzoporphyrinique (**26**)

La fixation du bras éthylène-glycol sur chaque fonction carboxylique de la benzoporphyrine **7** est réalisée dans des conditions similaires utilisées lors de l'amidation des précurseurs polyaminés sur ce même synthon (Chapitre II-5-1). La benzoporphyrine est solubilisée dans du DMF à température ambiante, en présence de 4,4 équivalents de DCC et de HOBt. Après l'ajout du bras espaceur, puis 18 heures de réaction et purification, la porphyrine alkylée **26**, est obtenue avec un rendement de 85% (Figure III-12).

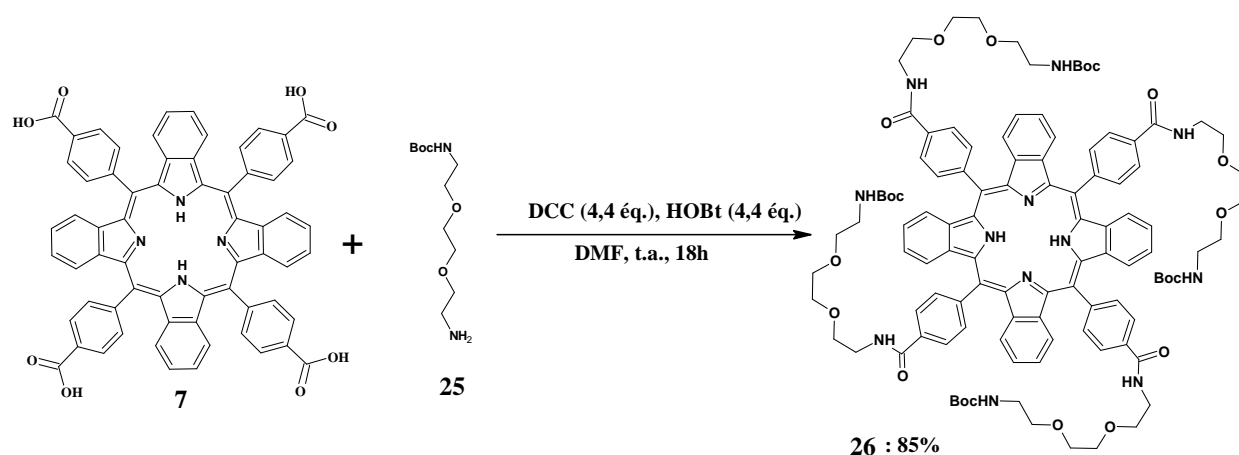


Figure III-12 : Fixation des bras espaceurs sur la tétracarboxyphényltétrabenzoporphyrine

Le rendement, conforme à ceux rencontrés avec de tels bras⁸⁴, est supérieur à ceux obtenus avec les précurseurs polyaminés. Ainsi, les rendements plus faibles rencontrés avec les bras portant le motif spermidine **14** ou spermine **15** seraient probablement lié à l'encombrement stérique occasionné par la fixation de ces chaînes alkyles, limitant ainsi l'accessibilité des dernières fonctions carboxyliques libres.

4-3 Déprotection des fonctions amines primaires (27)

Cette étape consiste à éliminer le groupement protecteur Boc afin de libérer les fonctions amines primaires. Pour cela, le produit protégé est placé, à température ambiante, dans un mélange CH₂Cl₂/TFA 8/2 (Figure III-13).

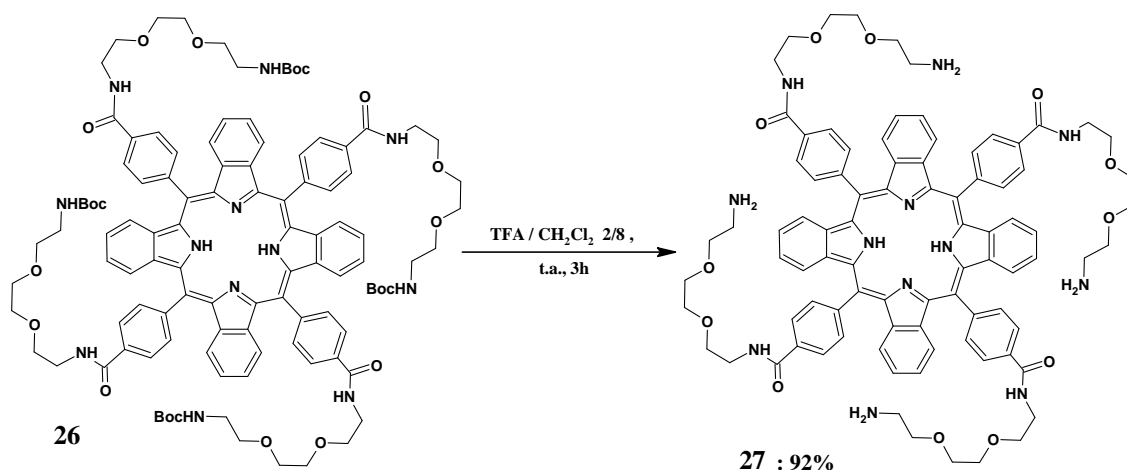


Figure III-13 : Déprotection des fonctions amines primaires

Après évaporation du TFA et neutralisation par résine basique, le composé déprotégé **27** est obtenu avec un rendement quasi quantitatif.

4-4 Couplage de la benzoporphyrine aminée avec la δ -lactone (**28**)

Le synthon glucidique utilisée dans ce travail, la δ -lactone triacétylée (Figure III-14), nous a été fourni dans le cadre d'une collaboration avec le professeur Yves Queneau de l'UMR 5181 de Lyon.¹⁵⁶

La δ -lactone provient de l'oxydation de l'isomaltulose ou du tréhalulose, isomères du saccharose, suivie d'une acétylation des fonctions hydroxyles (annexe, p.193). Ce composé peut être utilisé comme un agent acylant capable de fournir une entité sucre étant donné la réactivité potentielle de la fonction lactone à l'égard des nucléophiles. En effet la réaction de la lactone triacétylée avec des nucléophiles, tels que les alcools ou les amines, conduit à la formation d'esters ou d'amides (Figure III-14), formés par ouverture du cycle lactone. Ces

¹⁵⁶ a) S. Trombotto, A. Bouchu, G. Descotes, Y. Queneau; *Tetrahedron Lett.* ; **2000**, 41(43), 8273-8277. b) Y. Queneau, J. Fitremann, S. Trombotto; *C.R. Chimie*, **2004**, 7(2), 177-188.

produits sont caractérisés par une fonction hydroxyle libre en position 2 sur la partie glucopyranoside.

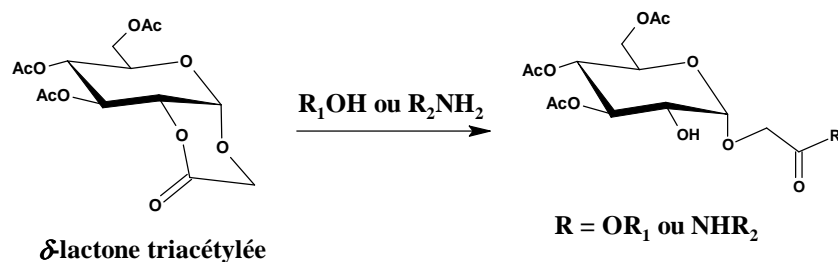


Figure III-14 : Ouverture de la δ -lactone triacétylée par des nucléophiles oxygénés ou azotés

L'ouverture de la lactone triacétylée par des nucléophiles est favorisée par l'emploi de DMAP (Figure III-15) et permet la transformation total du substrat.

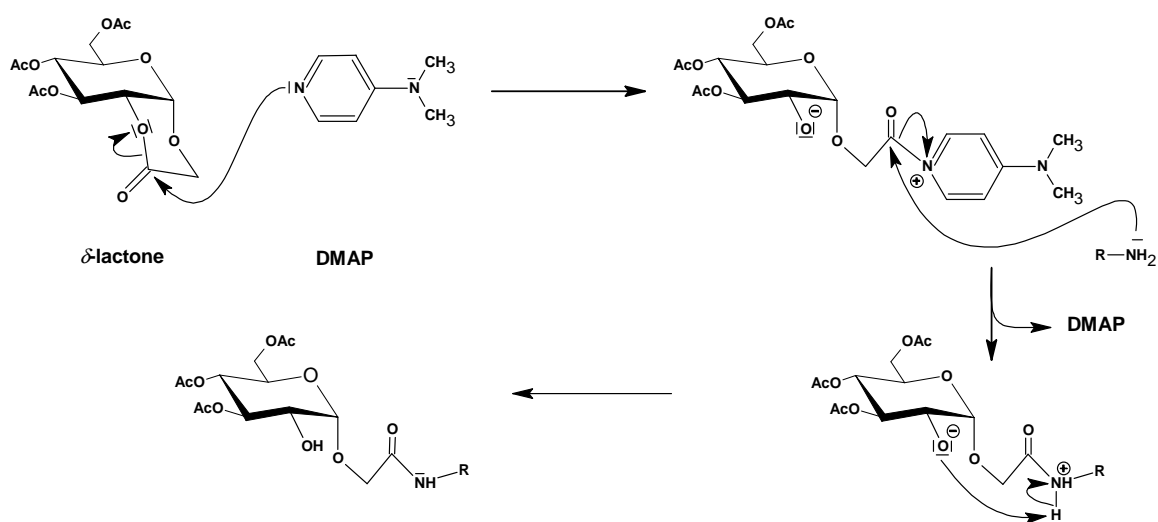


Figure III-15 : Mécanisme générale de fixation de la δ -lactone sur une fonction amine primaire

La δ -lactone est mis en présence de la benzoporphyryne alkylée **27** et de DMAP en large excès dans le chloroforme (Figure III-16).

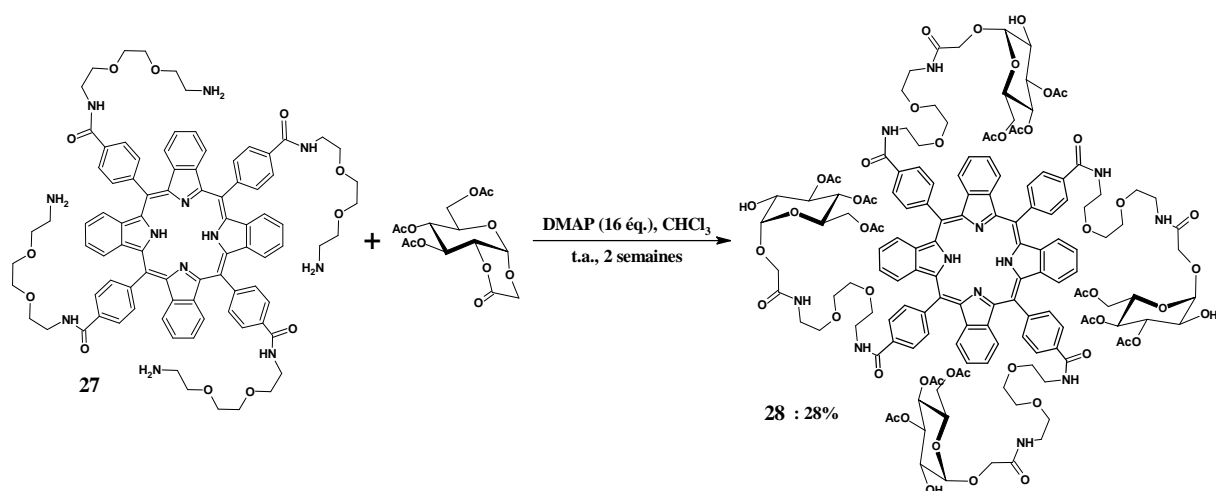


Figure III-16 : Couplage de la benzoporphyrine aminée avec la δ -lactone

Après deux semaines de réaction, le solvant est évaporé et après purification le composé tétraglucosylé **28** est obtenu avec 28% de rendement.

4-5 Déprotection de la benzoporphyrine glucosylée acétylée (**29**)

La réaction de désacétylation (Figure III-17), aboutissant à la tétrabenzoporphyrine tétraglucosylée **29**, s'effectue dans les mêmes conditions que pour l'obtention du composé **24**.

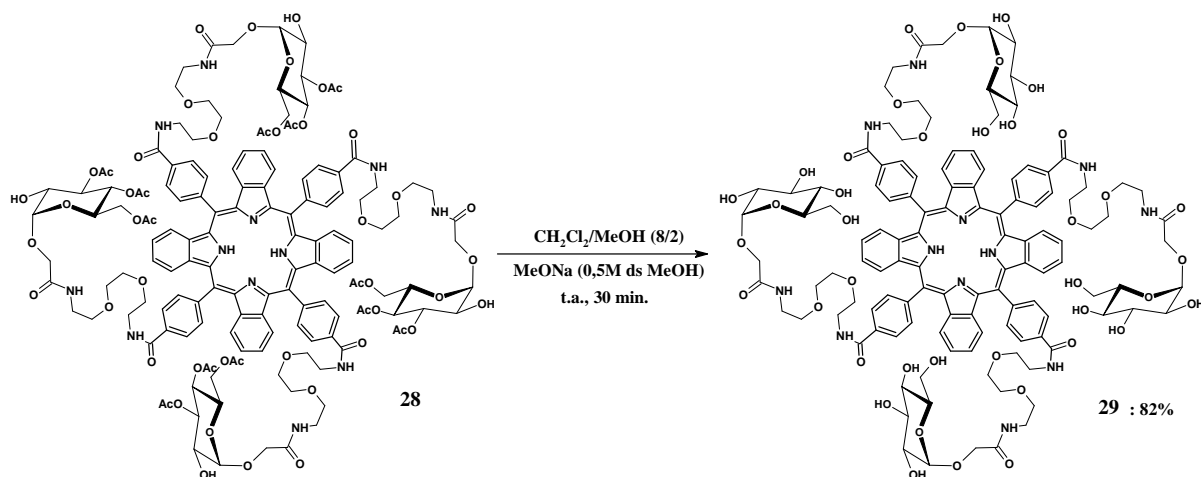


Figure III-17 : Déprotection des fonctions alcools

La benzoporphyrine **29** est isolée avec un rendement de 82%.

5. Caractérisation

Une étude par spectroscopie UV-visible, RMN du proton et par spectrométrie de masse sur les porphyrines et benzoporphyrines synthétisées confirme les structures attendues.

5-1 Spectroscopie UV-visible

Les spectres des composés, alkylé et glucosylés, protégés sont réalisés dans le chloroforme et ceux des produits déprotégés sont réalisés dans le méthanol. Les spectres des benzoporphyrines présentent une forte bande de Soret vers 470 nm, et trois bandes Q de plus faibles intensités vers 600, 645 et 700 nm. Les spectres obtenus pour les produits finaux protégés et déprotégés sont comparables aux spectres attendus pour de telles structures et leurs valeurs sont illustrées dans le tableau ci-dessous (Tableau III-1).

Tableau III-1 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visible des composés **20**, **23**, **24**, **26**, **27**, **28** et **29**
 λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)], à 20°C

Composés	Bande de Soret	Q III	Q II	Q I
20^a	476 (134,9)	578 (8,6)	632 (10,3)	691 (19,1)
23^a	466 (313,6)	591 (22,1)	642 (42,0)	697 (17,4)
24^b	470 (299,6)	588 (23,3)	629 (35,2)	697 (14,7)
26^a	469 (151,1)	596 (10,0)	646 (22,4)	703 (8,8)
27^b	469 (131,9)	595 (5,3)	645 (16,0)	700 (3,8)
28^a	469 (230,8)	596 (11,5)	648 (30,2)	701 (9,2)
29^b	464 (99,7)		652 (12,2)	698 (1,7)

Solvants : ^a CHCl₃; ^b MeOH

Une étude comparative des spectres UV de l'aryl-porphyrine **D** (Figure III-18) et de la benzoporphyrine **24** tétraglucosylées, confirme les observations constatées au chapitre précédent avec les composés polyaminés, à savoir des caractéristiques intéressantes pour une utilisation en PDT (Tableau III-2 et figure III-19).

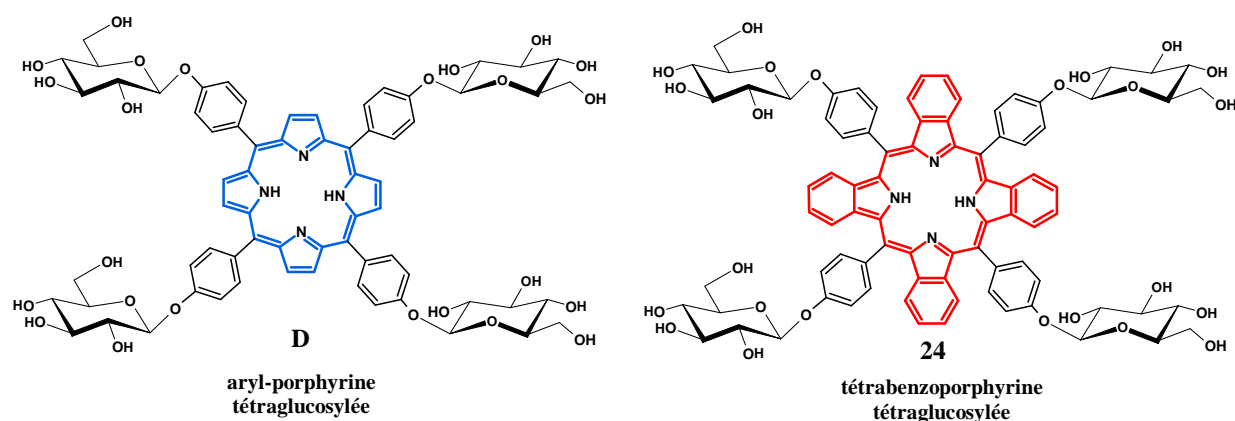


Figure III-18 : macrocycles tétraglucosylés: aryl-porphyrine et tétrabenzoporphyrine **24**

Tableau III-2 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visible de macrocycles tétraglucosylés aryl-porphyrine **D** et benzoporphyrine **24**
 λ_{max} (nm) [coefficient d'absorption ($\epsilon \times 10^{-3} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$)], à 20°C, dans le MeOH

Composés tétraglucosylés	Bande de Soret	Q IV	Q III	Q II	Q I
Tétrabenzoporphyrine 24	470 (299,6)		588 (23,3)	629 (35,2)	697 (14,7)
Aryl-porphyrine D	428	526	564	606	661

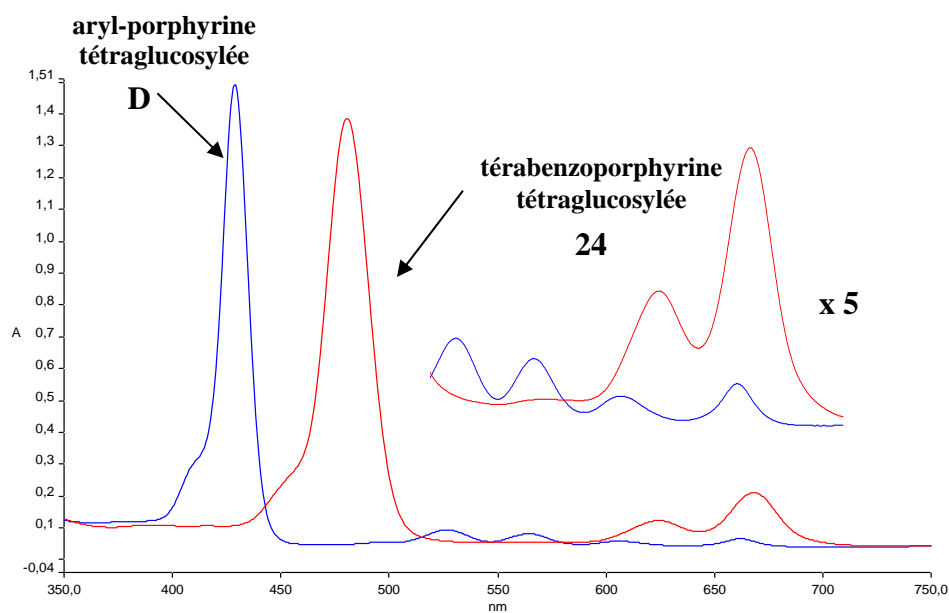


Figure III-19 : Bandes caractéristiques des spectres UV-visible, dans le MeOH d'une aryl-porphyrine **D** et d'une tétrabenzoporphyrine **24** portant les mêmes unités osidiques

5-2 Spectrométrie de masse MALDI

L'analyse structurale des benzoporphyrines tétraglucosylées a été poursuivie par l'étude de leur spectre de masse (méthode MALDI). Les résultats obtenus pour les macrocycles **20**, **23**, **24**, **26**, **27**, **28** et **29** sont présentés dans le tableau III-3. Tous les spectres présentent le pic quasi-moléculaire $[M+H]^+$.

Tableau III-3 : Spectrométrie de masse MALDI des composés **20**, **23**, **24**, **26**, **27**, **28** et **29**

Composés	Masse molaire calculée (g.mol ⁻¹)	Masse de l'ion observé (uma)
20	2214,8	2215,51 $[M+H]^+$
23	2198,7	2198,66 $[M+H]^+$
24	1527,5	1527,0 $[M+H]^+$
26	1912,22	1912,30 $[M+H]^+$
27	1511,8	1510,86 $[M+H]^+$
28	2896,9	2896,55 $[M+H]^+$
29	2392,5	2392,67 $[M+H]^+$

A titre d'exemple, nous donnons, sur la figure ci-dessous, le spectre du composé **23**.

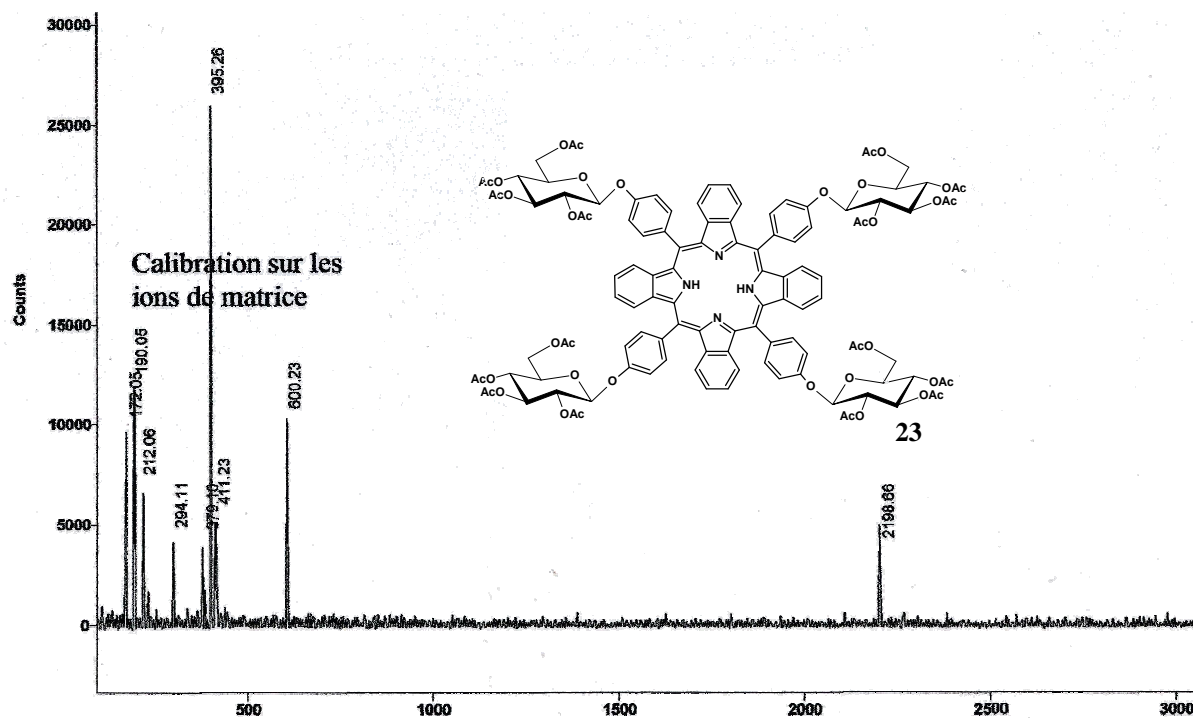


Figure III-20 : Spectre de masse MALDI du composé **23**

5-3 RMN du proton

Les spectres de résonance magnétique nucléaire du proton des benzoporphyrines aminées **26** ou tétraglucosylées **23** et **28** ont été enregistrés à la fréquence de 400 MHz dans le chloroforme deutéré. Les spectres des produits déprotégés correspondants **24**, **27** et **29** ont, quant à eux, été réalisés dans le méthanol deutéré. D'une manière générale, le spectre RMN ^1H de tels produits se compose de sept groupes de signaux (Figure III-21) :

- Les protons phényliques ($\text{H}_{2'-3'-4'-5'}$) entre 8,0 et 8,5 ppm
- Les protons du noyau benzénique ($\text{H}_{2^1-2^2-2^3-2^4}$) entre 7,10 et 7,30 ppm
- Les protons de la chaîne carbonée du bras ($\text{H}_a, \text{H}_b, \text{H}_c, \text{H}_d, \text{H}_e$ et H_f) entre 3,4 et 3,9 ppm
- Les protons des unités osidiques ($\text{H}_{1''}, \text{H}_{2''}, \text{H}_{3''}, \text{H}_{4''}, \text{H}_{5''}$ et $\text{H}_{6''}$) entre 3,5 et 5,5 ppm
- Les protons des fonctions acétyles (H_{Ac}) entre 2,0 et 2,1 ppm
- Les protons du *tert*-butoxycarbonyle ($\text{H}_{\text{CH}_3 \text{Boc}}$) vers 1,40 ppm
- Les protons NH pyrroliques ($\text{H}_{\text{NH interne}}$) vers -1,1 ppm

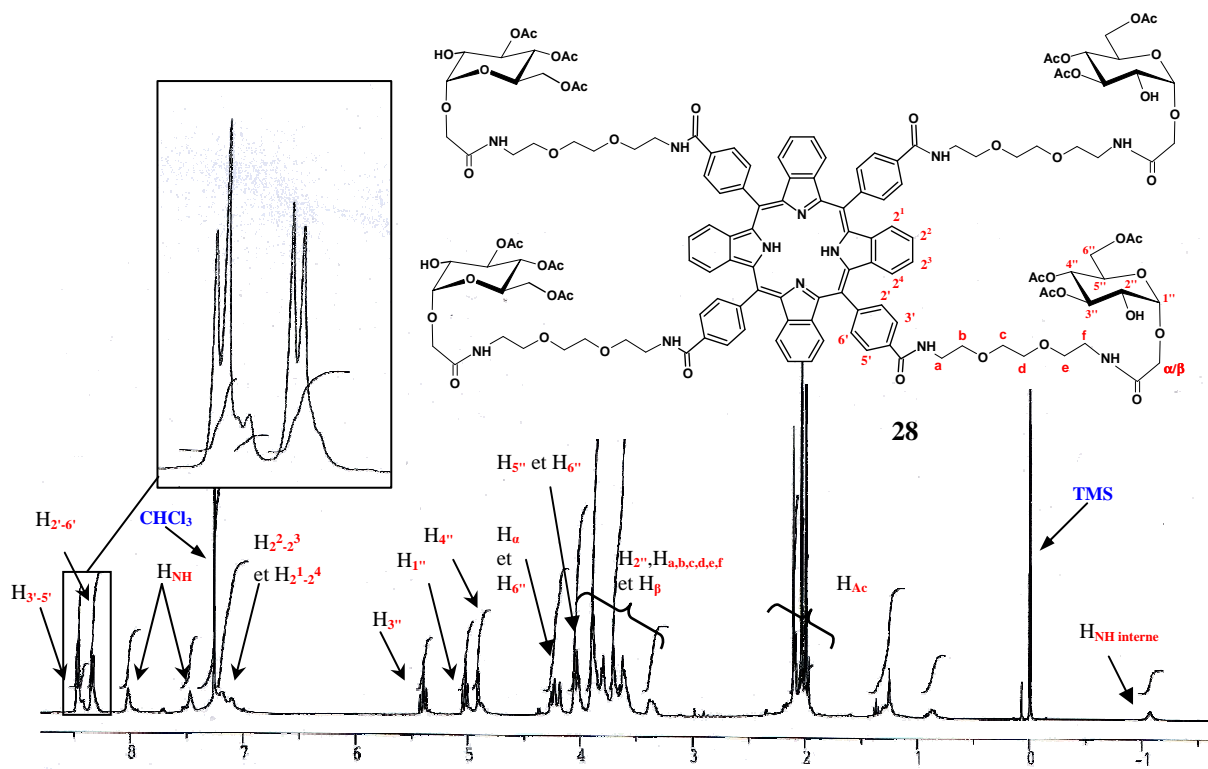


Figure III-21: Spectre RMN ^1H du composé **28**

Quand aux produits déprotégés, nous observons la disparition des signaux des protons méthyliques du groupement protecteur (Boc) ou des groupements acétyles et des protons des NH internes qui sont échangé avec le solvant. L'attribution de l'ensemble des signaux a été effectuée à partir des intégrations et les résultats obtenus pour les composés **20**, **23**, **24**, **26**, **27**, **28** et **29** sont regroupés dans le tableau III-4 et le tableau III-5.

Tableau III-4 : RMN¹H des benzoporphyrines **20**, **23** et **24**

H	20 ^a		23 ^a		24 ^b	
Pényle :						
H _{3'-5'}	8,02 (J=8,3)	d	8,28 (J=8,4)	d	8,33	m
H _{2'-6'}	7,32 (J=8,4)	d	7,50 (J=8,4)	d	7,95	m
Benzène :						
H _{2¹⁻²4}	2,20	m	7,30	m	7,1-7,3	m
H _{2²⁻²3}	1,25-1,7	m				
Partie osidique :						
H _{1''}	5,25-5,50	m	5,50	m	4,69	m
H _{2''}	5,25-5,50	m	5,50	m	4,4-4,6	m
H _{3''}	5,25-5,50	m	5,50	m	4,4-4,6	m
H _{4''}	5,25-5,50	m	5,32 (J=9,6)	t	4,4-4,6	m
H _{5''}	4,28 (J=2,4-5,40-10,8)	ddd	4,06 (J=2,2-5,2-9,7)	ddd	4,32	m
H _{6''}	4,49 (J=4,5-12,4)	dd	4,46 (J=5,2-12,3)	dd	4,4-4,6	m
H _{6''}	4,34 (J=1,5-12,2)	dd	4,29 (J=2,0-12,3)	dd	4,4-4,6	m
H _{Ac}	2,11	s	2,17	s		
Azote :						
H _{NH interne}			-1,18	S _e	-	

solvant : ^a CDCl₃; ^b CD₃OD

Tableau III-5 : RMN¹H des benzoporphyrines **26**, **27**, **28** et **29**

H	26 ^a		27 ^b		28 ^a		29 ^b	
Pényle :								
H _{3'-5'}	8,47 (J=7,0)	d	8,46 (J=7,9)	d	8,47 (J=7,9)	d	8,30	s
H _{2'-6'}	8,33 (J=7,0)	d	8,33 (J=7,9)	d	8,34 (J=8,0)	d		
Benzène :								
H _{2¹-2⁴}	7,20	s	7,25	m	7,19	m	6,80-7,30	m
H _{2²-2³}	7,13	s			7,11	m		
Bras espaceur :								
H _a	3,62	m	3,65-3,82	m				
H _b	3,76	m	3,65-3,82	m				
H _c	3,88	m	3,82-3,90	m	3,55-3,90	m	3,45-3,90	m
H _d								
H _e	3,76	m	3,65-3,82	m				
H _f	3,36	m	3,65	m				
Partie osidque :								
H _α	-	-	-	-	4,17-4,28	m	3,45-3,90	m
H _β	-	-	-	-	3,55-3,90	m	3,45-3,90	m
H _{1''}	-	-	-	-	4,91 (J=3,5)	d	4,84	m
H _{2''}	-	-	-	-	3,55-3,90	m	3,45-3,90	m
H _{3''}	-	-	-	-	5,39 (J=9,6)	t	3,45-3,90	m
H _{4''}	-	-	-	-	5,03 (J=9,8)	t	3,45-3,90	m
H _{5''}	-	-	-	-	3,99-4,05	m	4,13	m
H _{6''}	-	-	-	-	4,17-4,28	m	3,90	m
H _{6'''}	-	-	-	-	3,99-4,05	m	3,45-3,90	m
H _{Ac}	-	-	-	-	2,10	s	-	
H _{Ac}	-	-	-	-	2,03	s	-	
H _{Ac}	-	-	-	-	1,99	s	-	
Boc :								
H _{CH₃ Boc}	1,39	s	-	-	-	-	-	-
Azote :								
H _{NH}	6,54	s _e	7,25	s _e	8,00	m	6,80-7,30	m
H _{NH}	5,04	s _e	2,91	s _e	7,47	m		
H _{NH interne}	-1,09	s _e	-1,09	s _e	-1,07	s _e	-	

solvant : ^a CDCl₃; ^b CD₃OD

Nous observons que les protons portés par les phényles (H_{2'-3'-4'-5'}) résonnent sous la forme de doublet avec une constante de couplage comprise entre 7 et 8 Hz vers 8,3 ppm alors que les protons portés par les benzènes (H_{2¹-2²-2³-2⁴}) résonnent vers 7,2 ppm. Les protons des azotes de la fonction amide résonnent, quant à eux, à 6,5-8 ppm sous la forme d'un singulet élargie. Les protons du bras espaceur (H_a, H_b, H_c, H_d, H_e et H_f) se situent respectivement sous forme de

multiplets entre 3,4 et 3,9 ppm. Nous observons que les protons, portés par les carbones liés aux azotes, se trouvent déblindés par rapport aux protons intermédiaires des bras. Ceci est dû à l'effet inductif attracteur de l'atome d'azote. Concernant la partie osidique, les protons $H_{1''}$, $H_{3''}$ et $H_{4''}$ se présentent soit sous la forme de doublet ou de triplet ($J_{H_{1''}} = 3,5$; $J_{H_{3''}} = 9,6$; $J_{H_{4''}} = 9,6$) ou de multiplet vers entre 3,5 et 5,50 ppm. On observe également un multiplet pour les protons $H_{2''}$. Le proton $H_{5''}$ conduit à un double doublet à 4,0-4,3 ppm ($J_{H_{5''}} = 2,3-5,3-10$). Enfin les protons $H_{6''a}$ et $H_{6''b}$ sont observés sous la forme d'un double doublet à 4,3-4,5 ppm ($J_{H_{6''b}} = 2-12$ Hz; $J_{H_{6''a}} = 5-12$ Hz). Les groupements acétyles donnent trois singulets entre 2,0 et 2,10 ppm. Nous observons les protons méthyliques du Boc vers 1,39 ppm. Enfin, les protons des NH pyrroliques internes, se situant dans le cône d'anisotropie de la porphyrine, sont fortement blindés à -1,1 ppm.

6. Conclusions

Nous avons synthétisé deux *meso*-tétraglycoaryltétrabenzoporphyrines pour lesquelles l'entité glucidique est soit fixée directement sur le macrocycle tétrapyrrolique, soit séparée de ce dernier par l'intermédiaire d'un bras espaceur hydrophile. Ces composés ont été obtenus selon deux approches différentes. La première consiste en une condensation de précurseurs aldéhydiques glucosylés sur la tétrahydroisoindole; cette méthode nous a permis d'obtenir la tétra- β -glucosylbenzoporphyrine **24** possédant les unités glucidiques directement fixées sur le macrocycle. La seconde approche réside en une amidation puis glycosylation de la tétrabenzoporphyrine; les unités glucidiques étant liées au macrocycle via un bras éthylène-glycole conduisant à la tétra- α -glucosylbenzoporphyrine **29**. Tous ces composés ont été caractérisés par spectrométrie UV-visible, RMN 1H et MALDI. La présence des unités osidiques sur le macrocycle a permis d'augmenter le caractère hydrosoluble des chromophores par rapport aux composés polyaminés précédemment décrits. Ainsi, ces molécules semblent être de bons candidats pour une application en PDT.

Chapitre IV

Évaluations Biologiques

Suite à la synthèse de ces nouveaux photosensibilisateurs, nous avons évalué leur aptitude à produire de l'oxygène singlet, cette espèce étant l'agent toxique principal en PDT, et leurs effets biologiques sur deux lignées cancéreuses humaines (MCF-7 et HaCaT). Le choix de ces lignées repose sur le fait que les cellules MCF-7 (adénocarcinome mammaire) s'avèrent particulièrement résistantes aux différents traitements anti-cancéreux actuels et sur le fait que les cellules HaCaT d'origine kératinocytaire sont de bonnes candidates en PDT de par l'accessibilité du tissu cutané. Cette étude consiste à évaluer leur capacité à induire la mort cellulaire.

1. Production d'oxygène singlet

Nous avons évalué préalablement l'aptitude des composés finaux **16**, **17**, **24** et **29** à produire de l'oxygène singlet selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (Chapitre V-3). Ce test consiste à contrôler par chromatographie sur couche mince la formation d'endoperoxyde d'acétate d'ergostérol, à partir d'acétate d'ergostérol en présence de macrocycle polyaminé, sous bullage d'air et sous irradiation lumineuse (Figure V-1).¹⁵⁷ Les résultats obtenus sont comparés à ceux de l'hématoporphyrine (Hp) qui est un indicateur d'oxygène singlet connu. Ce test nous a permis de mettre en évidence qualitativement, pour tous les composés, la production d'oxygène singlet. Ces molécules sont donc de bons candidats pour la PDT.

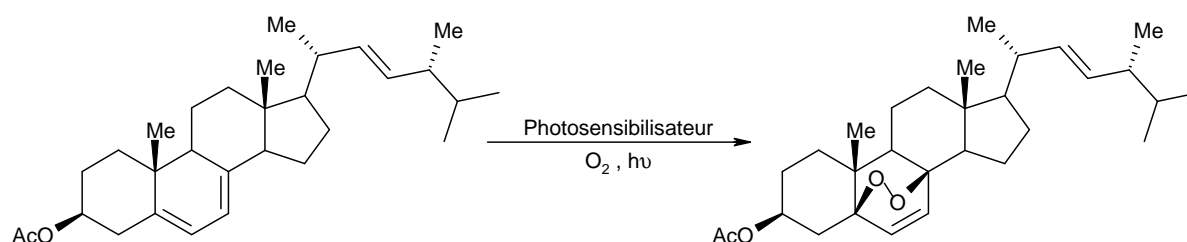


Figure IV-1 : Formation de l'endoperoxyde d'acétate d'ergostérol.

¹⁵⁷ a) D.H.R. Barton, G.F. Laws, J. Chem. Soc., **1954**, 52; b) G. Ohloff ; *Pure Appl. Chem.*, **1975**, 43, 481-502.

2. Mort cellulaire

La mort cellulaire se fait par photodestruction selon deux types de mécanismes: un mécanisme direct provoquant des dommages cellulaires irréversibles (apoptose et nécrose), et un mécanisme indirect provoquant des dommages vasculaires et immunitaires.

2-1 Les dommages cellulaires directs – Quelques rappels

Ces dommages se regroupent en deux catégories : nécrose et apoptose. La réponse cellulaire dépend essentiellement de la localisation du sensibilisateur dans les cellules et de facteurs tels la dose de colorant injectée et la lignée cellulaire.

a) La nécrose

Il s'agit d'une mort cellulaire « accidentelle » entraînant des dommages tissulaires. Lors de la nécrose, la membrane de la cellule est touchée. En effet, certains colorants lipophiles ciblent la membrane plasmique et entraînent la dégradation des lipides membranaires. La perméabilité de la membrane augmente alors et la cellule éclate. Son contenu est déversé dans le tissu environnant, déclenchant une réaction inflammatoire (Figure IV-2).

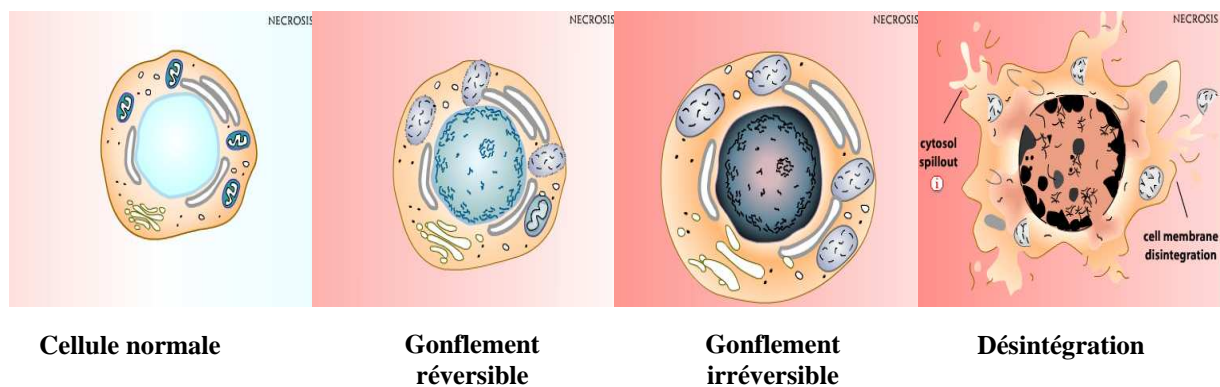


Figure IV-2 : Mécanisme de la nécrose

b) L'apoptose

C'est un processus d'élimination cellulaire génétiquement prédéterminé permettant le renouvellement cellulaire. Les cellules d'un organisme s'autodétruisent lorsqu'elles ne sont plus utiles ou qu'elles ont un dysfonctionnement. Il s'agit d'un processus irréversible n'entraînant pas d'inflammation. L'élément clé déclenchant l'apoptose est la condensation de la chromatine, suivie de la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques qui seront ensuite phagocytés (détruites par les globules blancs) (Figure IV-3).

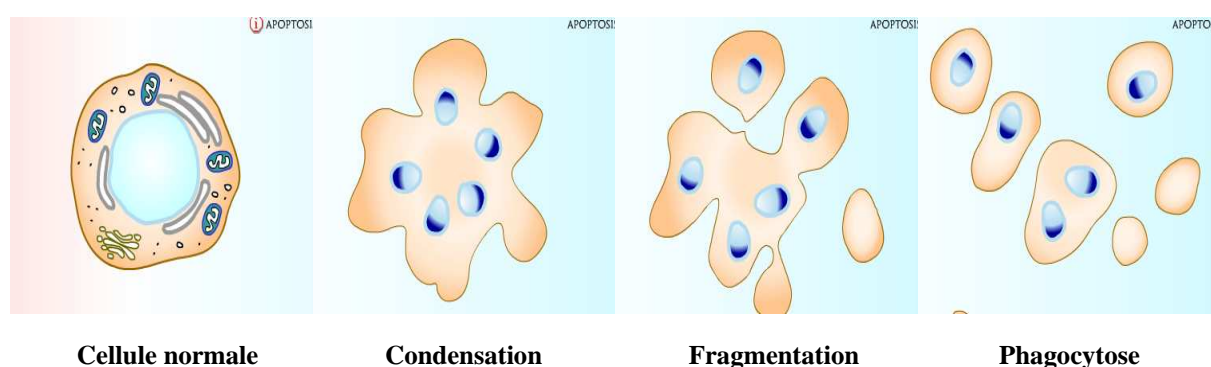


Figure IV-3 : Mécanisme de l'apoptose

La PDT provoque l'apoptose principalement par deux voies

- voie mitochondriale : l'apoptose se produit lorsque le photosensibilisateur est localisé dans les mitochondries. Elles effectuent alors un relargage du cytochrome *c* qui active la protéine Apaf-1. Cette dernière recrute des protéines, la caspase-9 et la caspase-3 pour former un complexe apoptosome. L'activation de la caspase-3 entraîne l'apoptose (Figure IV-4).

- voie « des récepteurs de mort » : dans ce cas, ce n'est pas la PDT qui induit la mort mais la présence du photosensibilisateur qui stimule la production de ces récepteurs. La cellule devient plus sensible aux facteurs pro-apoptotiques induisant la mort cellulaire. Les photosensibilisateurs vont se lier aux récepteurs de mort qui, via une protéine adaptatrice, conduit à l'activation de la caspase-8. Cette dernière clive et active la pro-caspase-3 en caspase-3 entraînant l'apoptose (Figure IV-4).

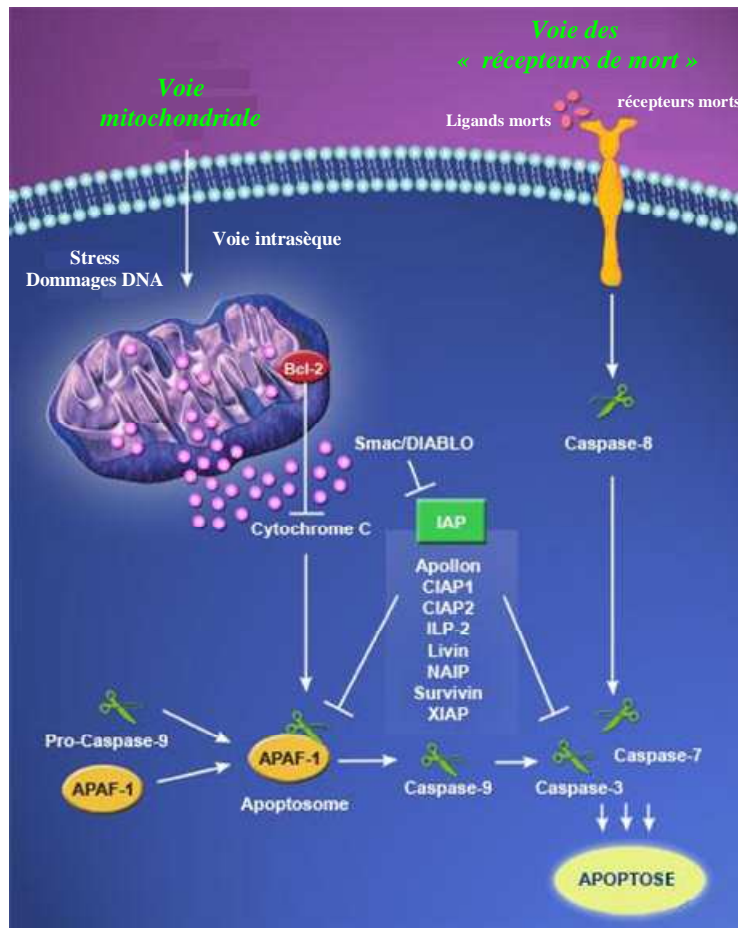


Figure IV-4 : les deux principales voies d'activation de l'apoptose

2-2 Les dommages cellulaires indirects

L'effet le plus rapidement détectable *in vivo* après la PDT est de nature vasculaire. En effet, quelques minutes après l'irradiation, d'importants changements vasculaires sont notés autour de la tumeur, induisant une privation de la tumeur en oxygène qui conduit à la mort des cellules tumorales par asphyxie.

2-3 Résultats

Nous avons étudié l'efficacité des différentes tétrabenzoporphyrines tétrapolyaminées et tétraglucosylées, selon le protocole décrit dans la partie expérimentale (Chapitre V-4). Ce test consiste à comparer leur effet en terme de toxicité cellulaire par rapport à une molécule de référence : le Photofrin®.

L'obtention de doses réponses (Figure IV-5 et figure IV-6) nous a permis de déterminer graphiquement la valeur IC₅₀ (Figure IV-7) pour chaque molécule sur les deux lignées cellulaires étudiées : HaCaT et MCF-7.

Pour la tétrabenzoporphyrine tétraspermidinée (**16**), l'étude de sa cytotoxicité n'a pu être réalisée en raison de son manque de solubilité en milieux aqueux avec ou sans DMSO.

Dans le cas de la lignée MCF-7, les résultats obtenus montrent que toutes les autres molécules testées s'avèrent significativement moins efficaces que le Photofrin[®]. En effet, la mort de 50% des cellules dans nos conditions de culture est induite dans tous les cas pour des concentrations supérieures à 1380 ng/mL obtenue après traitement avec le Photofrin[®] (Figure IV-5 et figure IV-7).

En ce qui concerne la lignée HaCaT, les résultats nous permettent de faire le même constat puisque toutes les tétrabenzoporphyrines possèdent une valeur de l'IC₅₀ supérieure à celle du Photofrin[®], qui pour cette lignée s'élève à 123 ng/mL (Figure IV-6 et figure IV-7).

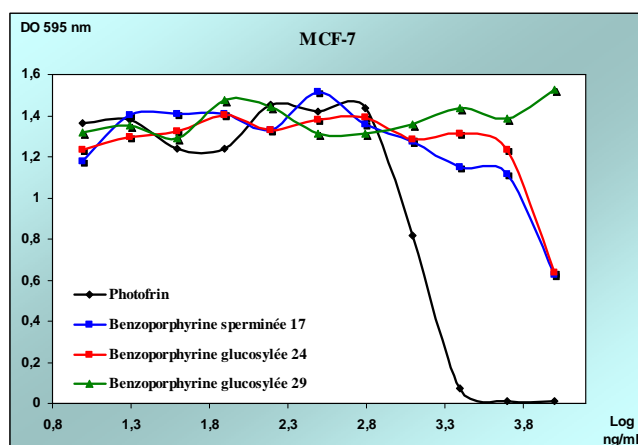


Figure IV-5 : Test de viabilité cellulaire sur la lignée MCF-7

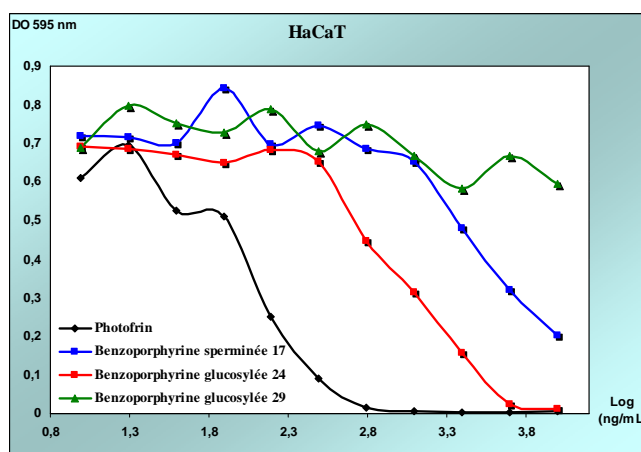


Figure IV-6: Test de viabilité cellulaire sur la lignée HaCaT

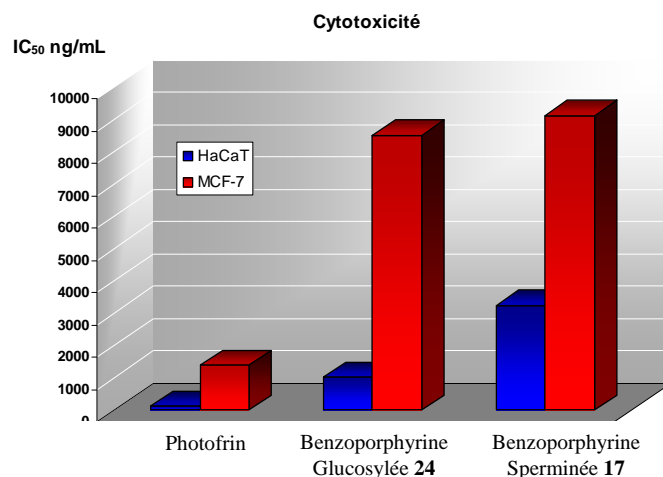


Figure IV-7 : IC₅₀ des différents photosensibilisateurs sur les lignée HaCaT et MCF-7

3. Conclusions

Toutes les benzoporphyrines ont montré leur aptitude à produire de l'oxygène singulet. Par la suite, des tests préliminaires d'évaluation de l'activité photocytotoxique de ces molécules (test MTT) ont été réalisés sur deux lignés cellulaires HaCaT et MCF7. Les premiers résultats ont montré que les benzoporphyrines possèdent une activité moins forte que le Photofrin[®] utilisé comme référence. Toutefois d'autres essais devront être réalisés afin de confirmer ces résultats. Néanmoins, la faible phototoxicité observée pour les benzoporphyrines polyaminées pourrait être attribuée à une solubilité partielle de nos composés en milieu biologique. En ce qui concerne les benzoporphyrines glucosylées, une modulation du nombre d'unités osidiques sur le macrocycle permettrait d'envisager une meilleure activité en PDT. Enfin, l'utilisation d'une lumière possédant une longueur d'onde bien spécifique, vers le rouge, devrait augmenter l'efficacité de nos photosensibilisateurs.

Conclusions générales et perspectives

Au cours de ce travail, nous nous sommes donc intéressés à la conception et à l'évaluation biologique de composés benzopyrroliques vectorisés afin d'augmenter leur sélectivité et par conséquent leur efficacité. Ainsi, nous avons pu accéder pour la première fois à des structures tétrabenzoporphyriniques polyaminées et glucosylées. Elles ont été obtenues suivant deux approches distinctes ; la fixation du vecteur glucidique ou polyaminé sur ces colorants a pu être effectuée soit en fin de synthèse sur le précurseur macrocyclique, soit dans la phase initiale de la synthèse sur le synthon aldéhydique. Cette dernière approche ouvre des perspectives intéressantes pour l'élaboration de nouvelles benzoporphyrines asymétriques fonctionnalisées ne pouvant être obtenues selon les méthodes couramment utilisées. Par la suite, nous envisageons l'utilisation d'une technologie innovante mise en place au laboratoire qui permet la synthèse sans solvant de porphyrines. Cette méthode basée sur l'utilisation de charbon actif comme promoteur acide pourrait permettre d'apporter de nouvelles perspectives à la synthèse benzoporphyrinique.

Des premiers tests de viabilité cellulaires, *in vitro*, sur deux lignées cancéreuses humaines (MCF-7 et HaCaT) ont été effectués. Bien que tous les produits finaux induisent une production d'oxygène singulet en présence de lumière visible, ils se sont révélés décevants car peu actifs pour la destruction des cellules cancéreuses. Ces résultats illustrent le fait que la production d'oxygène singulet n'est pas le seul paramètre qui intervient dans ce phénomène. En effet, l'analyse détaillée de la littérature montre que d'autres facteurs tels que l'adressage et la pénétration cellulaire, l'approche de l'ADN, le coefficient de partage, ..., participent à l'induction de la mort cellulaire par des agents photocytotoxiques, et sont actuellement en cours d'étude dans notre laboratoire. Nous avons pu ainsi constater que le caractère amphiphile d'un photosensibilisateur est une propriété qui peut être décisive pour son activité photocytotoxique. En effet ce paramètre conditionne la capacité qu'a cette molécule à traverser les membranes cellulaires. Ainsi, sur le plan prospectif, nous prévoyons d'augmenter le caractère hydrophile de nos agents photosensibles. Pour cela, nous pensons fonctionnaliser nos benzoporphyrines polyaminées sur les positions benzopyrroliques par des groupements sulfonates. Nous envisageons également l'élaboration de nouvelles benzoporphyrines glucosylées en faisant varier la nature et la distribution des groupements glucidiques, pour obtenir un éventail plus large de photosensibilisateurs. Cette multiplication du nombre de composés devrait permettre par la suite d'établir une relation structure activité entre ces diverses molécules afin d'obtenir le meilleur candidat pour une utilisation en PDT. Un autre axe de recherche envisagé, permettant d'améliorer l'adressage cellulaire, est la

conception de nouveaux composés benzopyrroliques vectorisés par d'autres agents de ciblage. Parmi eux, nous pouvons citer le motif RGD qui permet de vectoriser spécifiquement ces composés vers la néovascularisation tumorale, mais également des transporteurs protéiques comme l'albumine et des lipoprotéines, ainsi que des motifs pouvant induire une augmentation de l'activité photodynamique comme l'estradiol, l'EGF ou l'insuline.

Chapitre V

Parie expérimentale

1. Réactifs et solvants

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

Tableau V-1 : Réactifs et solvants

Réactifs et solvants	Origines
1-hydroxybenzotriazole (H ₂ O<5%)	Acros
1-nitro-cyclohexène	Aldrich
2,2'-(éthylènedioxy)-bis-(éthylamine)	VWR
2,3-dichloro-5,6-dicyano- <i>p</i> -benzoquinone	Aldrich
4-carboxyméthylbenzaldéhyde 99%	Acros
Acétate d'éthyle 99%	SDS
Acétate de cuivre	Prolabo
Acétate de zinc	Acros
Acétone	Elvetec
Acétonitrile 99,7%	SDS
Acide acétique 99,8%	Fisher
Acide bromhydrique (33% dans AcOH)	Acros
Acide chlorhydrique 35%	Fisher
Acide sulfurique	Prolabo
Boc-ON 99%	Aldrich
BPE	Gibco
Carbonate de potassium (séché 24h à l'étuve à 100°C)	Aldrich
Chloroforme 99,9%	SDS
Dichlorométhane 99,8%	SDS
Dicyclohexylcarbodiimide 99%	Acros
Diméthylformamide 99,5%	SDS
Ethanol absolu	Elvetec
Ether de pétrole 40-65°C	SDS
Ether diisopropylique	Acros
Ethylène glycol	SDS
Glucose <i>peracétylé</i>	Acros
Heptane	VWR
Hydrazine monohydrate 98%	Aldrich
Hydrogénocarbonate de sodium 99%	Prolabo
Hydroxyde de potassium	Acros
Hydroxyde de sodium	Acros
Isocynoacétate d'éthyle	Lancaster
K-SFM	Gibco
L-glutamine	Eurobio
MEM	Eurobio
Méthanol	Fisher

Méthylate de sodium	Aldrich
MTT	promega
N-4-bromobutylphtalimide 98%	Acros
NeAA	Eurobio
pénicilline/streptomycine	Eurobio
Phosphate Buffer Saline	Sigma
pyruvate de sodium	Eurobio
rEGF	Gibco
Résine acide Amberlite IRN-77	Prolabo
Résine basique Dowex 1x8-50	Acros
Spermidine 99%	Aldrich
Spermine 99%	Fluka
Sulfate de magnésium	SDS
SVF	Eurobio
Tert-butylate de potassium	Aldrich
Tétrahydrofurane 99,9%	Acros
Triéthylamine 99,5%	SDS
Trifluorure de bore diéthyle ether	Aldrich
Trypsine-EDTA	Eurobio
δ-lactone	Dr. Y. Queneau UMR 5246 Lyon

2. Mesures physiques

2-1 Ultraviolet-visible (UV)

Les spectres ont été réalisés sur un spectrophotomètre UV-visible Perkin Elmer Lambda 25. Tous les spectres sont effectués dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet optique à une concentration voisine de 10^{-5} - 10^{-6} M dans le chloroforme pour les produits protégés et dans le méthanol pour le produits déprotégés. Les longueurs d'onde correspondantes aux absorbances maximales sont exprimées en nm et les coefficients d'absorption molaire (ϵ) en $\text{mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2-2 Infra-rouge (IR)

Les spectres IR sont réalisés sur un appareil Perkin Elmer FT-IR spectrometer-SPECTRUM 1000 sur des échantillons conditionnés en pastilles de KBr ou sous forme de dépôt entre deux pastilles de KBr (25x4 mm). Les longueurs d'onde sont mesurées en cm^{-1} .

2-1 Les températures de fusion (T_F°)

Les températures de fusion sont mesurées en tubes capillaires sur un appareil Electrothermal IA9100.

2-2 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Brücker DPX avec une fréquence de 400,13 MHz pour le proton et de 100,62 MHz pour le carbone 13 à l'Université de Limoges. Les déplacements (δ) sont exprimés en ppm en prenant le tétraméthylsilane comme référence interne, les constantes de couplage sont mesurés en Hz. Les abréviations retenues sont : s (singulet), d (doublet), dd (double doublet), ddd (double double doublet), t (triplet), q (quadruplet), quint (quintuplet), m (multiplet). Les figures élargies comportent un "e" en indice.

2-3 Spectrométrie de masse MALDI

Les spectres de masse MALDI ont été effectués au Laboratoire de Chimie Structurale Organique et Biologique de l'Université de Paris VI par le Dr. Sandra Alves par désorption laser avec un spectromètre à temps de vol Voyager Elite.

2-4 Spectrométrie de masse Haute Résolution

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

2-5 Chromatographie

a) Chromatographie analytique sur couche mince

L'évolution des réactions ainsi que la pureté des produits sont contrôlés par CCM (silice déposée sur plaques d'aluminium alufolien : gel de silice 60 F254 Merck de 0,2 mm d'épaisseur). Certains des produits déprotégés sont, quant à eux, déposés sur plaques d'aluminium phase inverse RP-18 F254s Merck.

La révélation des plaques est assurée :

- soit par observation directe pour les composés colorés
- soit par UV pour les composés conjugués
- soit par vaporisation d'une solution de ninhydrine suivie d'un chauffage à 100°C pour les produits polyaminés
- soit par vaporisation d'une solution de fluorescéine dans le méthanol/eau (1/1), puis d'une solution aqueuse d'eau oxygénée à 30% dans l'acide acétique suivie d'un chauffage à 100°C pour les produits bromés
- soit par vaporisation d'une solution à 1% d'orcinol sulfurique dans l'acide sulfurique à 20% suivie d'un chauffage à 100°C dans le cas des glucides
- soit en combinant ces techniques

b) Chromatographie préparative

✓ *Chromatographie sur colonne*

Les différentes chromatographies ont été effectuées à partir de colonnes sèches. Nous avons utilisé des colonnes de silice (gel de silice MCL-CHROM, granulométrie : 15-40 µm Merck) de 4 cm de diamètre et de 20 à 30 cm de hauteur.

✓ *Chromatographie sur couche mince préparative*

Les chromatographies sur couche mince préparatives sont réalisées sur des plaques préparées au laboratoire à l'aide de 80g de silice (Kieselgel 60PF254 Merck) et de 220 mL d'eau que l'on dépose sur six plaques de verre (20 x 20 cm) puis celles-ci sont séchées à l'air libre pendant 15 heures et finalement activées à 110°C pendant deux heures.

3. Étude de la production d'oxygène singulet

Le système est constitué d'un bain thermostaté à 20°C dans lequel est inséré un tube à hémolyse contenant l'échantillon étudié à une concentration d'environ 10^{-5} M. L'ensemble est maintenu sous bullage d'air comprimé et sous un éclairage fourni par deux lampes de 100 W. Les résultats des tests de production d'oxygène singulet réalisés sur les composés polyaminés et glucosylés synthétisés sont qualitativement comparés par chromatographie sur couche mince à ceux obtenus pour l'hématoporphyrine qui est un producteur reconnu d'oxygène

singulet. Au cours de ces essais, l'acétate d'ergostérol est utilisé comme accepteur d'oxygène singulet afin de former l'endoperoxyde d'acétate d'ergostérol. L'analyse des produits formés met en évidence, après quinze minutes d'irradiation, la présence de l'endoperoxyde et donc la formation d'oxygène singulet pour tous les macrocycles testés.

4. Matériels et méthodes : tests biologiques

4-1 Culture cellulaire

Les cultures cellulaires sont réalisées dans des conditions stériles sous une hotte à flux laminaire verticale (ClanLAF[®], VFR 1206) et placées dans un incubateur (Innova[®], CO-48) à 37°C, 5% de CO₂ et en atmosphère humide. Les tests ont été effectués sur les lignées cellulaires HaCaT et MCF-7 :

- La lignée HaCaT est cultivée dans le milieu "Keratinocyte-Serum Free Medium" (K-SFM, invitrogen cell culture) supplémenté avec de l'extrait hypophysaire bovin (BPE) et du facteur de croissance épidermique recombinant (rEGF).
- La lignée MCF-7 est cultivée dans du milieu "Eagle's Minimum Essential Medium" avec des sels de Earls (MEM) supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 0,1 mM d'acides aminés non essentiels (NeAA), 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (SVF) et 10 mM de pyruvate de sodium.

Enfin, les milieux sont supplémentés avec un mélange d'antibiotiques P/S (pénicilline/streptomycine) respectivement à la concentration de 100 UI/mL et 100 µg/mL. Les cultures sont repiquées une fois par semaine, s'agissant de cellules adhérentes, celles-ci sont décrochées de leur support par ajout de 2 à 3 mL de Versène (trypsine-EDTA 1X), lavées par centrifugation 10 minutes à 400 g puisensemencées à raison de $2 \cdot 10^5$ cellules/mL dans des flacons à bouchons ventilés de 25 ou 75 cm². Entre deux repiquages, les cultures sont entretenues par changement du milieu tous les 2 à 3 jours.

4-2 Test de viabilité cellulaire

a) Principe

Le MTT ou bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium (Figure V-1) est une substance jaune sous sa forme oxydée. L'anneau de tétrazolium qu'il contient est réduit, par la succinate déshydrogénase mitochondriale des cellules vivantes, en cristaux de Formazan. Les cristaux sont dissous dans du DMSO produisant une coloration bleue-violacée. L'intensité de cette coloration mesurée à 595 nm est proportionnelle au nombre de cellules vivantes avec un métabolisme actif.

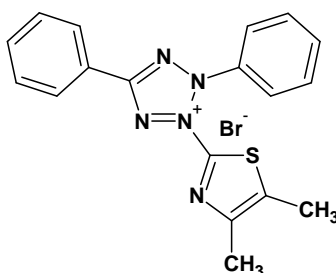


Figure V-1 : MTT

b) Mise en place du traitement photosensibilisateur

Les cellules HaCaT et MCF-7 sont mises en culture dans des plaques 96 puits à raison de 100 μ L de suspension cellulaire $5 \cdot 10^5$ cellules/mL et cultivées à 37°C et 5% de CO₂ afin qu'elles puissent adhérer au support et soient en phase exponentielle de croissance au moment du traitement. Après 48 heures les surnageants sont éliminés par aspiration et les photosensibilisateurs distribués en dupliques (100 μ L/puits) en effectuant des dilutions successives à partir de la dose de 10 000 ng/mL afin d'obtenir la gamme de concentration suivante : 10 000, 5 000, 2 500, 1 250, 625, 312, 156, 78, 39, 19 et 9 ng/mL.

c) Contrôles

Pour chaque expérience, sont prévus un contrôle sans photosensibilisateur (prolifération cellulaire normale) ainsi qu'un contrôle sans photosensibilisateur avec du milieu à 1% de diméthylformamide qui est utilisé comme solvant de certaines molécules photosensibilisatrices afin de quantifier une éventuelle toxicité ne relevant pas du traitement.

De plus, les contrôles sont effectués pour chaque photosensibilisateur et chaque lignée cellulaire en absence d'irradiation lumineuse.

d) Irradiation lumineuse

Après 24 heures de culture en présence de photosensibilisateur, les surnageants sont éliminés et le milieu est remplacé par 100 µL/puits de PBS stérile 1X (Phosphate Buffer Saline). Ensuite les cultures sont exposées à une lumière blanche pendant 2 heures à $5,5 \cdot 10^{-2}$ mW/cm².¹⁵⁸ Le PBS est ensuite remplacé par 100 µL/puits de milieu complet et les cultures incubées à nouveau pendant 24 heures.

e) Test MTT

Selon les recommandations du fabricant, chaque puits reçoit 15 µL de réactif MTT, puis les cultures sont incubées 3 heures à 37°C et 5% de CO₂. La réaction est arrêtée par addition de 100 µL de solution "stop" (DMSO). Les absorbances sont lues à 595 nm avec un lecteur de microplaques (Triad, Dynex technologies). À partir des résultats exprimés en fonction des concentrations en photosensibilisateur, il est possible de déterminer graphiquement l'indice de cytotoxicité IC₅₀ pour chaque molécule selon la lignée (concentration provoquant 50% de mortalité cellulaire).

f) Analyse statistique

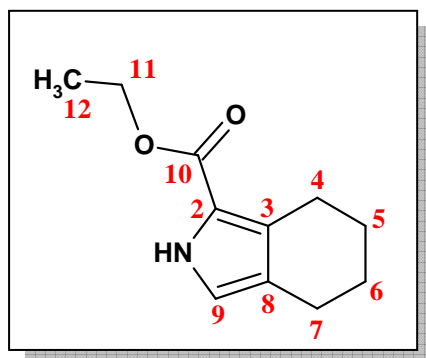
La significativité des résultats est éprouvée à l'aide du logiciel PAST version 1.7 (Paleontological Statistics Software package for Education and Data Analysis) avec le test de Kruskal-Wallis et correction de Bonferroni.¹⁵⁹

5. Synthèses

¹⁵⁸ S. Banfi, E. Curuso, S. Caprioli, L. Mazzagatti, G. Canti, R. Ravizza, M. Gariboldi, E. Monti; *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 4853-4860.

¹⁵⁹ O. Hammer, D. Harper, P. Ryan; *Past: paleontological statistics software package for education and data analysis paleontologia electronica*, **2001**, 4, 9.

2-éthoxycarbonyl-4,5,6,7-tétrahydroisindole (1)



L'isocynoacétate d'éthyle (2,3 mL, 20,9 mmol, 1,18 éq.), solubilisé dans 20 mL de THF anhydre, est ajouté à une solution de *tert*-butylate de potassium (2,32 g, 20,7 mmol, 1,17 éq.) dissous dans 20 mL de THF anhydre. Le mélange réactionnel est maintenu sous agitation à 0°C et sous argon durant 10 minutes. Puis, par un goutte-à-goutte, le 1-nitro-cyclohexène (2,0 mL, 17,7 mmol, 1 éq.) solubilisé dans 15 mL de THF anhydre est introduit au mélange réactionnel. Après 4 heures de réaction à température ambiante et sous argon, le solvant est évaporé sous pression réduite, puis le brut repris dans du CH₂Cl₂ est lavé à plusieurs reprises à l'eau (5x50 mL) et à l'eau salée (50 mL), séché sur sulfate de magnésium, filtré et le solvant évaporé sous pression réduite. Le brut réactionnel est chromatographié sur colonne de silice avec pour éluant un mélange CH₂Cl₂/THF (20/01). Après deux recristallisations dans l'heptane, l'ester tétrahydroisindole (1) est obtenu, sous forme de cristaux blancs, avec un rendement de 38 % (1,31 g, 6,78 mmol).

Aspect : cristaux blancs

Rf (CH₂Cl₂) = 0,35

SM Haute Résolution m/z = 216,23 [M+Na]⁺

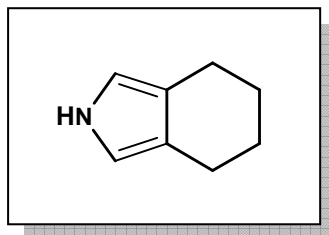
T_F = 83°C (litt.^{42c}) T_F=82-83°C

IR (cm⁻¹) (KBr) : 3285 (ν_{N-H}); 2924 (ν_{C-H asym.}); 2848 (ν_{C-H sym.}); 1663 (ν_{C=O Aromat.}); 1416 (ν_{C=C aromat.}); 1031 (ν_{C-N}); 775 (δ_{C-H aromat.})

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 8,81 (s_e, 1H, H₁); 6,64 (d, J=2,76 Hz, 1H, H₉); 4,29 (q, J=7,20 Hz, 2H, H₁₁); 2,81 (t, J=5,96 Hz, 2H, H₄); 2,54 (t, J=5,84 Hz, 2H, H₇); 1,74 (m, 4H, H₅₋₆); 1,34 (t, J=7,12 Hz, 3H, H₁₂)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ ppm : 149,6 (C₁₀); 115,7 (C₃); 109,4 (C₉); 106,8 (C₂); 105,2 (C₈); 47,3 (C₁₁); 11,0 (C₄); 10,8 (C₇); 9,5 (C₅₋₆); 2,1(C₁₂)

4,5,6,7-tétrahydroisoindole (2)



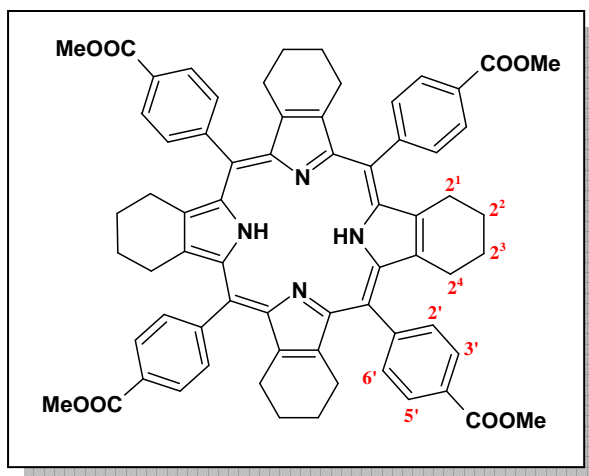
Un mélange d'ester tétrahydroisoindole (1) (864 mg, 4,47 mmol, 1 éq.) et d'hydroxyde de potassium (1,0 g, 17,8 mmol, 4 éq.) à 85% dans l'éthylène glycol (30 mL) est mis à réagir à reflux (145°C), sous agitation, à l'abri de la lumière et sous argon pendant 1 heure. Le mélange réactionnel est ensuite refroidit au voisinage de 0°C, puis le produit est extrait par ajout de 30 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée à l'eau (1x20 mL), puis séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, et diluée dans environ 600 mL de CH₂Cl₂. Le vial de récupération est mis sous argon et à l'abri de la lumière. Le 4,5,6,7-tétrahydroisoindole (2) étant instable, à la lumière et en présence d'oxygène, est directement utilisé tel quel pour l'étape suivante.

Aspect : solution jaune clair dans le CH₂Cl₂

Rf (CH₂Cl₂) = 0,82

IR (cm⁻¹) (KBr) : 3352 (ν_{N-H}); 2923 (ν_{C-H asym.}); 2838 (ν_{C-H sym.}); 1439 (ν_{C=C aromat.}); 1055 (ν_{C-N}); 770 (δ_{C-H aromat.})

5,10,15,20-tétrakis-(4-carboxyméthylphényl)-tétracyclohexènoporphyrine (3)



La réaction se déroule à l'abri de la lumière et sous argon. Le 4-carboxyméthylbenzaldehyde (380 mg, 4,62 mmol, 1 éq.) est ajouté à une solution de tétrahydroisoindeole (2) (provenant de 864 mg du composé 1 (4,47 mmol, 1 éq.)) déjà solubilisée dans 600 mL de CH₂Cl₂. Après environ 10 minutes d'agitation le BF₃.Et₂O (90 µL, 0,71 mmol, 0,15 éq.) est additionné par un goutte-à-goutte au mélange réactionnel, puis la solution est agitée pendant 2 heures. Ensuite le 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*p*-benzoquinone (DDQ) (1,02 g, 4,50 mmol, 1 éq.) est additionné au mélange réactionnel, et la solution est laissée sous agitation durant 1 heure. A la fin de la réaction, le solvant est évaporé, et le brut repris dans 100 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est neutralisée et lavée à plusieurs reprises (H₂O (5x50 mL); H₂O/Na₂CO₃(10%) (1x50 mL); H₂O/K₂CO₃(10%) (1x50 mL); H₂O/HCl(5%) (1x50 mL) et H₂O,NaCl (1x50 mL)). Enfin la phase organique est séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et le solvant évaporé. Après purification sur colonne de silice (CH₂Cl₂/EtOH de 97/03 à 90/10) le composé 3 est obtenu avec une masse de 500 mg (0,47 mmol, Rdt = 42% sur les deux étapes).

Aspect : poudre verte

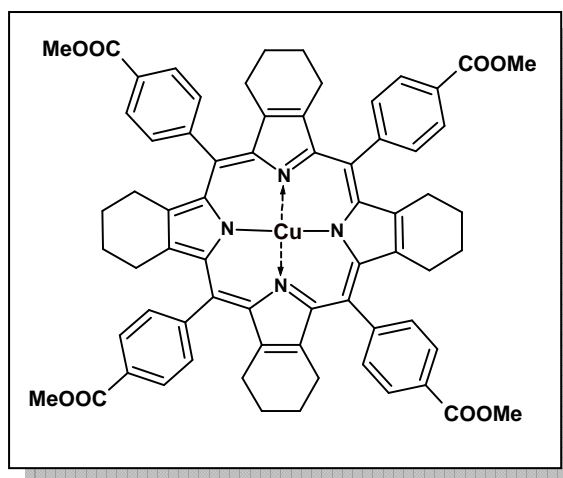
Rf (CHCl₃/Ether de pétrole 60/40) = 0,66

SM (MALDI) m/z = 1063,460 [M+H]⁺

UV : λ_{max} nm (ε.10⁻³) (CH₂Cl₃) : 473 (257,7); 617 (21,4); 674 (33,6)

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 8,38 (d, J=7,96 Hz, 8H, H_{3'-5'}); 8,26 (d, J=7,96 Hz, 8H, H_{2'-6'}); 4,11 (s, 12H, H_{Me}); 2,2-2,4 (m, 16H, H_{2¹-2⁴}); 1,2-1,6 (m, 16H, H_{2²-2³}); -2,3 (s_e, 2H, H_{NH})

5,10,15,20-tétrakis-(4-carboxyméthylphényl)-tétracyclohexènoporphyrine de cuivre (4)



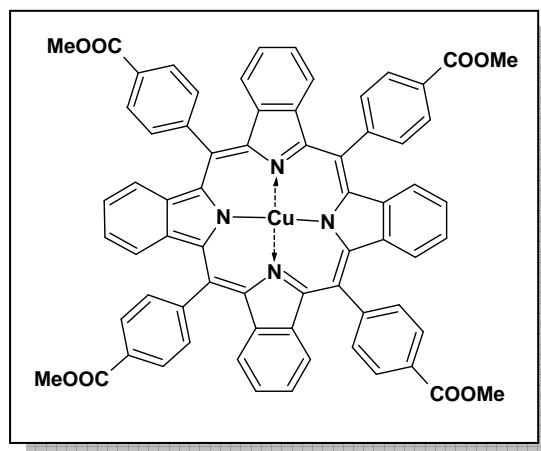
La $\text{Ph}_4\text{TCHP}(\text{CO}_2\text{Me})_4$ (**3**) (500 mg, 0,47 mmol, 1 éq.) est solubilisée dans 100 mL d'un mélange de solvant ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (9/1). Puis 240 mg d'acétate de cuivre (1,20 mmol, 2,5 éq.) sont ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est agité durant 1 heure et suivit par contrôle UV. Après la métallation, la solution change de couleur passant du vert au rouge. La phase organique est ensuite lavée à plusieurs reprises ($\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}_{(10\%)}$ (1x50 mL), $\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_{3(10\%)}$ (1x50 mL), et H_2O (1x100 mL)), puis séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, et le solvant évaporé. Une purification sur colonne de silice (éluant : CH_2Cl_2) permet d'obtenir la tétracyclohexènoporphyrine métallée par le cuivre (**4**) avec une masse de 449,9 mg (0,40 mmol, Rdt = 85%).

Aspect : poudre rouge-rouille

Rf (CH_2Cl_2) = 0,36

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (CHCl_3) : 429 (177,8); 560 (17,8); 597 (12,6)

5,10,15,20-tétrakis-(4-carboxyméthylphényl)-tétrabenzoporphyrine de cuivre (5)



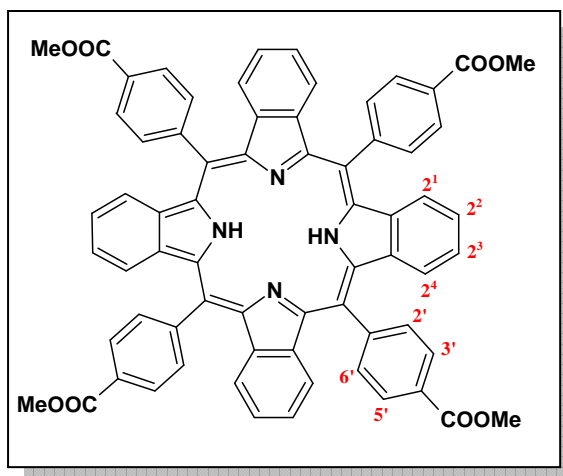
La Cu-Ph₄TCHP(CO₂Me)₄ (**4**) (449,9 mg, 0,40 mmol, 1 éq.) est solubilisée dans 700 mL de THF anhydre, puis 1,8 g de DDQ (7,93 mmol, 19 éq.) sont ajoutés. Le mélange est porté à reflux (80°C) sous argon et à l'abri de la lumière pendant 1 heure. Après oxydation la solution passe de la couleur rouge à la couleur verte. Sous pression réduite, le solvant est évaporé et le brut repris dans du CH₂Cl₂ (V=50 mL). Puis la phase organique est lavée à plusieurs reprises avec une solution d'H₂O/K₂CO₃(10%) (2x25 mL) et d'H₂O (1x50 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporé. La masse brut obtenue est de 661 mg. Une purification sur colonne est réalisée avec pour éluant un gradient de solvant allant du CH₂Cl₂ au mélange CH₂Cl₂/THF 98/02. Le composé **5** est obtenu avec une masse de 190 mg (0,172 mmol, Rdt% = 43).

Aspect : poudre verte

Rf (CH₂Cl₂) = 0,85

UV : λ_{\max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (CH₂Cl₂/EtOH) (90/10) : 447 (169,8); 602 (15,5); 650 (72,4)

5,10,15,20-tétrakis-(4-carboxyméthylphényl)-tétrabenzoporphyrine (6)



La Cu-Ph₄TBP(CO₂Me)₄ (**5**) (190 mg, 0,172 mmol, 1éq.) est démétallée par ajout d'environ 50 mL d'acide sulfurique concentré et cette solution est laissée sous agitation pendant 1 heure à température ambiante et à l'abri de la lumière. Lors de la démétallation, la solution change de couleur passant du vert au rouge. L'avancement de la réaction est suivi par U.V. Après disparition du produit métallé, le mélange réactionnel est dilué lentement dans environ 50 mL de MeOH, puis refroidit (bain de glace). Après addition de 70 mL de CH₂Cl₂, la phase organique est lavée à plusieurs reprises avec de l'H₂O (3x25 mL), H₂O/NaHCO₃(10%) (1x50 mL), H₂O (1x50 mL), puis séchée, filtrée, et le solvant évaporé sous pression réduite. Après purification sur plaques préparatives de gel de silice (CH₂Cl₂/THF 95/05), la tétrabenzoporphyrine **6** est obtenue avec une masse de 135 mg (0,129 mmol, Rdt% = 75).

Aspect : poudre verte

Rf (CHCl₃) = 0,53

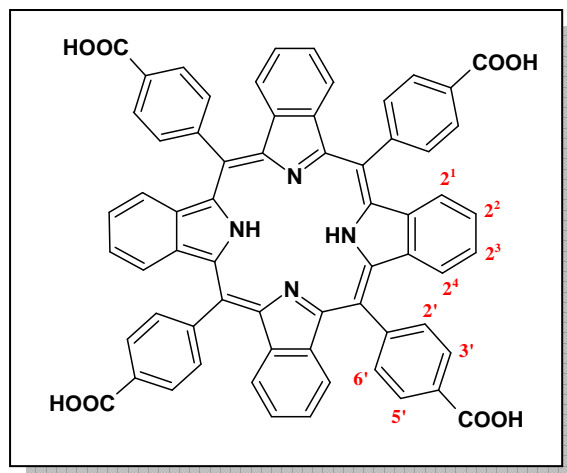
SM (MALDI) m/z = 1046,46

UV : λ_{max} nm (ε.10⁻³) (CHCl₃) : 468 (484,4); 598 (42,1); 646 (74,8); 701 (37,6)

RMN ¹H (CDCl₃) δ ppm : 8,55 (d, J=7,96 Hz, 8H, H_{3'-5'}); 8,47 (d, J=8,00 Hz, 8H, H_{2'-6'});

7,25 (s, 16H, H_{2¹-2²-2³-2⁴}); 4,16 (s, 12H, H_{Me}); -1,09 (s_e, 2H, H_{NH})

5,10,15,20-tétrakis-(4-carboxyphényl)-tétrabenzoporphyrine (7)



Dans un ballon (V=100 mL) 135 mg de composé **6** (0,129 mmol, 1 éq.) sont solubilisés dans 30 mL de DMF et 20 mL d'une solution de KOH dans l'EtOH (1M, 20 mmol, 1,5 éq.) sont ajoutés. La réaction est maintenue à reflux jusqu'à précipitation du produit désiré. Le mélange est alors refroidit et le solvant évaporé. Le brut est repris dans le MeOH et la solution est neutralisée par une résine acide. De nouveau le produit précipite. Après filtration, 110 mg de composé **7** sont ainsi obtenu (Rdt % = 86).

Aspect : poudre verte

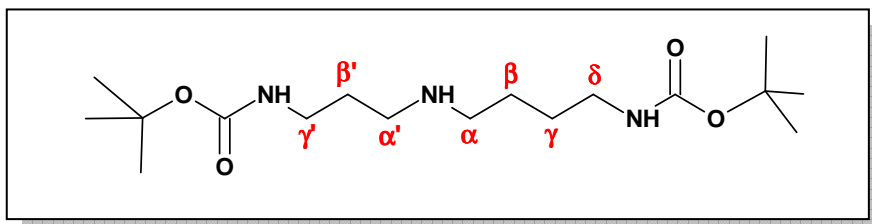
Rf (CH₃CN/H₂O 7/3 + 1% de TFA) = 0,64

SM (MALDI) m/z = 991,553 [M+H]⁺

UV : λ_{\max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (DMF) : 468 (303,7); 592 (22,9); 642 (40,4); 698 (15,2)

RMN ¹H (DMF) δ ppm : 13,77 (s_e, 4H, H_{COOH}); 8,64 (d, J=7,00 Hz, 8H, H_{3'-5'}); 8,57 (d, J=7,44 Hz, 8H, H_{2'-6'}); 7,33 (s_e, 8H, H_{2¹⁻²4}); 7,21 (s_e, 8H, H_{2²⁻²3}); -0,69 (s_e, 2H, H_{NH})

***N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspermidine (8)**



Dans un bicol (V=100 mL) placé dans un bain de glace, sous atmosphère d'argon et sous agitation, 2 mL de spermidine (12,7 mmol, 1 éq.) sont placés dans 30 mL de THF anhydre en présence de 5,33 mL de Et₃N (38,1 mmol, 3 éq.). Puis 6,27 g de Boc-ON (25,5 mmol, 2 éq.) sont introduit, en solution dans le THF anhydre (V=10 mL), sous forme de goutte-à-goutte au mélange réactionnel et la réaction est suivie par CCM (AcOEt/acétone/eau/CH₃COOH : 5/3/1/1). Après 18 heures de réaction, le THF est évaporé. Le produit est solubilisé dans 80 mL de CH₂Cl₂ et la phase organique est traitée avec 100 mL d'une solution de soude à 1% puis lavée à l'eau (3x150 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée. Le mélange obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice en utilisant un mélange d'éluant EtOH + 0,5% NH₄OH. Le composé **8** est obtenu sous forme de cristaux avec un rendement de 67% (2,93 g, 8,48 mmol).

Aspect : cristaux blanc

R_f (AcOEt/acétone/eau/CH₃COOH : 5/3/1/1) = 0,56

T_f = 80°C (litt.¹⁶⁰ T_f = 79-80°C)

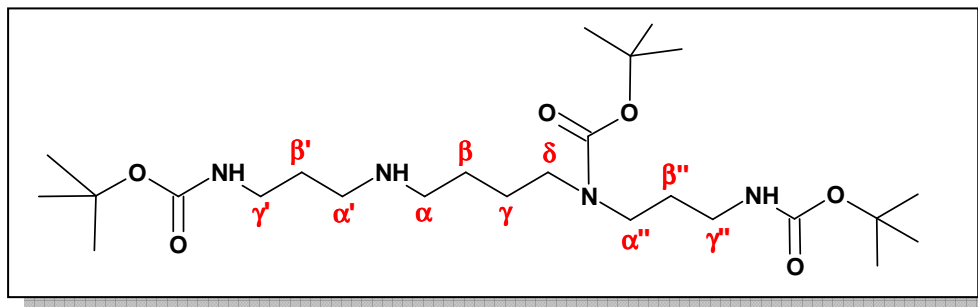
IR (cm⁻¹) (KBr) : 3373 (ν_{N-H} Second.), 2977 (ν_{N-H} amide), 2929 (ν_{Csp³-H}), 1685 (ν_{C=O}), 1165 (ν_{C-N})

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 5,26 (br s, 1H, H_{NHBoc}); 4,90 (s, 1H, H_{NHBoc}); 3,19 (quad., J=6,0 Hz, 2H, H_{γ'}); 3,12 (quad., J=5,9 Hz, 2H, H_δ); 2,65 (t, J=6,6 Hz, 2H, H_{α'}); 2,60 (t, J=6,6 Hz, 2H, H_α); 1,65 (quint., J=6,6 Hz, 2H, H_{β'}); 1,52 (quint., J=6,5 Hz, 2H, H_γ); 1,50 (quint., J=6,5 Hz, 2H, H_β); 1,44 (s, 18H, H_{CH₃ Boc})

RMN ¹³C (CDCl₃) δ en ppm : 156,15 (C_{CO}); 156,05 (C_{CO}); 78,93 (C_{C(CH₃)₃}); 49,45 (C_{CH₂α}); 47,75 (C_{CH₂α'}); 40,45 (C_{CH₂δ}); 39,25 (C_{CH₂γ'}); 29,89 (C_{CH₂β'}); 28,45 (C_{C(CH₃)₃}); 27,85 (C_{CH₂β}); 27,39 (C_{CH₂γ})

¹⁶⁰ Nagarajan, S.; Ganem, B. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5725-5737.

N^1, N^8, N^{12} -tris-*tert*-butoxycarbonylspermine (9)



Ce composé est synthétisé selon la méthode décrite pour le produit **8**. En partant de spermine (14,8 mmol, 1 éq.) dans 50 mL de THF anhydre en présence de 8,30 mL de Et₃N (59,3 mmol, 4 éq.) et de 10,95 g de Boc-ON (44,5 mmol, 3 éq.) en solution dans 40 mL de THF anhydre. Après 18 heures de réaction, le composé souhaité **9** est obtenu avec un rendement de 62% (4,64 g, 9,23 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

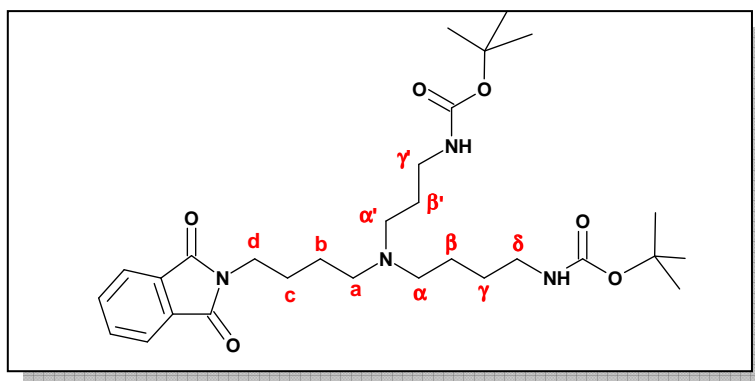
R_f (AcOEt/acétone/eau/CH₃COOH : 5/3/1/1) = 0,58

IR (cm⁻¹) (KBr) : 3348 (ν_{N-H} Secondaire), 2976 (ν_{N-H} amide), 2932 (ν_{Csp³-H}), 1693 (ν_{C=O}), 1520 (ν_{C=O}), 1172 (ν_{C-N})

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 5,31 (s, 1H, H_{NHBoc}); 5,11 (s, 1H, H_{NHBoc}); 3,24 (m, 2H, H_{α''}); 3,20 (m, 2H, H_{γ''}); 3,14 (m, 2H, H_δ); 3,10 (m, 2H, H_{γ'}); 2,66 (t, J=6,8 Hz, 2H, H_{α'}); 2,60 (t, J=6,9 Hz, 2H, H_α); 1,65 (m, 4H, H_{β'} et H_{β''}); 1,55 (m, 2H, H_β ou H_γ); 1,46 (m, 2H, H_β ou H_γ); 1,44 (s, 27H, H_{CH₃ Boc})

RMN ¹³C (CDCl₃) δ en ppm : 156,13 (C_{CO}); 155,98 (C_{CO}); 155,44 (C_{CO}); 79,74 (C_q(CH₃)₃); 79,45 (C_q(CH₃)₃); 78,93 (C_q(CH₃)₃); 49,63 (C_{CH₂α}); 47,71 (C_{CH₂α'}); 46,80 (C_{CH₂δ}); 43,93 (C_{CH₂α''}); 39,17 (C_{CH₂γ''}); 37,45 (C_{CH₂γ'}); 29,96 (C_{CH₂β'} ou C_{CH₂β''}); 29,25 (C_{CH₂β'} ou C_{CH₂β''}); 28,45 (C_C(CH₃)₃); 27,85 (C_{CH₂β} ou C_{CH₂γ}); 26,45 (C_{CH₂β} ou C_{CH₂γ})

***N*⁴-(4-phthalimidobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspermidine (10)**



A température ambiante et sous agitation, dans un ballon (50 mL) surmonté d'un réfrigérant, 1,1 g du composé **8** (3,22 mmol, 1 éq.) est dissous dans 24 mL de CH₃CN en présence de 1,14 g *N*-(4-bromobutyl)-phthalimide (4,03 mmol, 1,3 éq) et de 2,24 g de K₂CO₃ (16,1 mmol, 5 éq.). Le mélange est porté à reflux (86°C) et la réaction est suivie par CCM (CHCl₃/MeOH : 94/6). Après 18 heures de réaction, l'acétonitrile est évaporé puis le produit est solubilisé dans 60 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est lavée avec 100 mL d'une solution saturée de NaHCO₃ puis à l'eau (2x100 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée puis évaporée. Le mélange obtenu est purifié par chromatographie sur colonne de silice (CH₂Cl₂/ MeOH : 98/2). Le produit désiré **10** est isolé avec un rendement 90% (1,59 g, 2,90 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

R_f (CHCl₃/MeOH : 94/6) = 0,46

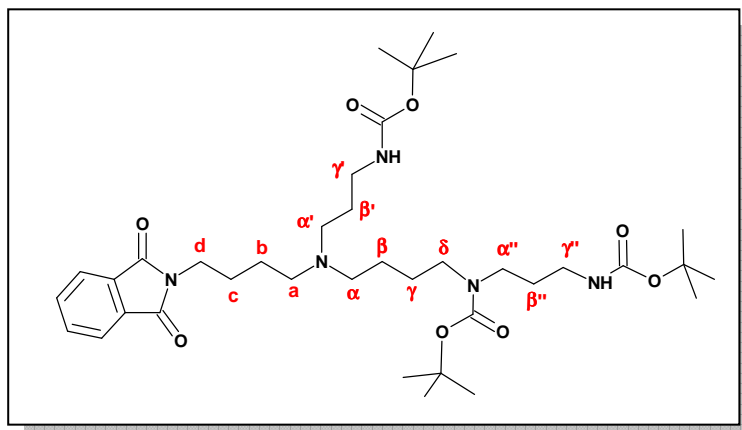
SM Haute Résolution : m/z = 547,3496 [M+H]⁺

IR (cm⁻¹) (KBr) : 3354 (ν_{N-H} Secondaire), 2975 (ν_{N-H} amide), 2932 (ν_{Csp₃-H}), 1772 (ν_{C=O}), 1713 (ν_{C=O}), 1170 (ν_{C-N})

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 7,84 (dd, J=3,1 Hz et J=5,1 Hz, 2H, H_{3,4 Ar}); 7,71 (dd, J=3,1 Hz et J=5,1 Hz, 2H, H_{2,5 Ar}); 5,34 (s, 1H, H_{NHBoc}); 4,91 (s, 1H, H_{NHBoc}); 3,70 (t, J=7,2 Hz, 2H, H_d); 3,14 (m, 4H, H_{γ'} et H_δ); 2,44 (m, 6H, H_α, H_{α'} et H_α); 1,71 (quint., J=7,2 Hz, 2H, H_c); 1,63 (quint., J=7,2 Hz, 2H, H_b); 1,48 (m, 6H, H_β, H_γ et H_{β'}); 1,44 (s, 18H, H_{CH₃ Boc})

RMN ¹³C (CDCl₃) δ en ppm : 168,38 (C_{CO}); 156,08 (C_{CO}); 133,41 (C_{CH(3-4 Ar)}); 132,14 (C_{CH(2-5 Ar)}); 123,70 (C_{C(1-6 Ar)}); 79,46 (C_{C(CH₃)₃}); 78,74 (C_{C(CH₃)₃}); 53,64-53,27-52,25 (C_{CH₂α}, C_{CH₂α'} et C_{CH₂α}); 40,51 (C_{CH₂δ}); 39,85 (C_{CH₂γ'}); 37,83 (C_{CH₂d}); 29,69 (C_{CH₂β'}); 28,46 (C_{C(CH₃)₃}); 26,89 (C_{CH₂b}); 26,47 (C_{CH₂c}); 24,45 (C_{CH₂β}); 23,98 (C_{CH₂γ})

***N*⁴-(4-phthalimidobutyl)-*N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butoxycarbonylspermine (11)**



Les mêmes méthodes de synthèse et de purification que pour le produit **10** sont utilisées pour cette réaction. Le composé **11** est obtenu sous forme d'huile avec 91% de rendement (1,40 g, 1,98 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

R_f (CHCl₃/MeOH : 93/7) = 0,48

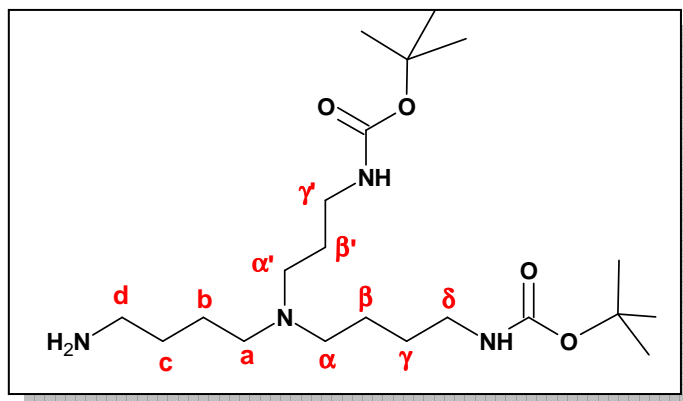
SM Haute Résolution : m/z = 704,4592 [M+H]⁺

IR (cm⁻¹) (KBr) : 3356 (ν_{N-H} Secondaire), 2974 (ν_{N-H} amide), 2935 (ν_{Csp³-H}), 1771 (ν_{C=O}), 1711 (ν_{C=O}), 1171 (ν_{C-N})

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 7,84 (dd, J=3,1 Hz et J=5,4 Hz, 2H, H_{3,4 Ar}); 7,71 (dd, J=3,1 Hz et J=5,4 Hz, 2H, H_{2,5 Ar}); 5,40 (s, 1H, H_{NHBoc}); 4,91 (s, 1H, H_{NHBoc}); 3,70 (t, J=7,2 Hz, 2H, H_d); 3,24 (m, 2H, H_{α''}); 3,15 (m, 2H, H_{γ''}); 3,12 (m, 2H, H_{γ'}); 3,10 (m, 2H, H_δ); 2,39 (m, 6H, H_α, H_{α'} et H_a); 1,68 (m, 4H, H_b et H_c); 1,59 (m, 2H, H_{β''}); 1,48 (m, 6H, H_β, H_γ et H_{β'}); 1,44 (s, 27H, H_{CH₃ Boc})

RMN ¹³C (CDCl₃) δ en ppm : 168,42 (C_{CO}); 156,04 (C_{CO}); 133,91 (C_{CH(3-4 Ar)}); 132,14 (C_{CH(2-5 Ar)}); 123,20 (C_{C(1-6 Ar)}); 79,46 (C_{CH₃}); 78,74 (C_{CH₃}); 77,22 (C_{CH₃}); 53,74-53,37-52,58 (C_{CH_{2α}}, C_{CH_{2α'}} et C_{CH_{2a}}); 46,91 (C_{CH_{2δ}}); 43,93 (C_{CH_{2α''}}); 43,13 (C_{CH_{2γ''}}); 39,87 (C_{CH_{2γ'}}); 37,83 (C_{CH_{2a}}); 28,47 (C_{CH₃}); 28,39-28,27 (C_{CH_{2b}} et C_{CH_{2c}}); 27,04-26,48-25,99-24,33 (C_{CH_{2β}}, C_{CH_{2β'}}, C_{CH_{2β''}} et C_{CH_{2γ}})

***N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸-bis-*tert*-butoxycarbonylspermidine (12)**



Dans un ballon (V=100 mL), surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à CaCl₂, 3,87 g du composé **10** (7,08 mmol, 1 éq.) sont dissous dans 40 mL d'une solution THF/EtOH (8/2) en présence de 17,2 mL d'hydrazine monohydrate (0,35 mol, 50 éq.). La réaction est laissée 5 heures à 90°C puis 18 heures à 50°C et est suivie par CCM (MeOH + 5% NH₄OH). Après 24 heures de réaction, le solvant est évaporé et le produit est solubilisé dans 100 mL de CH₂Cl₂. La phase organique est traitée avec 150 mL d'une solution de NaOH à 2%, lavée à l'eau (3x100 mL), séchée sur sulfate de magnésium. Après évaporation, le produit **12** est obtenu sous forme d'huile avec un rendement de 83% (2,46 g, 5,90 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

R_f (MeOH + 5% NH₄OH) = 0,42

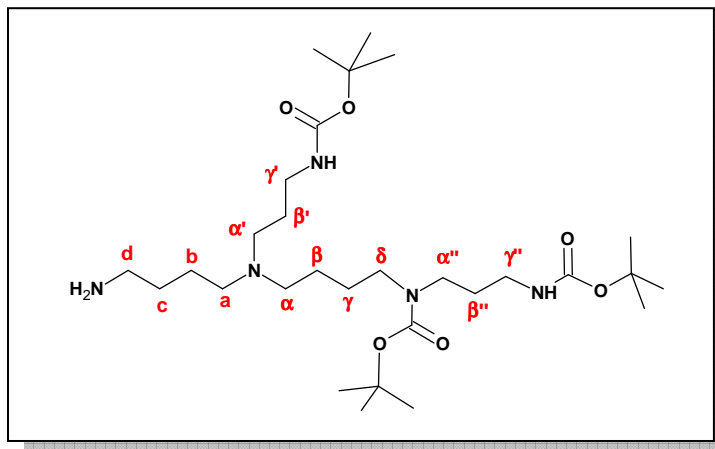
SM Haute Résolution : m/z = 417,3440 [M+H]⁺

IR (cm⁻¹) (KBr) : 3347 (ν_{N-H} Second.), 2974 (ν_{N-H} amide), 2933 (ν_{Csp³-H}), 1693 (ν_{C-O}), 1173 (ν_{C-N})

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 5,53 (s, 1H, H_{NHBoc}); 4,87 (s, 1H, H_{NHBoc}); 3,16 (m, 2H, H_{γ'}); 3,12 (m, 2H, H_δ); 2,70 (t, J=6,4 Hz, 2H, H_d); 2,44 (t, J=6,5 Hz, 2H, H_{α'}); 2,38 (m, 4H, H_α et H_a); 1,60 (quint., J=6,5 Hz 2H, H_{β'}); 1,47 (m, 8H, H_β, H_γ, H_b et H_c); 1,44 (s, 18H, H_{CH₃ Boc})

RMN ¹³C (CDCl₃) δ en ppm : 156,05 (C_{CO}); 79,46 (C_{q(CH₃)₃}); 78,76 (C_{q(CH₃)₃}); 53,88-53,64-52,08 (C_{CH₂α}, C_{CH₂α'} et C_{CH₂a}); 42,16 (C_{CH₂δ}); 40,45 (C_{CH₂γ'}); 40,46 (C_{CH₂d}); 29,60 (C_{CH₂β'}); 28,46 (C_{q(CH₃)₃}); 27,99 (C_{CH₂b}); 26,72 (C_{CH₂c}); 24,42 (C_{CH₂β}); 24,32 (C_{CH₂γ})

***N*⁴-(4-aminobutyl)-*N*¹,*N*⁸,*N*¹²-tris-*tert*-butoxycarbonylspermine (13)**



Ce composé est synthétisé selon la méthode décrite pour le produit **12**. En partant de 3,5 g de **11** (4,96 mmol), le produit **13** est isolé avec un rendement de 82% (2,3 g, 4,00 mmol).

Aspect : huile jaune pâle

R_f (MeOH + 5% NH₄OH) = 0,42

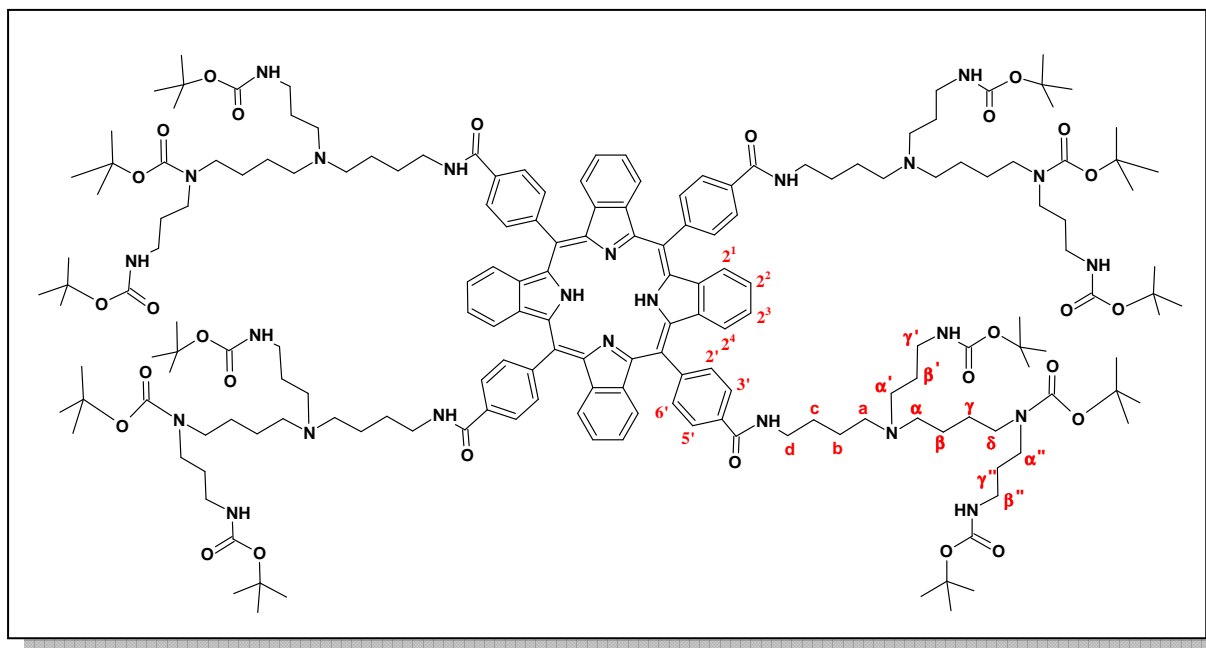
SM Haute Résolution : m/z = 574,4544 [M+H]⁺

IR (cm⁻¹) (KBr) : 3353 (ν_{N-H} Second.), 2974 (ν_{N-H} amide), 2932 (ν_{Csp³-H}), 1693 (ν_{C=O}), 1172 (ν_{C-N})

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 5,32 (s, 1H, H_{NHBoc}); 4,83 (s, 1H, H_{NHBoc}); 3,24 (m, 2H, H_{α''}); 3,16 (m, 2H, H_{γ''}); 3,14 (m, 2H, H_{γ'}); 3,10 (m, 2H, H_δ); 2,70 (t, J=6,4 Hz, 2H, H_d); 2,44 (m, 2H, H_{α'}); 2,38 (m, 4H, H_α et H_a); 1,65 (m, 2H, H_{β''}); 1,60 (quint., J=6,4 Hz, 2H, H_{β'}); 1,50 (m, 4H, H_b et H_c); 1,44 (s, 27H, H_{CH₃ Boc}); 1,39 (m, 4H, H_β et H_γ)

RMN ¹³C (CDCl₃) δ en ppm : 156,09 (C_{CO}); 79,46 (C_{CH₃}); 78,76 (C_{CH₃}); 77,35 (C_{CH₃}); 53,96-53,71 (C_{CH₂α}, C_{CH₂a}); 52,70 (C_{CH₂α'}); 46,93 (C_{CH₂δ}); 43,69 (C_{CH₂α''}); 42,13 (C_{CH₂d}); 40,00 (C_{CH₂γ''}); 37,47 (C_{CH₂γ'}); 31,65-29,71-26,94-24,52-24,32 (C_{CH₂β}, C_{CH₂β'}, C_{CH₂β''}, C_{CH₂γ}, C_{CH₂b} et C_{CH₂c}); 28,49 (C_{CH₃})

5,10,15,20-tétrakis-(N^1, N^8, N^{12} -tris-*tert*-butoxycarbonylspermine-(N^4 -(4-aminobuyl)-4-amidophényl))-tétrabenzoporphyrine (15)



Les mêmes méthodes de synthèse et de purification que pour le composé **14** sont utilisées pour le composé **15**. En partant des mêmes quantités de départ et après purification, on isole le produit **15** avec un rendement de 58% (27 mg, 8,4 μmol).

Aspect : poudre verte

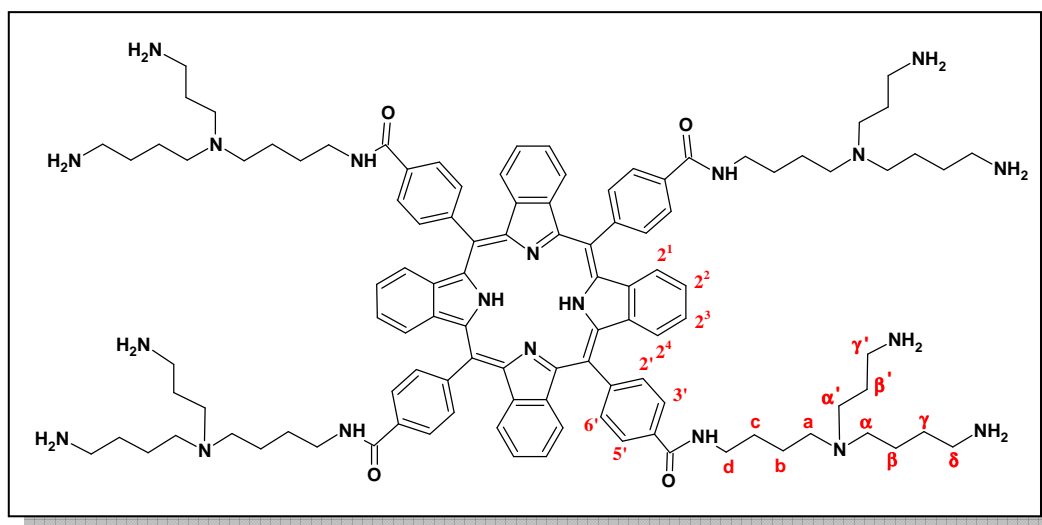
R_f ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 7/3 + 1% Et_3N) = 0,34

SM (MALDI) m/z = 3217,86 $[\text{M}+\text{H}]^+$

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (CHCl_3) : 469 (173,8); 605 (10,8); 655 (21,6); 710 (9,2)

RMN ^1H (CDCl_3) δ en ppm : 8,44 (m, 16H, $\text{H}_{2'-3'-4'-5'}$); 7,26 (s, 16H, $\text{H}_{2^1-2^2-2^3-2^4}$); 7,19 (se, 4H, H_{NH}); 5,29 (s, 12H, H_{NHBoc}); 3,60-3,80 (m, 40H, H_d , H_δ , $\text{H}_{\gamma'}$, $\text{H}_{\alpha''}$ et $\text{H}_{\beta''}$); 3,18-3,25 (m, 24H, H_a , H_α et $\text{H}_{\alpha'}$); 1,60-1,70 (m, 48H, H_b , H_c , H_β , H_γ , $\text{H}_{\beta'}$ et $\text{H}_{\gamma''}$); 1,43 (m, 108H, $\text{H}_{\text{CH}_3 \text{ Boc}}$); -1,1 (se, 2H, $\text{H}_{\text{NH interne}}$)

5,10,15,20-tétrakis-(spermidine-(*N*⁴-(4-aminobuyl)-4-amidophényl))-tétrabenzoporphyrine (**16**)



La Ph₄TBP(spermidineBoc₂)₄ (**14**) (15 mg, 5,6 μmol) est mise en solution dans 5 mL d'un mélange CH₂Cl₂/TFA 8/2. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante, à l'abri de la lumière pendant 3 heures. Après évaporation le produit est mis en solution dans un mélange MeOH/CH₂Cl₂ 7/3 et le milieu réactionnel est neutralisé avec une résine basique. Le produit précipite et après filtration sur fritté le composé **16** (8,8 mg, 4,9 μmol) est obtenu avec un rendement quasi quantitatif.

Aspect : poudre verte

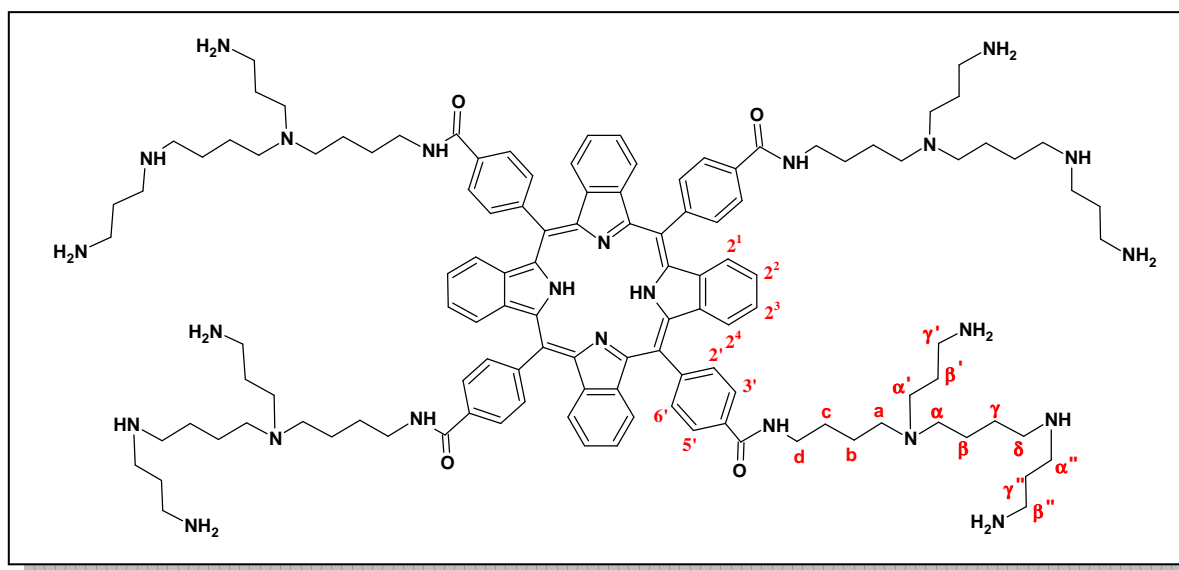
R_f (CH₃CN/H₂O 7/3 + 0,5% TFA) = 0,46

SM (MALDI) m/z (théorique)= 1784,72

UV : λ_{max} nm (ε.10⁻³) (MeOH) : 462 (73,0); 594 (4,6); 639 (9,1); 696 (2,8)

RMN ¹H (CD₃OD) δ en ppm : 8,46 (m, 8H, H_{3'-5'}); 8,40 (m, 8H, H_{2'-4'}); 7,22 (s, 8H, H_{2¹⁻⁴}); 7,12 (s, 8H, H_{2²⁻³}); 3,50-3,0 (m, 24H, H_d; H_δ et H_{γ'}); 2,50-3,10 (m, 24H, H_a, H_α et H_{α'}); 1,18-1,47 (m, 40H, H_b, H_c, H_β, H_{β'} et H_γ)

5,10,15,20-tétrakis-(spermine-(N^4 -(4-aminobuyl)-4-amidophényl))-tétrabenzoporphyrine (17)



Les mêmes méthodes de synthèse et de purification que pour le composé **16** sont utilisées pour le composé **17**. En partant de quantités semblable de départ (27mg, 8,4 μmol) et après purification, on isole le produit **17** (15,7mg, 7,8 μmol) avec un rendement quasi quantitatif.

Aspect : poudre verte

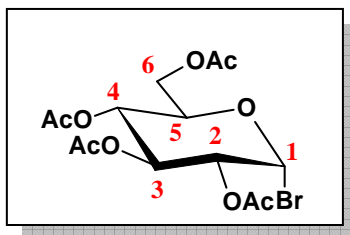
R_f ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 7/3 + 0,5% TFA) = 0,69

SM (MALDI) m/z (théorique)= 2012,13

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (MeOH) : 462 (55,5); 592 (5,7); 639 (8,1); 697 (4,5)

RMN ^1H (CD_3OD) δ en ppm : 8,40-8,48 (m, 16H, $\text{H}_{2'-3'-4'-5'}$); 7,40 (s_e, 8H, $\text{H}_{2^1-2^4}$); 7,19 (s_e, 8H, $\text{H}_{2^2-2^3}$); 3,50-3,70 (m, 40H, H_d , H_δ , $\text{H}_{\gamma'}$, $\text{H}_{\alpha''}$ et $\text{H}_{\beta''}$); 2,50-3,10 (m, 24H, H_a , H_α et $\text{H}_{\alpha'}$); 1,50-1,90 (m, 48H, H_b , H_c , H_β , H_γ , $\text{H}_{\beta'}$ et $\text{H}_{\gamma''}$)

1-bromo-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranose (18)



Le glucose *peracétylé* (15 g, 38,4 mmol) est dissous dans 20 mL d'une solution à 33% d'HBr dans l'acide acétique à 4°C. La réaction est laissée sous agitation pendant 4 heures puis le mélange réactionnel est mis au réfrigérateur pendant 12 heures. L'excès d'acide bromhydrique est chassé à 0°C par barbotage d'argon suivi d'une extraction par le CH₂Cl₂ (50 mL) et l'eau bidistillée (100 mL), puis d'une neutralisation rapide avec une solution saturée de NaHCO₃ glacée (2x10 mL). Après lavage de la phase organique à l'eau (2x100 mL), séchage sur sulfate de magnésium, filtration et évaporation du solvant, le produit brut est recristallisé à deux reprises dans 25 mL d'éther diisopropylique. On isole alors 12,9 g (0,031 mmol, Rdt 82%) de 1-bromo-2,3,4,6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranose.

Aspect : cristaux blanc

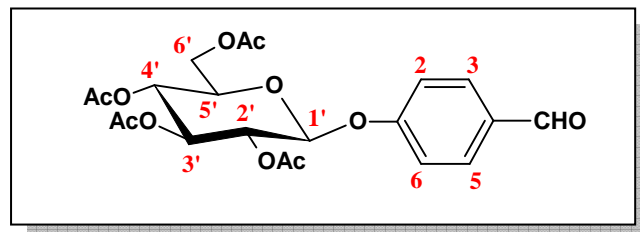
R_f (AcOEt / éther de pétrole 2/1) = 0,60

T_F = 88°C (litt. Erreur ! Signet non défini. T_F=88-89°C)

[α]_D = +196° (C=2, CHCl₃)

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 6,61 (d, J=4,05, Hz 1H, H₁); 5,56 (t, J=9,7 Hz, 1H, H₄); 5,15 (t, J=11,1 Hz, 1H, H₃); 4,84 (dd, J=4,0-9,90 Hz, 1H, H₂); 4,31 (dd, J=3,1-12,4 Hz, 1H, H_{6a}); 4,30 (ddd, J=1,9-4,1-10,3 Hz, 1H, H₅); 4,14 (dd, J=4,5-12,6 Hz, 1H, H_{6b})

4-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)benzaldéhyde (**19**)



Par réaction de 15 g du composé (**18**) (36,4 mmol, 1 éq.) avec 13,2 g de 4-hydroxybenzaldéhyde (108,7 mmol, 3 éq.), en présence de 30 mL d'acétone et de 20 mL de NaOH à 7%, on obtient après 24 heures une solution à laquelle on ajoute 400 mL d'eau glacée. Après une heure d'agitation, le précipité formé est récupéré par filtration. Il est alors recristallisé dans le mélange méthanol/eau (1/1). Ainsi 6,6 g (14,6 mmol, rdt 40%) du composé **19** sont obtenus.

Aspect : cristaux blancs

Rf (AcOEt / éther de pétrole 2/1) = 0,31

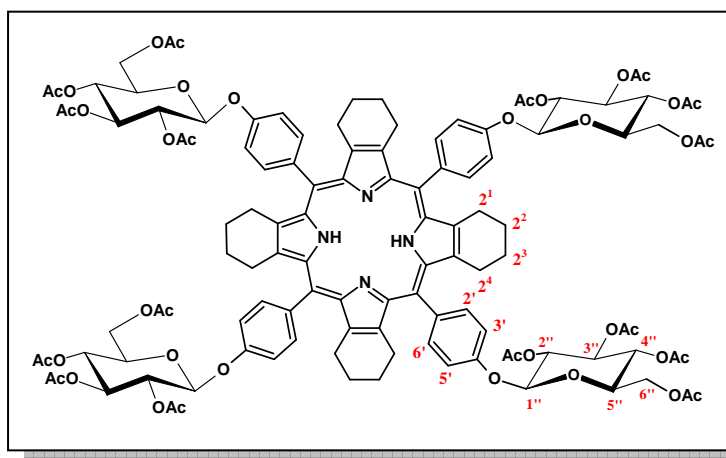
TF = 144°C (litt.^{155a} TF=144-145°C)

SM (MALDI) m/z = 452,40 [M]⁺

[α]_D (C=0,5, CHCl₃) = - 33,5°

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 9,90 (s, 1H, H_{CHO}); 7,85 (d, J=8,5 Hz, 2H, H₃₋₅); 7,10 (d, J=8,5 Hz, 2H, H₂₋₆); 5,20-5,40 (m, 4H, H_{1'-2'-3'-4'}); 3,90 (ddd, J=10,0-5,6-2,6 Hz, 1H, H_{5'}); 4,15 (dd, J=12,0-5,6 Hz, 1H, H_{6'a}); 4,27 (dd, J=12,0-2,6 Hz, 1H, H_{6'b}); 2,06 (s, 3H, H_{Ac}); 2,05 (s, 6H, H_{Ac}); 2,03 (s, 3H, H_{Ac})

**5,10,15,20-tétrakis-[4-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-phényl]-
tétracyclohexènoporphyrine (20)**



Le composé (**19**) (357 mg, 0,79 mmol, 1 éq.) est ajouté à une solution de tétrahydroisoindeole (**2**) (provenant de 150,9 mg du composé **1** (0,78 mmol, 1 éq.)) déjà solubilisée dans 100 mL de CH₂Cl₂. Après environ 10 minutes d'agitation le BF₃.Et₂O (13,5 μ L, 0,11 mmol, 0,14 éq.) est additionné par un goutte-à-goutte au mélange, puis la solution est agitée pendant 2 heures. Elle prend une couleur rouge. Ensuite le DDQ (195 mg, 0,85 mmol, 1,1 éq) est additionné au mélange réactionnel, et la solution est laissée sous agitation durant 1 heure. L'oxydation du porphyrinogène se traduit par un changement de couleur allant du rouge au vert. Après plusieurs lavages, comparables à la formation du composé **3**, et une purification sur colonne de gel de silice avec un gradient de solvant (CH₂Cl₂/EtOH de 95/05 à 90/10), on obtient 155 mg du composé **20** (70 μ mol, Rdt = 36% \rightarrow global : du composé **1** au composé **20**).

Aspect : poudre verte

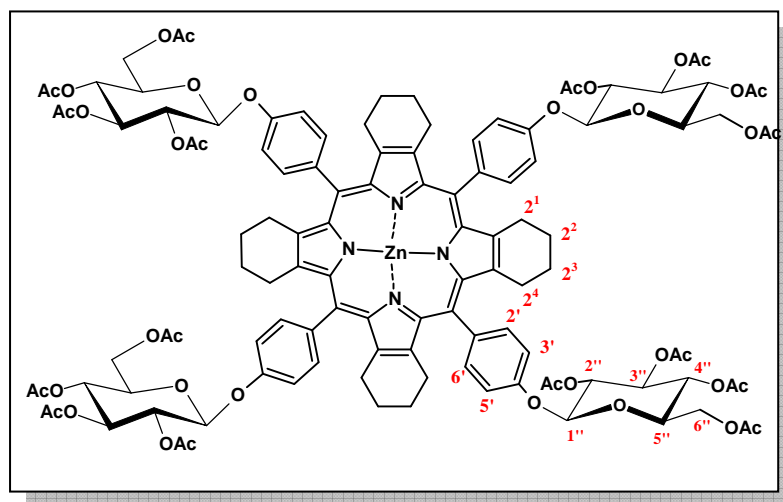
R_f (CH₂Cl₂/EtOH 95/05) = 0,52

SM (MALDI) m/z = 2215,51 [M+H]⁺

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (CHCl₃) : 476 (134,9); 578 (8,6); 632 (10,3); 691 (19,1)

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 8,02 (d, J=8,28 Hz, 8H, H_{3'-5'}); 7,32 (d, J=8,40 Hz, 8H, H_{2'-6'}); 5,25-5,50 (m, 16H, H_{1''-2''-3''-4''}); 4,49 (dd, J=4,52-12,40 Hz, 4H, H_{6''b}); 4,34 (dd, J=1,56-12,16, 4H, H_{6''a}); 4,28 (ddd, J=2,40-5,40-10,76, 4H, H_{5''}); 2,20 (m, 16H, H_{2-2,4}); 2,11 (s, 48H, H_{Ac}); 1,25-1,7 (m, 16H, H_{2,2-2,3})

**5,10,15,20-tétrakis-[4-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-phényl]-
tétracyclohexènoporphyrine de zinc (21)**



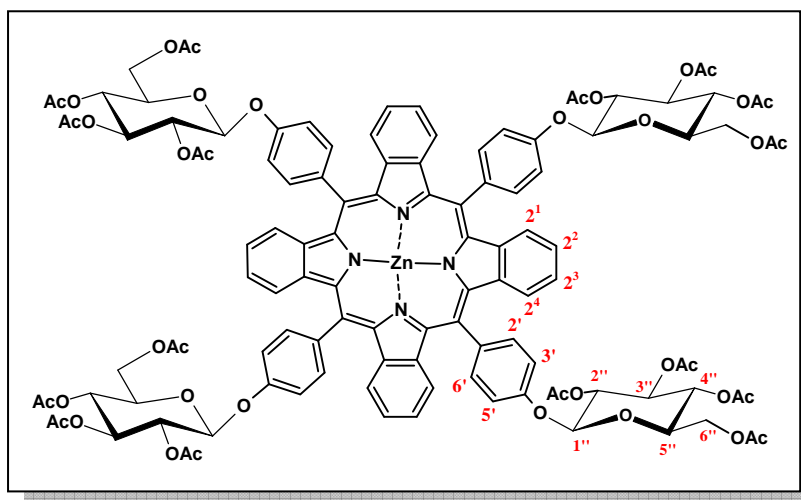
La tétracyclohexènoporphyrine glucoacétylé (**20**) (155 mg, 70 μ mol, 1 éq.) est solubilisée dans 10 mL d'un mélange de solvant ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$) (9/1). Ensuite l'acétate de zinc (35 mg, 170 μ mol, 2,5 éq.) est ajouté à la solution. La réaction est agitée durant 1 heure et suivit par contrôle UV. Après la métallation la solution change de couleur passant du vert au rouge. La phase organique est ensuite lavée à plusieurs reprises ($\text{H}_2\text{O}/\text{AcOH}_{(10\%)}$ (1x10 mL), $\text{H}_2\text{O}/\text{NaHCO}_{3(10\%)}$ (1x10 mL), et H_2O (1x10 mL)), puis séchée sur sulfate de magnésium, filtrée, et le solvant évaporé. Une purification sur colonne de silice (éluant : CH_2Cl_2 + 1% Et_3N) permet d'obtenir la tétracyclohexènoporphyrine métallée par le zinc (**21**) avec une masse de 98 mg (43 μ mol, Rdt = 62%).

Aspect : poudre verte

R_f (AcOEt/éther de pétrole/ Et_3N 65/35/1) = 0,69

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (CHCl_3) : 437; 566; 617; 671

**5,10,15,20-tétrakis-[4-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-phényl]-
tétrabenzoporphyrine de zinc (22)**



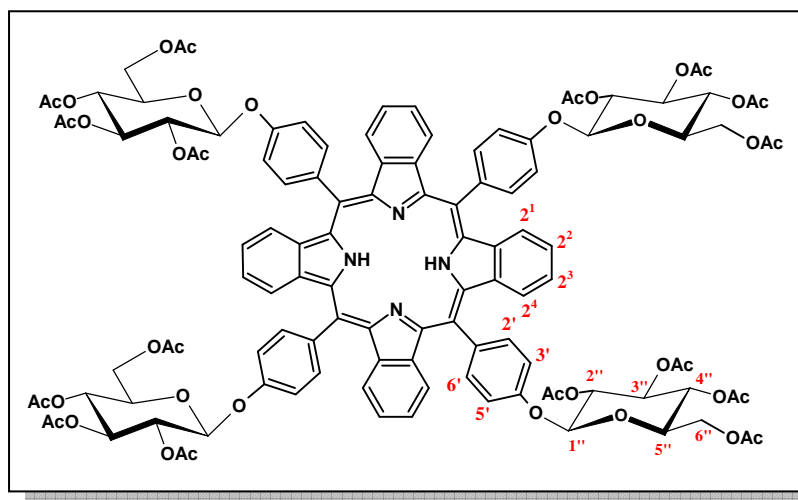
La tétracyclohexènoporphyrine métallée par le zinc (**21**) (98 mg, 43 μ mol, 1 eq.) est solubilisée dans un grand volume de THF anhydre ($V = 150$ mL) auquel le DDQ (156 mg, 688 μ mol, 16 eq.) est ajouté. Le mélange est porté à reflux (80°C) sous argon et à l'abri de la lumière pendant 1 heure. Après oxydation la solution passe de la couleur rouge à la couleur verte. Une fois le mélange réactionnel revenu à température ambiante, le solvant est évaporé et le brut repris dans du CH_2Cl_2 ($V = 20$ mL) puis la phase organique est lavée à plusieurs reprises avec une solution d' $\text{H}_2\text{O}/\text{K}_2\text{CO}_3(10\%)$ (2x25 mL) et d' H_2O (1x25 mL), séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et le solvant évaporé sous pression réduite. La masse brut obtenue est de 92 mg. Une purification sur colonne est réalisée avec pour éluant un gradient de solvant allant du CH_2Cl_2 au mélange $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 70/30 + 1% Et_3N . Le dérivé tétrabenzoporphyrinique métallée (**22**) est obtenu avec une masse de 36 mg (16 μ mol, $\text{Rdt}\% = 37$).

Aspect : poudre verte

Rf ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 9/1 sur alumine) = 0,81

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 90/10) : 464; 609; 653, 720

5,10,15,20-tétrakis-[4-(2',3',4',6'-tétra-*O*-acétyl- β -D-glucopyranosyloxy)-phényl]-tétrabenzoporphyrine (23)



Le dérivé tétrabenzoporphyrinique métallée par le zinc (**22**) (36 mg, 16 μ mol) est solubilisé dans 50 mL de CH_2Cl_2 puis 10 mL d'HCl (10M) sont ajoutés à la solution. La solution prend une couleur bordeaux. Après une agitation de l'ordre de 2 à 3 minutes, la phase organique est récupérée et lavée à plusieurs reprises à l'eau (x3), puis par une solution aqueuse de carbonate de potassium saturée et enfin neutralisé par un dernier lavage à l'eau. Le tétrabenzoporphyrine glucoacétylé (**23**) (26,7 mg; 12 μ mol), est obtenu après purification sur plaques préparatives ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 92/08) avec un rendement de 76%.

Aspect : poudre verte

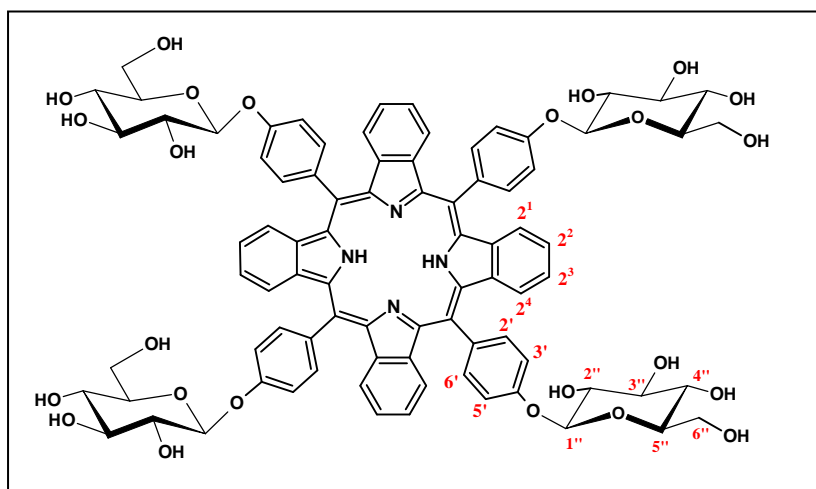
R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{EtOH}$ 97/03) = 0,50

SM (MALDI) m/z = 2198,66 [M+H]⁺

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (CHCl_3) : 466 (313,6); 591 (22,1); 642 (42,0); 697 (17,4)

RMN ¹H (CDCl₃) δ en ppm : 8,28 (d, J=8,4 Hz, 8H, H_{3'-5'}); 7,50 (d, J=8,4 Hz, 8H, H_{2'-6'}); 7,30 (m, 16H, H_{2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''-2''}); 5,50 (m, 12H, H_{1''-2''-3''}); 5,32 (t, J=9,6 Hz, 4H, H_{4''}); 4,46 (dd, J=5,2-12,3 Hz, 4H, H_{6''a}); 4,29 (dd, J=2,0-12,3 Hz, 4H, H_{6''b}); 4,06 (ddd, J=2,2-5,2-9,7 Hz, 4H, H_{5''}); 2,17 (s, 48H, H_{Ac}); -1,18 (s_c, 2H, H_{NH})

5,10,15,20-tétrakis-[4-(β-D-glucopyranosyloxyphényl)]-tétrabenzoporphyrine (24)



Dans un ballon (V= 5 mL), 30 mg du composé acétylé **23** (13,6 μmol, 1 équ.) sont solubilisés dans dans 5 mL d'un mélange de CH₂Cl₂ et de MeOH (80/20) avec 0,85 mL de solution de méthylate de sodium (0,5M dans le MeOH) (436 μmol, 32 équ.) jusqu'à précipitation du produit désiré. Après purification sur plaques de silice (éluant CHCl₃/EtOH 9/1), le composé **24** est isolé avec un rendement de 86% (17,8 mg, 11,7 μmol).

Aspect : poudre verte

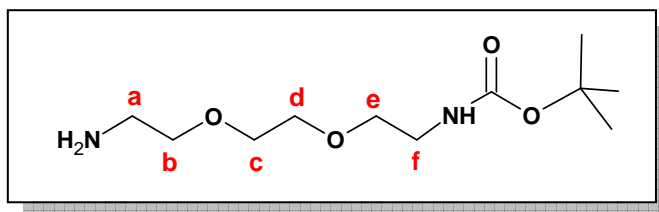
R_f (MeOH + 1% Et₃N) = 0,51

SM (MALDI) m/z = 1527,0 [M+H]⁺

UV : λ_{max} nm (ε.10⁻³) (MeOH) : 470 (299,6); 588 (23,3); 629 (35,2); 697 (14,7)

RMN ¹H (CD₃OD) δ en ppm : 8,33 (m, 8H, H_{3'-5'}); 7,95 (m, 8H, H_{2'-6'}); 7,1-7,3 (m, 16H, H_{2¹-2²-2³-2⁴}); 4,69 (m, 4H, H_{1''}); 4,4-4,6 (m, 20H, H_{2''-3''-4''-6a''-6b''}); 4,32 (m, 4H, H_{5''})

Tert-butyl-N-(2-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]éthyl)-carbamate (25)



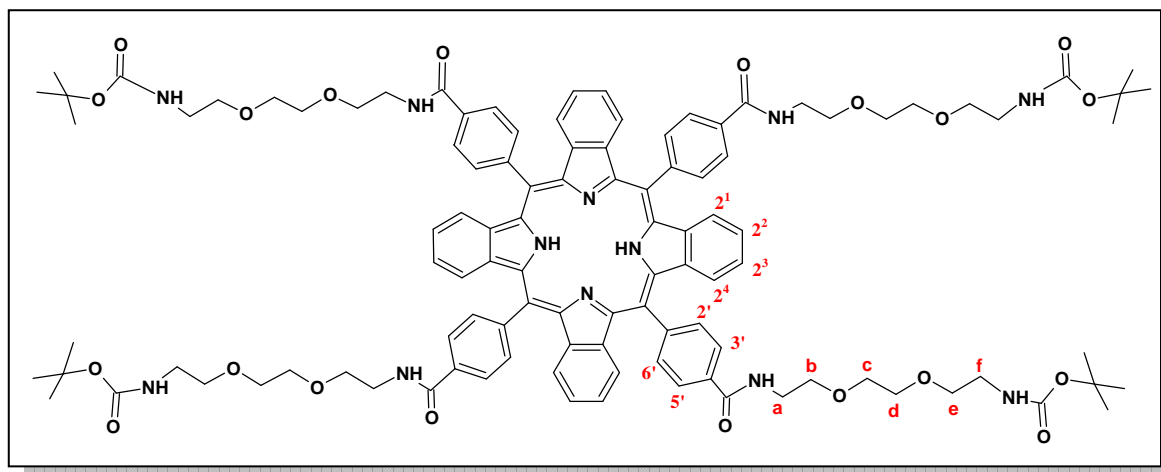
Sous argon, la 2,2'-(éthylènedioxy)-bis-(éthylamine) (5 mL, 34,2 mmol, 1éq.) est additionnée à du CH₂Cl₂ fraîchement distillé (35 mL), puis par un goutte-à-goutte du Boc-ON (848 mg, 3,42 mmol, 0,1 éq.) préalablement dilué dans du CH₂Cl₂ est additionnée à la solution. Après 36 heures de réaction à température ambiante le solvant est évaporé sous pression réduite. Une huile jaune est obtenue qui est à nouveau solubilisée dans 30 mL de CH₂Cl₂, puis la phase organique est lavée à plusieurs reprises à l'eau, séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et le solvant évaporé. Enfin une purification sur mini-colonne est effectuée avec pour éluant le CH₂Cl₂. Le produit final (**25**) est obtenu avec une masse de 758 mg (3,05 mmol, Rdt% =89).

Aspect : huile jaune

R_f (AcOEt/EtOH/H₂O 6/3/1) = 0,39

RMN ¹H (CDCl₃) **δ en ppm :** 5,18 (s_e, 1H, H_{NH}); 3,51-3,63 (m, 8H, H_{b,c,d,e}); 3,31 (dt, J=5,1 Hz, 2H, H_a); 2,88 (t, J=4,9 Hz, 2H, H_f); 1,45 (s, 9H, H_{CH₃ Boc})

5,10,15,20-tétrakis-(4-[*tert*-butyl-*N*-(2-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]éthyl)-carbamate]-amidophényl)-tétrabenzoporphyrine (26)



Dans un bicol ($V = 25$ mL), sous argon et à température ambiante 30 mg de $\text{Ph}_4\text{TBP}(\text{CO}_2\text{H})_4$ (**7**) (1 éq., 32 μmol) sont solubilisés dans 2 mL de DMF en présence de 27 mg de DCC (131 μmol , 4,4 éq.) et de 18 mg de HOBt (133 μmol , 4,4 éq.). Après 10 minutes d'agitation, 33 mg de composé **25** (133 μmol , 4,4 éq.) sont introduit et la réaction est suivi par CCM. Une purification sur plaques préparatives de silice est réalisée afin d'obtenir 46,2 mg (24 μmol , rdt% = 85) du produit désiré (**26**).

Aspect : poudre verte

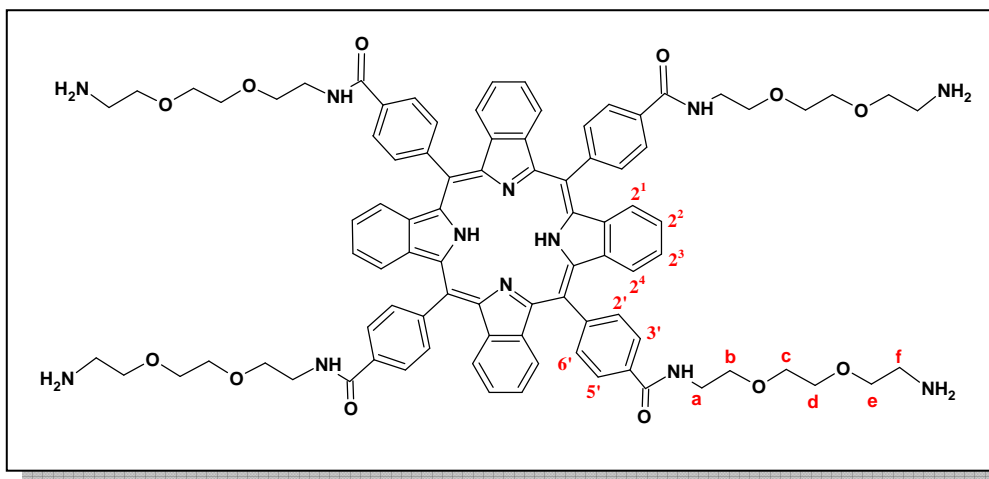
R_f ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$, 7/3 + 1% Et_3N) = 0,32

SM (MALDI) m/z = 1912,30 $[\text{M}+\text{H}]^+$

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (CHCl_3) : 469 (151,1); 596 (10,0); 646 (22,4); 703 (8,8)

RMN ¹H (CDCl_3) δ en ppm : 8,47 (d, $J=7,00$ Hz, 8H, $\text{H}_{3'-5'}$); 8,33 (d, $J=6,96$ Hz, 8H, $\text{H}_{2'-6'}$); 7,20 (s, 8H, $\text{H}_{2^1-2^4}$); 7,13 (s, 8H, $\text{H}_{2^2-2^3}$); 6,54 (s, 4H, H_{NH}); 5,04 (s, 4H, H_{NH}); 3,88 (m, 16H, $\text{H}_{\text{c,d}}$); 3,76 (m, 16H, $\text{H}_{\text{b,e}}$); 3,62 (m, 8H, H_a); 3,36 (m, 8H, H_f); 1,39 (s, 36H, $\text{H}_{\text{CH}_3 \text{Boc}}$); -1,09 (s_e , 2H, $\text{H}_{\text{NH interne}}$)

5,10,15,20-tétrakis-(4-[N-(2-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]éthyl)-carbamate]-amidophényl)-tétrabenzoporphyrine (27)



Dans un ballon ($V = 100$ mL) surmonté d'une garde à chlorure de calcium, 46,2 mg du produit protégé (**26**) (24 μmol) sont introduits puis solubilisés dans 30 mL de mélange CHCl_3/TFA (80/20). La réaction est agitée durant 3 heures à température ambiante. Après évaporation du solvant, le brut est repris dans un minimum de MeOH puis le composé désiré est précipité par addition d'éther de pétrole. Après filtration, la tétrabenzoporphyrine déprotégée (**27**) est obtenue avec une masse de 33,3 mg (22 μmol) soit un rendement de 92%.

Aspect : poudre verte

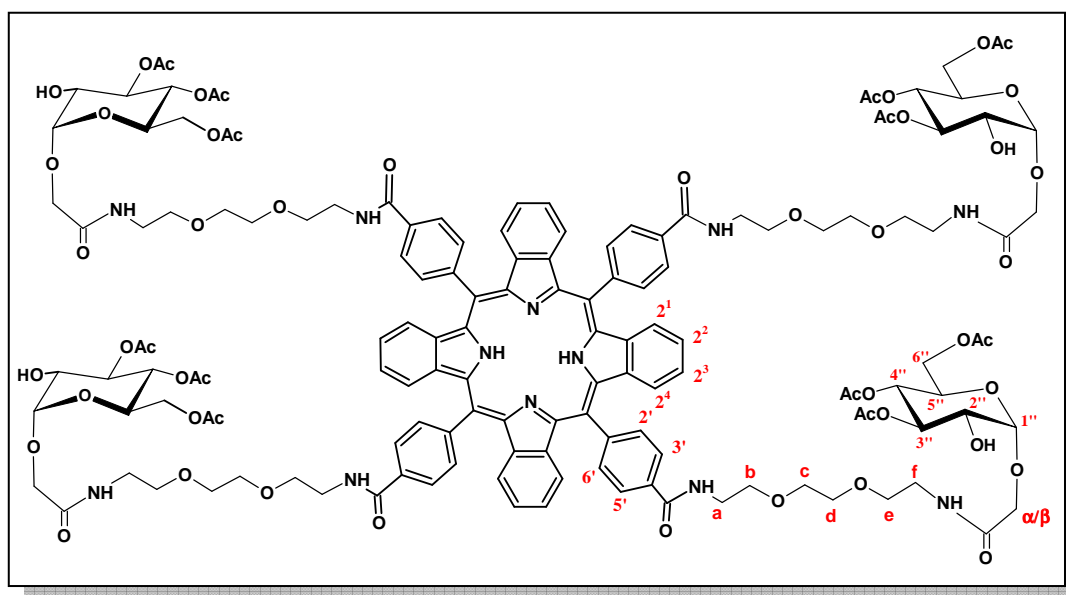
R_f ($\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$, 7/3 + 1% TFA) = 0,69

SM (MALDI) m/z = 1510,86 $[\text{M}+\text{H}]^+$

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (MeOH) : 469 (131,9); 595 (5,3); 645 (16,0); 700 (3,8)

RMN ¹H (CD₃OD) δ en ppm : 8,46 (d, $J=7,92$ Hz, 8H, H_{3'-5'}); 8,33 (d, $J=7,88$ Hz, 8H, H_{2'-6'}); 7,25 (m, 20H, H_{2¹-2²-2³-2⁴} et H_{NH}); 3,82-3,90 (m, 16H, H_{c,d}); 3,65-3,82 (m, 24H, H_{a, b, e}); 3,55-3,65 (m, 8H, H_f); 2,91 (s_c, 8H, H_{NH₂}); -1,09 (s_c, 2H, H_{NH interne})

5,10,15,20-tétrakis-[4-(3,4,6-tri-*O*-acétyl- α -D-glucopyranosyloxyméthylcarbonyl-[*N*-(2-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]éthyl)]-carboxyphényl)]-tétrabenzoporphyrine (28)



Dans un ballon (V= 100 mL) surmonté d'une garde à chlorure de calcium, on introduit 33,3 mg du composé **27** (22 μ mol, 1 éq.), 40,4 mg (116 μ mol, 5,3éq.) de la δ -lactone triacétylée et 42 mg de DMAP (344 μ mol, 16 éq.), le tout solubilisé dans 30 mL de CHCl_3 . Le mélange réactionnel laissé sous agitation à température ambiante et à l'abri de la lumière pendant 2 semaines. Une purification sur plaque de silice ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 85/15) permet d'obtenir la tétrabenzoporphyrine gluco-acétylée (**28**) avec une masse de 22 mg (7,6 μ mol) soit un rendement de 28%.

Aspect : poudre verte

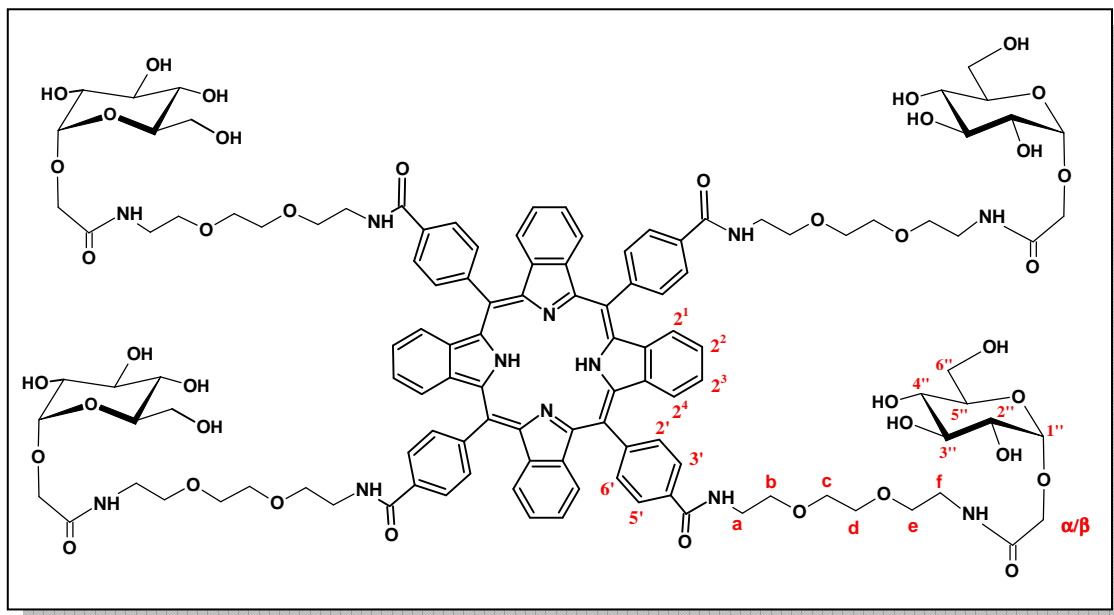
R_f ($\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 9/1) = 0,51

SM (MALDI) m/z = 2896,55 [$\text{M}+\text{H}$]⁺

UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (CHCl_3) : 469 (230,8); 596 (11,5); 648 (30,2); 701 (9,2)

RMN ¹H δ (CDCl_3) en ppm : 8,47 (d, J=7,92 Hz, 8H, H_{3'-5'}); 8,34 (d, J=7,96 Hz, 8H, H_{2'-6'}); 8,00 (m, 4H, H_{NH}); 7,47 (m, 4H, H_{NH}); 7,19 (m, 8H, H_{2¹⁻²⁴}); 7,11 (m, 8H, H_{2²⁻²³}); 5,39 (t, J=9,64 Hz, 4H, H_{3''}); 5,03 (t, J=9,76 Hz, 4H, H_{4''}); 4,91 (d, J=3,52 Hz, 4H, H_{1''}); 4,17-4,28 (m, 8H, H_a et H_{6''}); 3,99-4,05 (m, 8H, H_{5''-6''}); 3,55-3,90 (m, 56H, H_{2''}, H_{a,b,c,d,e,f} et H _{β}); 2,10 (s, 12H, H_{Ac}); 2,03 (s, 12H, H_{Ac}); 1,99 (s, 12H, H_{Ac}); -1,07 (s_e, 2H, H_{NH})

5,10,15,20-tétrakis-[4-(α -D-glucopyranosyloxyméthylcarbonyl-[N-(2-[2-(2-aminoéthoxy)éthoxy]éthyl))]-carboxyphényl]-tétrabenzoporphyrine (29)



Dans un ballon ($V = 5$ mL), 22 mg du composé acétylé **28** (76 μmol , 1 éq.) sont solubilisés dans dans 2 mL d'un mélange de CH_2Cl_2 et de MeOH (80/20) avec 0,35 mL de solution de méthylate de sodium (0,5M dans le MeOH) (182 μmol , 24 éq.) jusqu'à précipitation du produit désiré (30 min). Après purification sur plaque de silice (éluant $\text{CHCl}_3/\text{EtOH}$ 9/1), le composé **29** est isolé avec un rendement de 82% (18 mg, 6,2 μmol).

Aspect : poudre verte

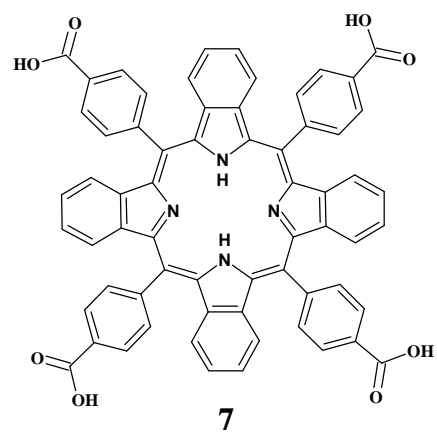
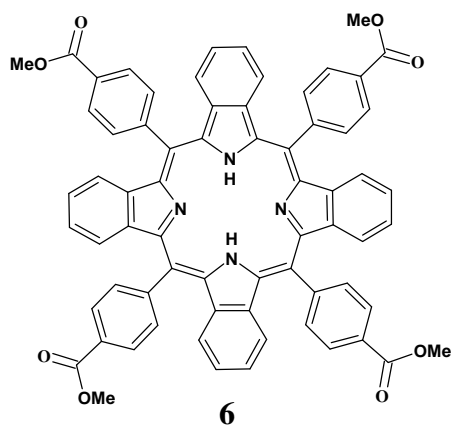
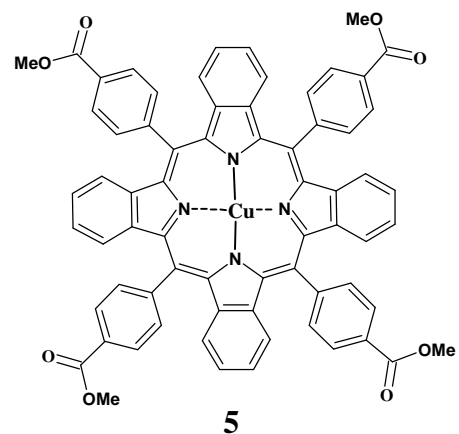
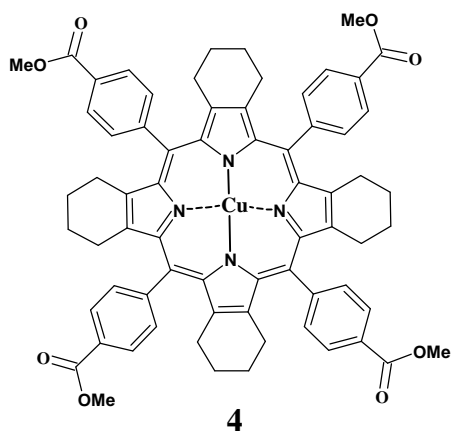
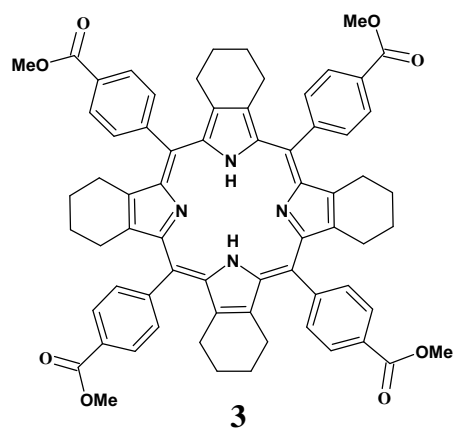
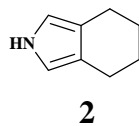
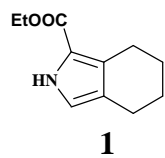
R_f (MeOH) = 0,75 (phase inverse)

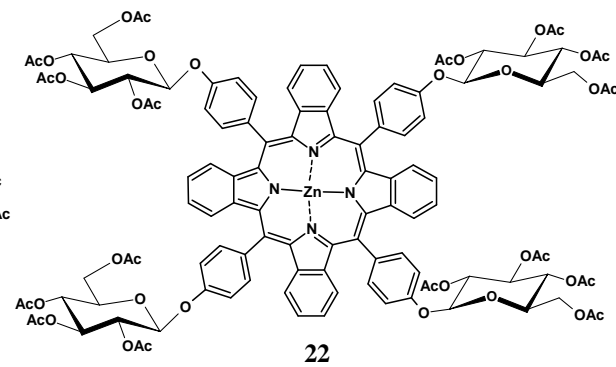
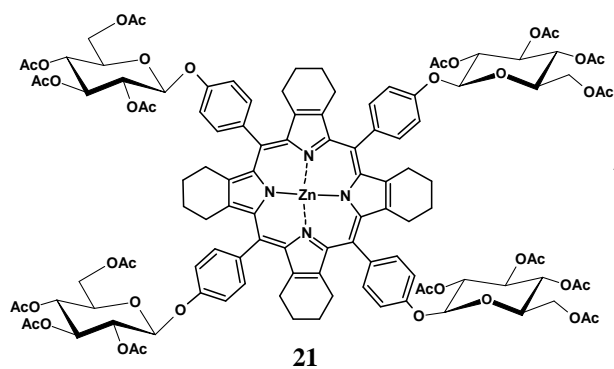
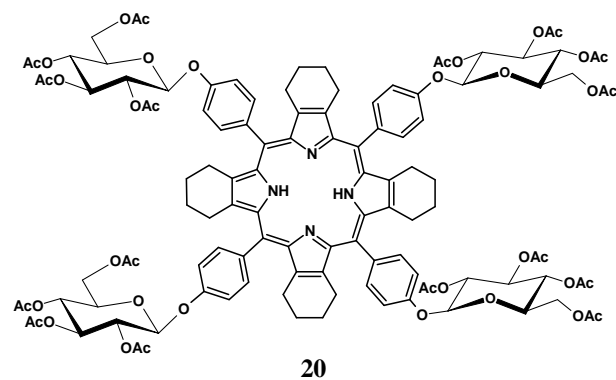
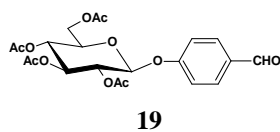
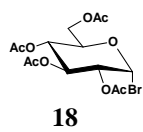
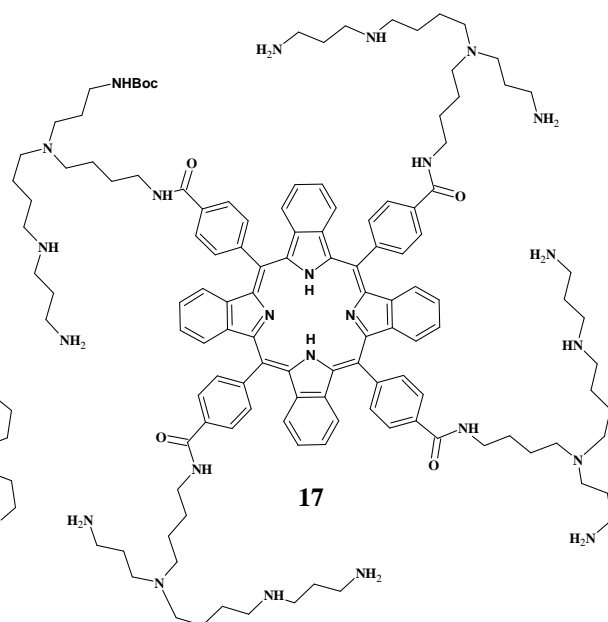
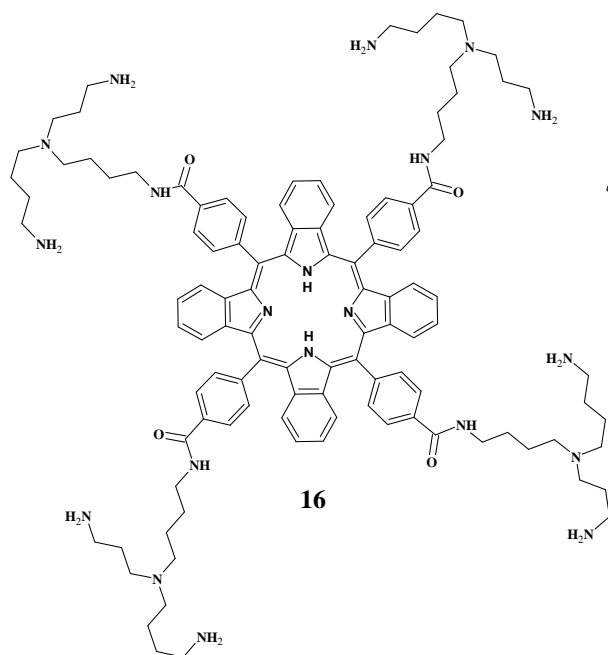
SM (MALDI) m/z = 2392,67 $[\text{M}+\text{H}]^+$

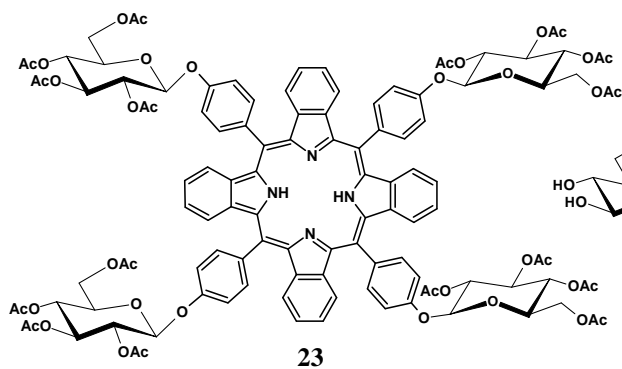
UV : λ_{max} nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) (MeOH) : 464 (99,7); 652 (12,2); 698 (1,7)

RMN ^1H (CD_3OD) δ en ppm : 8,30 (s_e , 16H, $\text{H}_{2'-3'-5'-6'}$); 6,80-7,30 (m, 24H, $\text{H}_{2^1-2^2-2^3-2^4}$ et H_{NH}); 4,84 (m, 4H, $\text{H}_{1''}$); 4,13 (m, 4H, $\text{H}_{5''}$); 3,9 (m, 4H, $\text{H}_{6''}$); 3,45-3,90 (m, 72H, $\text{H}_{a,b,c,d,e,f}$, $\text{H}_{\beta/\alpha}$ et $\text{H}_{2''-3''-4''-6''}$)

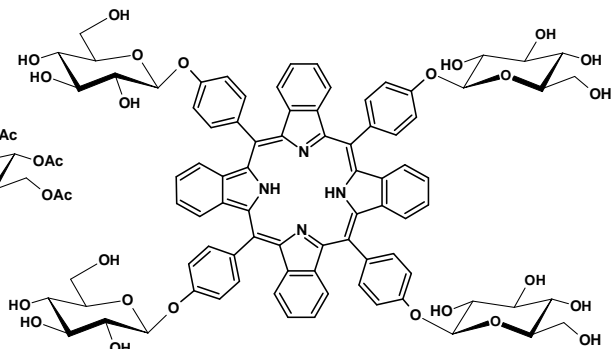
Liste des composés synthétisés



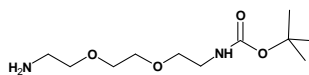




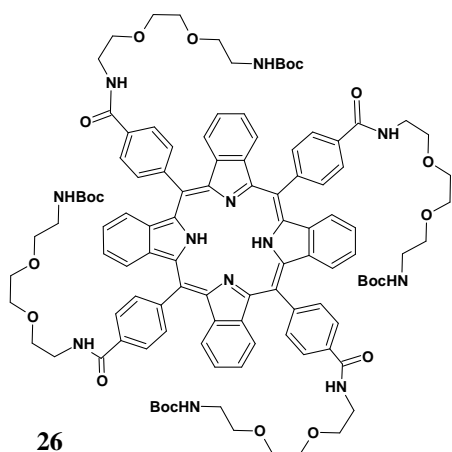
23



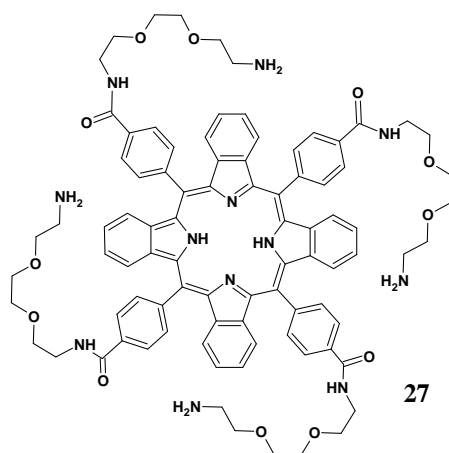
24



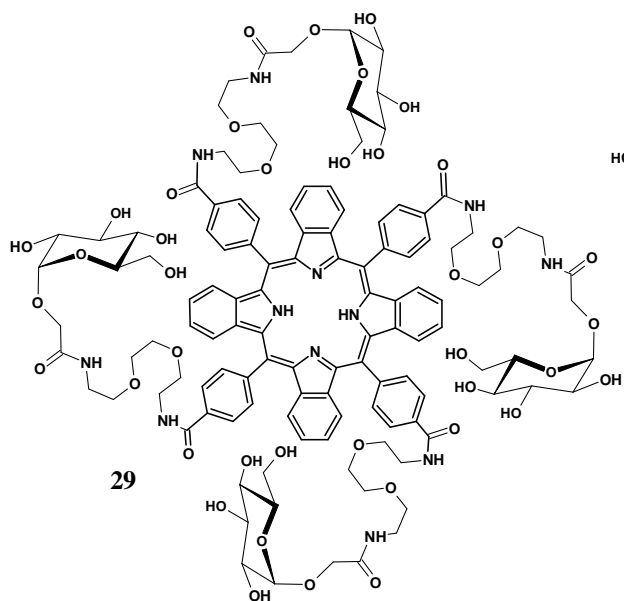
25



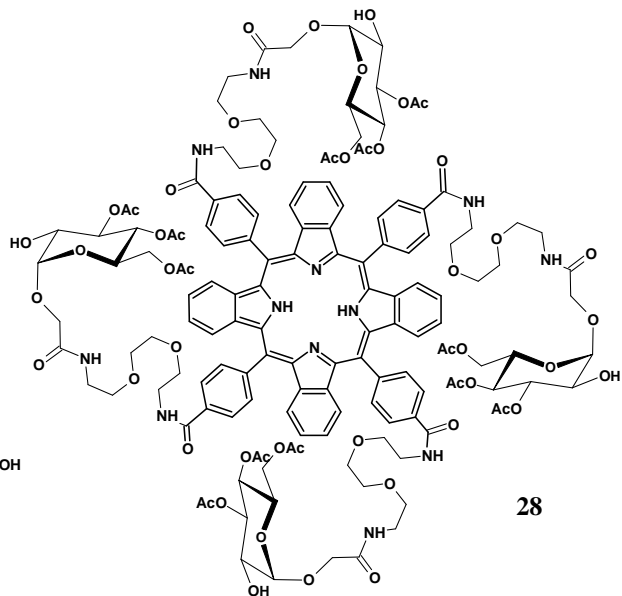
26



27



29



28

Annexe

Synthèse de la δ -lactone triacétylée

1 Le saccharose, l'isomaltulose et le tréhalulose

Rappelons que l'isomaltulose et le tréhalulose sont des sucres peu répandus dans la nature puisqu'ils se trouvent uniquement en très faibles quantités dans le miel (inférieurs à 5% en masse).¹⁶¹ Ce sont deux glucosyl-fructosides qui sont facilement accessibles par voies biochimiques à partir du saccharose. L'isomaltulose et le tréhalulose sont des isomères de structure du saccharose et sont donc composés d'une molécule de glucose liée par son atome de carbone C-1 à un atome de carbone d'une molécule de fructose, par l'intermédiaire d'une liaison osidique de type α . Ainsi l'isomaltulose et le tréhalulose se différencient par la forme cyclique du fructose. La figure annexe 1 permet de comparer les structures chimiques de l'isomaltulose et du tréhalulose à celle du saccharose. L'isomaltulose et le tréhalulose contrairement au saccharose possèdent une extrémité réductrice.

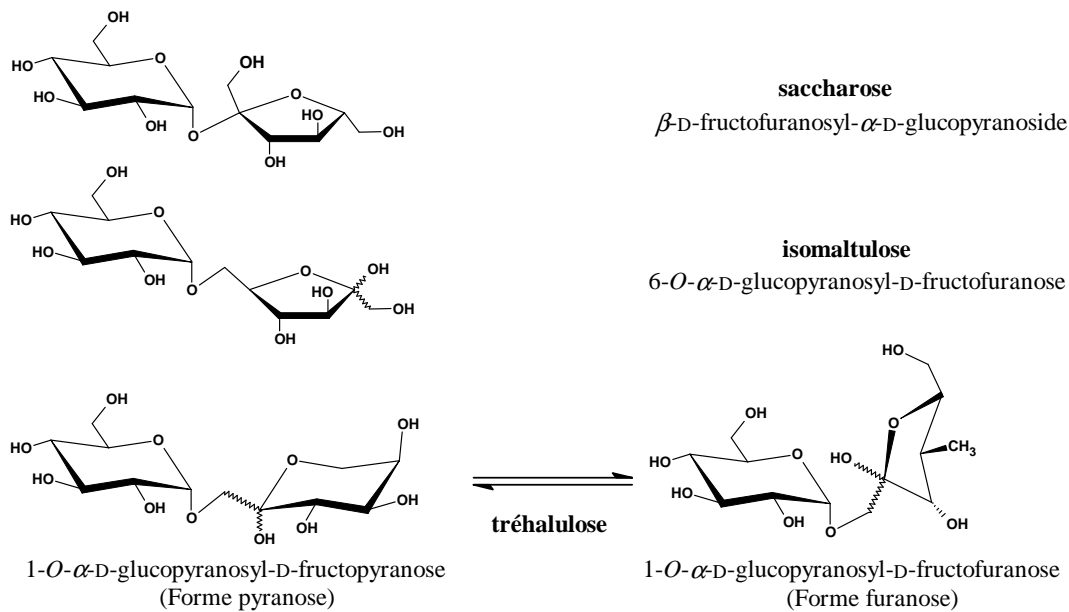


Figure annexe 1 : Structure du saccharose, de l'isomaltulose et du tréhalulose

¹⁶¹ N. H. Low, P. Sporns; *J. Food Sci.*, **1988**, 53, 558-561.

L'isomaltulose est obtenu industriellement par biconversion du saccharose en utilisant les cellules immobilisées de *Protaminobacter rubrum*, de *Serratia plymuthica* ou de *Erwinia rhapsontici* (Figure annexe 2).¹⁶² Il est commercialisé sous le nom de Palatinose® et de Lylose® et peut être utilisé principalement comme matière première pour la préparation industrielle de l'isomalt (Palatinit®), un édulcorant acariogène à faible calories ou bien comme substitue au saccharose dans certaines préparations alimentaires.

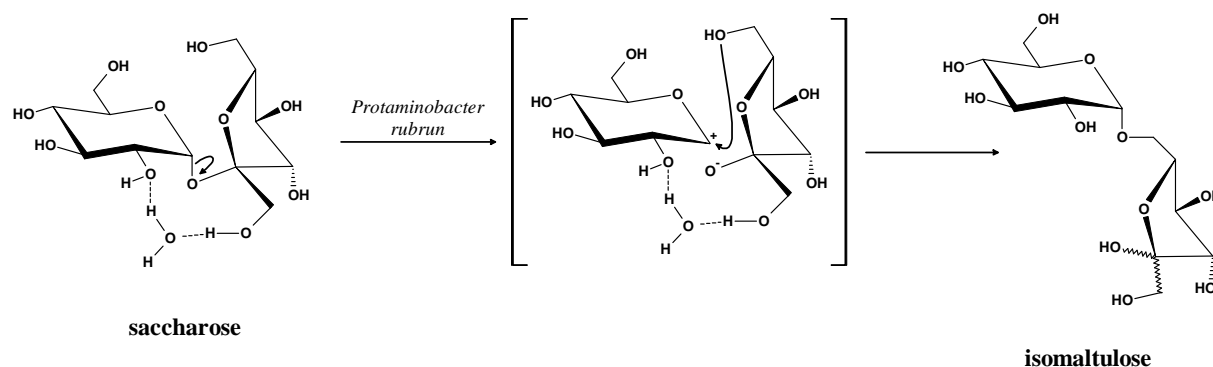


Figure annexe 2 : Mécanisme pour la conversion du saccharose en isomaltulose par voie enzymatique¹⁶³

Quant au tréhalulose, il est obtenu par l'utilisation de micro-organismes tels que l'*Agrobacterium radiobacter* ou le *Pseudomonas mesoacidophila* (Figure annexe 3).¹⁶⁴

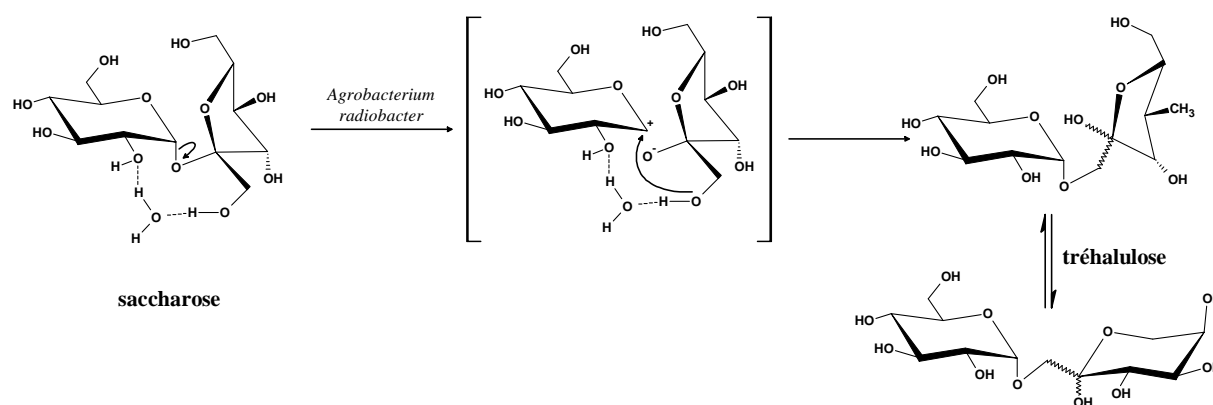


Figure annexe 3 : Mécanisme pour la conversion du saccharose en tréhalulose par voie enzymatique¹⁶³

¹⁶² J. Cheetham; *Methods in enzymology*, **1987**, 136, 432-454.

¹⁶³ W. Lichtenthaler, P. Pokinskyj, S. Immel; *Zuckerind.*, **1996**, 121, 174-190.

¹⁶⁴ Y. Nagai-Miyata, K. Tsuyuki, T. Sugitani, T. Ebashi, Y. Nakajima; *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, 57, 2049-2053.

2 Le carboxyméthyl α -D-glucopyranoside (α -CMG)

L'oxydation par le système peroxyde d'hydrogène et tungstate de sodium ($\text{H}_2\text{O}_2/\text{Na}_2\text{WO}_4$) dans des conditions dures (pH 2, 90°C) de deux disaccharides réducteurs, l'isomaltulose et le tréhalulose, conduit au même produit de réaction, le carboxyméthyl α -D-glucopyranoside (α -CMG) (Figure annexe 4). Ces deux disaccharides sont en effet connus pour avoir une meilleure stabilité aux conditions acides que le saccharose. De plus, la présence d'un centre anomérique dans ces composés leur confère aussi une réactivité supplémentaire vis-à-vis du peroxyde d'hydrogène. Et notons que les ions tungstate favorisent le clivage oxydatif des fonctions glycol lorsqu'ils sont utilisés avec le peroxyde d'hydrogène¹⁶⁵ et que cette réaction a pour avantage d'être stéréo-spécifique.

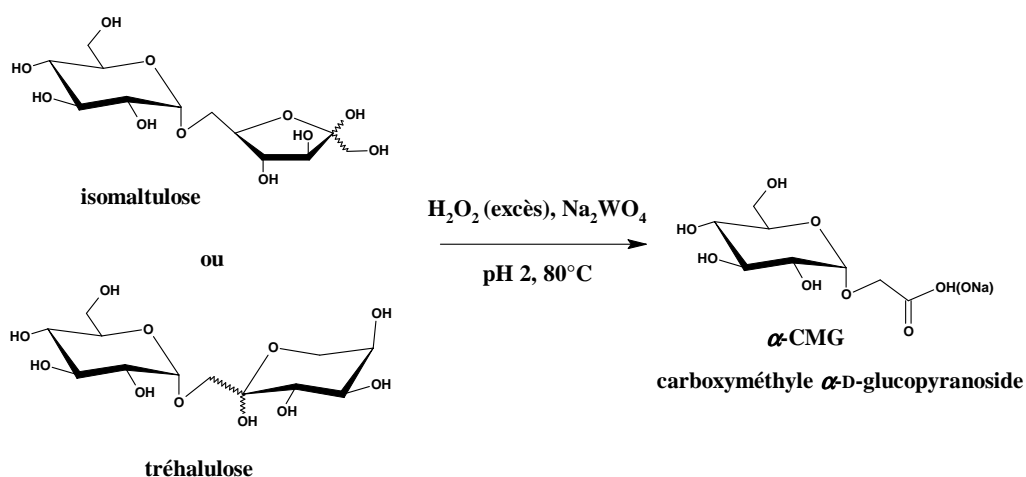


Figure annexe 4 : Obtention du α -CMG par oxydation de l'isomaltulose et du tréhalulose

3 La δ -lactone triacétylée

La δ -lactone triacétylée¹⁵⁶ est issue de l'acétylation des fonctions hydroxyle du sel de sodium du α -CMG dans un excès d'anhydride acétique en présence de pyridine (Figure annexe 5).

¹⁶⁵ a) C. Venturello, M. Ricci; *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 1599-1602. b) M. Floor, K. M. Schenk, A. P. G. Kieboom, H. Van Bekkum; *Starch/Stärke*, **1989**, 41, 303-309.

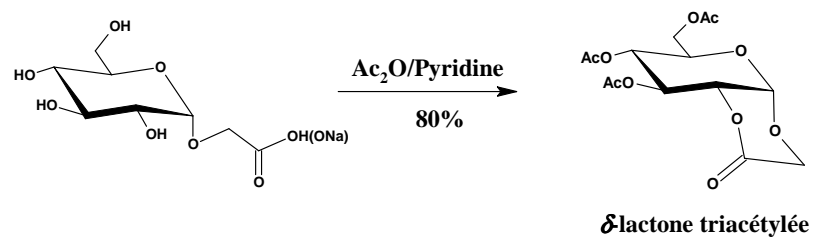


Figure annexe 5 : Préparation d'une δ -lactone triacétylée par acétylation du α -CMG

Références bibliographiques

- ¹ O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, P. J. Carroll, S. Dalosto, S. A. Vinogradov; *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 6944-6946.
- 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 In *The porphyrins*, Structures and synthesis; D. Dolphin, Eds., department of chemistry, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada, **2000**, Part. A, Vol. 1.
- ⁵ E. F. Meyer; *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, **1972**, B28, 2162-2167.
- ⁶ M. Perutz; *Pour la science*. **1979**, 16, 71-85.
- ⁷ L. R. Milgrom; *The Colors of Life : an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford Univ Press, UK. **1997**, 249-260.
- ⁸ a) A. Treibs; *Angew. Chem.*, **1936**, 49, 682-686. b) R. Ocampo, H. J. Callot, P. Albrech; In *Metal complexes in fossil fuels*. R. H. Filby, J. F. Branthaver, Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, **1987**, 125-225. c) E. W. Baker, S. E. Palmer; In *The Porphyrins*; D. Dolphin, Eds.; Academic Press: New York, **1978**, Vol. I, 485.
- ⁹ A. Treibs; *Leibigs Ann. Chem.*, **1936**, 509, 103-114.
- ¹⁰ P. J. Rothemund; *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 61, 2912-2915.
- ¹¹ P. J. Rothemund, A. R. Menotti; *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 267-270.
- ¹² R. H. Ball, G. D. Dorough, M. Calvin; *J. Am. Chem. Soc.*, **1946**, 68, 2278-2281.
- ¹³ A. D. Adler, F. R. Longo, J. D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff; *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476.
- ¹⁴ R. G. Little, J. A. Anton, P. A. Loach, J. A. Ibers; *J. Heterocycl. Chem.*, **1975**, 12, 343-349.
- ¹⁵ A. M. A. R. Gonsalves, M. M. Pereira; *J. Heterocycl. Chem.*, **1985**, 22, 931-933.
- ¹⁶ J. S. Lindsey, H. C. Hsu, I. C. Schreiman; *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969-4970.
- ¹⁷ a) R. B. Woodward; *Angew. Chem.*, **1960**, 72, 651-662. b) R. B. Woodward; *Pure Appl. Chem.*, **1961**, 2, 383-404. c) G. P. Arsenault, E. Bullock, S. F. MacDonald; *J. Am. Chem. Soc.*, **1960**, 82, 4384-4389.
- ¹⁸ A. Treibs, N. Haberle ; *Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 718, 183-207.
- ¹⁹ W. Siedel, F. Winkler; *Liebigs Ann. Chem.*, **1943**, 54, 162-201.
- ²⁰ L. T. Nguyen, M. O. Senge, K. M. Smith; *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 998-1003.
- ²¹ H. Fischer, H. Friedrich, W. Lamatsch, K. Morgenroth; *Techn. Hochschule, Munchen. Ann.*, **1928**, 466, 147-178.
- ²² J. L. Sessler, J. W. Genge, A. Urbach, P. Sansom; *Synlett*, **1996**, 2, 187-188.
- ²³ a) J. H. Helberger; **1937**, 529, 205. b) J. H. Helberger; von A. Rebay; *Ibid.*, **1937**, 531, 279. c) J. H. Helberger; von A. Rebay, D. B. Hever; *Ibid.*, **1938**, 533, 197. d) J. H. Helberger, D. B. Hever; *Ibid.*, **1938**, 536, 173.
- ²⁴ P. A. Barrett, R. P. Linstead; F. G. Rindall, G. A. P. Tuey; *J. Chem. Soc.*, **1940**, 1079-1092.
- ²⁵ R. P. Linstead, F. T. Weiss; *J. Chem. Soc.*, **1950**, 297-2981.
- ²⁶ a) C. O. Bender, R. J. Bonnett; *Chem. Soc.(C)*, **1968**, 3036-40. b) C. O. Bender, R. Bonnett, R. G. Smith; *Ibid.*, **1970**, 1251-1257. c) C. O. Bender, R. Bonnett, R. G. J. Smith; *Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, **1972**, 771-776.
- ²⁷ A. Vogler, H. Kunkely; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **1978**, 17, 760.
- ²⁸ a) V. N. Kopranev, A. M. Vorotnikov, T. M. Ivanova, E. A. Luk'yanet's; *Chem. Heterocyclic Comp.*, **1988**, 24, 1120-1125. b) V. N. Kopranev, E. A. Makarova, S. N. Dashkevich, E. A. Luk'yanet's; *Chem. Heterocyclic Comp.*, **1988**, 24, 630-637. c) V. N. Kopranev, E. A. Makarova, E. A. Luk'yanet's; *Chem. Heterocyclic Comp.*, **1988**, 24, 394-398.
- ²⁹ D. E. Remy; *Tetrahedron Lett.*, **1983**, 24, 1451-1454.
- ³⁰ a) L. Edwards, M. Gouterman, C. B. Rose; *J. Am. Chem. Soc.*, **1976**, 98, 7638-7641. b) K. Liou, T. P. Newcomb, M. D. Heagy, J. A. Thompson, W. B. Heuer, R. L. Musselman, C. S. Jacobsen, B. M. Hoffman, J. A. Ibers; *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 4517-4523. c) R. B. M. Koehorst, J. F. Kleibeuker, T. J. Schaafsma, D. A. de Bie, B. Geurtsen, R. N. Henrie, H. C. van der Plas; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1981**, 1005-1009.
- ³¹ N. Zh. Mamardashvili, A. S. Semeikin, O. A. Golubchikov; *Russ. J. Org. Chem.* **1994**, 30, 770-773.
- ³² Y. Matsuzawa, K. Ichimura, K. Kudo; *Inorg. Chim. Acta*, **1998**, 277, 151-156.
- ³³ A. M. Vorotnikov, V. N. Kopranev, E. A. Khim. Luk'yanet's; *Geterotsikl. Soedin.*, **1994**, 36-39.
- ³⁴ M. G. H. Vicente, A. C. Tomé, A. Walter, J. A. S. Cavaleiro; *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 3639-3642.
- ³⁵ D. H. R. Barton, J. Kervagoret, S. Z. Zard; *Tetrahedron*, **1990**, 46, 7587-7598.
- ³⁶ a) D. P. Arnold, L. Burgess-Dean, J. Hubbard, M. A. A. Rahman; *J. Chem.* **1994**, 47, 969-974. b) G. Haake, D. Struve, F. P. Montforts, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 9703-9704.
- ³⁷ S. Ito, T. Murashima, H. Uno, N. Ono; *Chem. Commun.*, **1998**, 1661-1662.
- ³⁸ a) V. N. Kopranev, S. N. Dashkevich, E. A. Luk'yanet's; *J. Gen. Chem. USSR*, **1981**, 51, 2165. b) S. A. Vinogradov, D. F. Wilson; *J. Chem. Soc., Perkin Trans 2*, **1995**, 103-111.

- ³⁹ K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, Y. Toba, M. Fukui, O. Ohno; *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 186, 95-101.
- ⁴⁰ a) K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, M. Fukui, O. Ohno; *Inorg. Chim. Acta* **1990**, 176, 31-33. b) M. Yasuike, K. Koseki, T. Yamaoka, K. Ichimura, M. Sakuragi, O. Ohno, *Ibid.*, **1991**, 183, 9-13. c) M. Yasuike, T. Yamaoka, O. Ohno, K. Ichimura, H. Morii, M. Sakuragi, *Ibid.*, **1991**, 185, 39-47. d) R. J. Cheng; Y. R. Chen, C. E. Chuang; *Heterocycles*, **1992**, 34, 1-4.
- ⁴¹ K. Ichimura, M. Sakuragi, H. Morii, M. Yasuike, M. Fukui, O. Ohno; *Inorg. Chim. Acta*, **1991**, 182, 83-86.
- ⁴² (a) O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, I. P. Beletskaya, S. A. Vinogradov; *Chem. Commun.*, **2001**, 261-262. b) O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, P. J. Carroll, S. A. Vinogradov; *J. Org. Chem.*, **2003**, 68, 7517-7520. c) O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, I. P. Beletskaya, P. J. Carroll, S. A. Vinogradov; *J. Org. Chem.*, **2004**, 69, 522-535.
- ⁴³ Fisher, H. Pfeiffer; *Liebigs Ann. Chem.*, 556, **1944**, 131-153.
- ⁴⁴ C. Brückner, D. Dolphin; *Tetrahedron Lett.*, 36(19), **1995**, 3925-3928, 24.
- ⁴⁵ H.W. Whitlock, R. Hanauer, M.Y. Oester, B.K. Bower; *J. Org. Chem.*, 33(5), **1968**, 2169-2171.
- ⁴⁶ R. Bonnet, M.J. Dimsdale, G.F. Stephenson; *J. Chem. Soc.*, **1969**, 564-570, 25.
- ⁴⁷ M. Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F. Hillenkamp; *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 78, 53-68.
- ⁴⁸ F. Rusconi, J. M. Schmitter; *Analisis Magazine*, **1998**, 26, 13-17.
- ⁴⁹ E. D. Becker, R. B. Bradley; *J. Chem. Phys.*, **1959**, 31, 1413-1414.
- ⁵⁰ J. M. Craig; *The Porphyrins Handbook*, vol. 5, Ed. K. M. Kadish, K. M. Smith, R. Guilard, **1999**.
- ⁵¹ R. J. Abraham, G. E. Hawkes, M. F. Hudson, K. M. Smith; *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1975**, 3, 204-211.
- ⁵² J. T. Groves, T. E. Nemo, R. S. Myers; *J. Am. Chem. Soc.*, **1979**, 101, 1032-1033.
- ⁵³ J. M. Lehn, M. Kirch, J. P. Sauvage, R. Ziessel; *La Recherche*, **1980**, 11, 203-205.
- ⁵⁴ S. Ohkuma; T. Yamashita; *Two-photon sensitized polymerization of vinyl ethers via electron transfer of ZnTTBP*, *J. Photopolym. Sci. Technol.* Vol.15, N°1, **2002**.
- ⁵⁵ N. F. Finsen; *Phototherapy. London: Arnold*, **1901**.
- ⁵⁶ A. H. Jesioneck; *von Tappeiner, Munch. Med. Wochenschr.*, **1903**, 41, 2042-2051.
- ⁵⁷ W. Hausmann; *Biochem. Z.*, **1910**, 30, 276-316.
- ⁵⁸ A. Policard, A. Leulier; *C. R. Acad. Sci. Soc. Biol.*, **1924**, 91, 1423-1424.
- ⁵⁹ F. H. J. Figge, G. S. Weiland, L. O. J. Manganiello; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **1948**, 68, 640-641.
- ⁶⁰ R. L. Lipson, E. J. Baldes; *Arch. Dermatol.*, **1960**, 82, 508-516.
- ⁶¹ T. J. Dougherty; *J. Natl. Cancer Inst.*, **1974**, 52, 1133-1136.
- ⁶² K. R. Weishaupt, C. J. Gomer, T. J. Dougherty; *Cancer Res.*, **1976**, 36, 2326-2329.
- ⁶³ T. J. Dougherty; W. R. Potter, K. R. Weishaupt; *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1984**, 170, 301-314.
- ⁶⁴ I. J. Mac Donalds; T. J. Dougherty; *Basic principles of photodynamic therapy, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2001**, 5, 105-120
- ⁶⁵ N. Kaul, H. J. Forman; *Toxicology of Human Environment*, **2000**, 311-335.
- ⁶⁶ C. S. Foote; *Photochem. Photobiol.*, **1991**, 54, 659.
- ⁶⁷ E. D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brückner; *Tetrahedron*, **1998**, 54, 4151-4202.
- ⁶⁸ J. Moan; *Photochem. Photobiol.*, **1990**, 6, 343-347.
- ⁶⁹ W. Henderson, T. J. Dougherty; *Photochem. Photobiol.*, **1992**, 55, 145-147.
- ⁷⁰ M. M. Ressler, R. K. Pandey; *CHEMTECH*, **1998**, 28, 39-45.
- ⁷¹ R. Bonnett, B. D. Djelal, A. Nguyen; *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **2001**, 5, 652-661.
- ⁷² 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. Urol.*, **2002**, 168, 1427-1432.
- ⁷³ 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.
- ⁷⁴ G. A. Kostenich, I. N. Zhuravkin, E. A. Zhavrid; *Photochem. Photobiol.*, **1994**, 22, 211-217.
- ⁷⁵ K. Aizawa, T. Okunaka, T. Othani, H. Kawabe, Y. Yasunaka, S. O'Hata, N. Ohtomo, K. Nishimiya, C. Konaka, H. Kato, Y. Hayata, T. Saito; *Photochem. Photobiol.*, **1987**, 46, 789-793.
- ⁷⁶ T. J. Dougherty; *Photochem. Photobiol.*, **1993**, 58, 895-900.
- ⁷⁷ S. H. Selman, D. Albrecht, R. W. Keck, P. Brennan, S. Kond; *J. Urology*, **2001**, 165, 1795-1801.
- ⁷⁸ M. Kreimer-Birnbaum; *Seminars in Hematology*, **1989**, 26, 157-173.
- ⁷⁹ J. L. Sessler, R. A. Miller; *Biochem. Pharm.*, **2000**, 59, 733-739.
- ⁸⁰ A. Harriman, B. G. Maiya, T. Murai, G. Hemmi, J. L. Sessler, T. E. Thomas; *J. Chem. Soc. Chem. Comm.*, **1989**, 5, 314-316.
- ⁸¹ C. J. Kelty, N. J. Brown, M. W. R. Reed, R. Ackroyd; *Photochem. Photobiol.*, **2002**, 1, 158-168.
- ⁸² 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.
- ⁸³ D. A. James, N. Swamy, N. Paz, R. N. Hanson, R.I. Ray; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1999**, 9(16), 2379-2384

- ⁸⁴ R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J. F. Mueller, M. Barberi-Heyob; *Bioorg. & Med. Chem.*, **2005**, 13(8), 2799-2808.
- ⁸⁵ M. Auvinen, A. Paasinen-Sohns, A. Kangas, L. Kangas, O. Saksela, L. C. Andersson, E. Holta; *Cancer Res.*, **1997**, 57, 3016-3025.
- ⁸⁶ V. Catros-Quemener, L. Chamailard, F. Bouet; *médecine/sciences*, **1999**, 15, 1078-1085.
- ⁸⁷ L. Chamailard, V. Quemener, R. Havouis, J. P. Moulinoux; *Anticancer Res.*, **1993**, 13, 1027-1033.
- ⁸⁸ N. Seiler, S. Sarhan, C. Grauffel, R. Jones, B. Knodgen, J. P. Moulinoux; *Cancer Res.*, **1990**, 50, 5077-5083.
- ⁸⁹ V. Quemener, J. P. Moulinoux, R. Havouis, N. Seiler; *Anticancer Res.*, **1992**, 12, 1447-1453.
- ⁹⁰ O. Phanstiel IV, H. L. Price, L. Wang, J. Juusola, M. Kline, S. M. Shah; *J. Org. Chem.*, **2000**, 65, 5590-5599.
- ⁹¹ a) J. L. Holley, A. Mather, R. T. Wheelhouse, P. M. Cullis, J. A. Hartley, J. P. Bingham, G. M. Cohen; *Cancer Res.*, **1992**, 52, 4190-4195. b) G. M. Cohen, P. M. Cullis, J. A. Hartley, A. Mather, M. C. R. Simons, R. T. Wheelhouse; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1992**, 298-300.
- ⁹² V. Sol, F. Lamarche, G. Garcia, M. Enache, R. Granet, M. Guilloton, J.C. Blais, P. Krausz *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 1364-1377.
- ⁹³ G. Garcia, V. Sol, F. Lamarche, R. Granet, M. Guilloton, Y. Champavier, P. Krausz; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**, 16, 3188-3192.
- ⁹⁴ a) C. keda, M. Monsigny, *Invasion and Metastasis*, **1986**, 6, 347-366. b) M. Monsigny, A. C. Roche, P. Midoux, C. Kiedaet, R. Mayer; in *Lectins and glycoconjugates in oncology : structure, function, clinical application*, eds : H. J. Gabius, G. A. Nagel, Springer-Verlag Heidebberg, **1988**, 25-47.
- ⁹⁵ A. Gabizon, D. Papahadjopoulos; *Proc. Natl. Sci. USA*, **1988**, 85, 6949-6953.
- ⁹⁶ K. R. Adams, M. C. Berenbaum, R. Bonnet, A. N. Nizhnik, A. Salgado, M. A. Vallès; *J. Chem. Perkin Trans.*, **1992**, 1, 1465-1470.
- ⁹⁷ G. Csik, E. Balog, I. Voszka, F. Tolgyesi, D. Oulmi, Ph. Maillard, M. Momenteau; *Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology*, **1998**, 44(3), 216-224.
- ⁹⁸ a) A. F. Mironov, G. M. Isaeva, V. I. Shvets, R. P. Evstihneeva, A. N. Stepanov, A. A. Perov, S. E. Kupriyanov; *Inoganickeiaya. Khimia*, **1978**, 4, 1410-1413. b) R. Bonnett, A. N. Nizhnik, M. Berenbaum; *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 1822-1823. c) G. Fülling, D. Schröder, B. Franck, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1990**, 28, 1519. d) A. Bourhim, S. Czernercki, P. Krausz, A. Viari, P. Vigny; *Carbohydr. Chem.*, **1990**, 9, 761-765. e) J. H. Fuhrhop, C. Demoulin, C. Boettcher, J. Köning, U. Siggel; *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 4159-4165.
- ⁹⁹ a) M. B. Gonzalez, A. C. Weedon, *Can J. Chem.*, **1984**, 63, 602-608. b) Ph. Maillard, J. L. Guerin-Kern, M. Momenteau, S. Gaspard, *J. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 9125-9127. c) Y. Kuroda, T. Hiroshige, T. Sera et H. Ogoshi, *Carbohydr. Res.*, **1989**, 192, 347-350. d) K. Driaf, P. Krausz, B. Verneuil, M. Spiro, J. C. Blais et G. Bolbach; *Tetrahedron Lett.*, **1993**, 34, 1027-1030. e) A. Bourhim, O. Gaud, R. Granet, P. Krausz, M. Spiro; *Synlett*, **1993**, 563-564.
- ¹⁰⁰ Utilisation de la métathèse des alcènes pour la synthèse de porphyrines O- et C-glycosylées éthyléniques- Application à la photothérapie dynamique. *Thèse soutenue par L. Gachard-Bouty*, Université Limoges, LCSN, **2003**.
- ¹⁰¹ a) Y. Kuruda, T. Hiroshige, T. Sera, Y. Shirowa, H. Tanaka et H. Ogoshi; *J. Am. Chem. Soc.*, **1989**, 111, 1912. b) L. Czuchajowski, H. Li; *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 1629-1630. c) Y. Kuruda, H. Ogoshi; *Synlett*, **1994**, 319-324.
- ¹⁰² a) N. Ono, M. Bougauchi, K. Maruyama; *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 33, 1629-1632. b) G. Casiraghi, M. Cornia, G. Rassu, C. Del Sante, P. Spanu, *Tetrahedron Lett.*, **1992**, 48, 5619-5928. c) M. Cornia, G. Casiraghi, S. Binacchi, F. Zanardi et G. Rassu; *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 1226-1230. d) G. Casiraghi, M. Cornia, F. Zanardi, G. Rassu, E. Ragg, R. Bortolini; *J. Org. Chem.*, **1994**, 59, 1801-1808.
- ¹⁰³ G. Zheng, A. Graham, M. Shibata, J. R. Missert, A.R. Oseroff, T. J. Dougherty, R. K. Pandey; *Journal of Organic Chemistry*, **2001**, 66(26), 8709-8716.
- ¹⁰⁴ I. Laville, S. Pigaglio, J.C. Blais, F. Doz, B. Looock, P. Maillard, D. S. Grierson, J. Blais, *Journal of Medicinal Chemistry* **2006**, 49(8), 2558-2567.
- ¹⁰⁵ V. Sol, J. C. Blais, V. Carre, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz; *Journal of Organic Chemistry*, **1999**, 64(12), 4431-4444.
- ¹⁰⁶ V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz; *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 5295-5299.
- ¹⁰⁷ M. T. Tarrago-Trani, S. Jiang; K. C. Harich; B. Storrie; *Photochemistry and photobiology*, **2006**, 82(2), 527-37
- ¹⁰⁸ G. Soubrane, N. M. Bressler; *Br. J. Ophthalmol.*, **2001**, 85, 483-495.
- ¹⁰⁹ K. J. Messmer, S. R. Abel; *Ann. Pharmacother.*, **2001**, 35, 1593-1598.
- ¹¹⁰ V. Sol, P. Branland, V. Chaleix, R. Granet, M. Guilloton, F. Lamarche, B. Verneuil, P. Krausz; *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2004**, 14, 4207-4211.
- ¹¹¹ K. O'Riordan, O. E. Akilov, T. Hasan; *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2005**, 2, 247-262.
- ¹¹² G. Bertoloni, F. M. Lauro, G. Cortella, M. Merchat; *Biochem. Biophys. Acta*, **2000**, 1475, 169-174.

- ¹¹³ Y. Nitzan, H. Ashkenazi; *Curr. Microbiol.*, **2001**, 42, 408-414.
- ¹¹⁴ D. W. Dixon, A. F. Gill, L. Giribabu, A. N. Vzorov, A. B. Alam, R. W. Compas; *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99, 813-821.
- ¹¹⁵ B. Mestre, A. Jakobs, G. Pratiel, B. Meunier; *Biochemistry*, **1996**, 35, 9140-9149.
- ¹¹⁶ a) S. B. Brown, T. G. Truscott, *Chem. Br.*, **1993**, 29, 955-958. b) R. Bonnett, *Chem. Soc. Rev.* **1995**, 24, 19-33. c) L. R. Milgrom, S. MacRobert, *Chem. Br.* **1998**, 34 (35), 45-50.
- ¹¹⁷ a) J. Fabian, H. Nakazumi, M. Matsuoka, *Chem. Rev.* **1992**, 92, 1197-1226. b) S. Anderson, H. L. Anderson, J. K. M. Sanders; *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 469-475. c) R. W. Wagner, T. E. Johnson, J. S. Lindsey; *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, 118, 11166-11180. d) M. J. Crossley, P. L. Burn; *J. Chem. Commun.*, **1991**, 1569-1571.
- ¹¹⁸ a) E. J. Vogel; *Heterocyclic Chem.* **1996**, 33, 1461. b) P. J. Chmielewski, L. Latos-Grazynski, K. Rachlewicz, T. Glowiak; *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.* **1994**, 33, 779-781. c) H. Furuta, T. Asano, T. J. Ogawa; *Am. Chem. Soc.* **1994**, 116, 767-768. d) S. J. Narayanan, A. S. Sridevi, T. K. Chandrasekar, R. Roy; *Tetrahedron Lett.* **1998**, 39, 7389-7392.
- ¹¹⁹ J. Ayub, D. Dolphin; *Chem Rev.*, **1997**, 97, 2267-2346.
- ¹²⁰ F. P. Montforts, B. Gerlach, F. Höper; *Chem. Rev.*, **1994**, 94, 327-347.
- ¹²¹ a) R. J. Cheng, Y. R. Chen, S. L. Wang, C. Y. Cheng; *Polyhedron* **1993**, 12, 1353. (b) O. S. Finikova, A. V. Cheprakov, P. J. Carroll, S. Dalosto, S. A. Vinogradov; *Inorg. Chem.*, **2002**, 41, 6944-6946.
- ¹²² C. W. Porter, J. Miller, R. J. Bergeron; *Cancer Res.*, **1984**, 44, 126-128.
- ¹²³ a) I. Sylvain, R. Benhaddou, V. Carre, S. Cottaz, H. Driguez, R. Granet, M. Guilloton, P. Krausz; *J. Porphyrins Phthalocyanines*, **1999**, 3(1), 1-4.
- ¹²⁴ K. Berg, J. C. Bommer, J. Moan; *Cancer Lett.*, **1989**, 44(1), 7-15.
- ¹²⁵ a) J. H. P. Utley, G. G. Rozenberg; *Tetrahedron*, **2002**, 58, 5251-5265. b) C. Inisan, J. Y. Sailard, R. Guilard, A. Tabard, Y. Le Mest; *New J. Chem.*, **1998**, 22, 823-830.
- ¹²⁶ a) C. J. Medforth, M. D. Berber, K. M. Smith, J. A. Shelnutt; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 3719-3722. b) C. J. Medforth, K. M. Smith; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 5583-5586. c) K. M. Barkigia, M. D. Berber, J. Fajer, C. J. Medforth, M. W. Renner, K. M. Smith; *J. Am. Chem. Soc.*, **1990**, 112, 8851-8857. d) J. Takeda, T. Ohya, M. Sato; *Inorg. Chem.*, **1992**, 31, 2877-2880.
- ¹²⁷ A. E. Pegg; *Cancer Res.*, **1988**, 48, 759-774.
- ¹²⁸ H. M. Wallace, A. V. Fraser, A. Hughes; *Biochem. J.*, **2003**, 376, 1-14.
- ¹²⁹ U. Bachrach; *Amino Acids*, **2004**, 26, 307-309.
- ¹³⁰ H. Deng, V. A. Bloomfield; *Biophys. J.*, **1999**, 77, 1556-1561.
- ¹³¹ C. O. Fernandez, G. Buldain, K. Samejima; *Biochim. Biophys. Acta*, **2000**, 1476, 324-330.
- ¹³² A. Ahmed Ouameur, E. Mangier, S. Diamantoglou, R. Rouillon, R. Carpentier, H. A. Tajmir-Riahi; *Biopolymers*, **2004**, 73, 503-509.
- ¹³³ H. M. Zhang, J. N. Rao, X. Guo, L. Liu, T. Zou, D. J. Turner, J. Y. Wang; *J. Biol. Chem.*, **2004**, 279, 2539-2547.
- ¹³⁴ T. A. Sharma, I. J. Reynolds; *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **1999**, 289, 1041-1047.
- ¹³⁵ F. Schuber; *Biochem. J.*, **1989**, 260, 1-10.
- ¹³⁶ R. J. Bergeron, P. S. Burton, K. A. McGovern, S. J. Kline; *Synthesis*, **1981**, 732-733.
- ¹³⁷ R. J. Bergeron, Y. Feng, W. R. Weimar, J. S. McManis, H. Dimova, C. Porter, B. Raisler, O. Phanstiel; *J. Med. Chem.*, **1997**, 40, 1475-1494.
- ¹³⁸ J. B. Hansen, M. C. Nielsen, U. Ehrbar, O. Buchardt; *Synthesis*, **1982**, 404-405.
- ¹³⁹ M. C. O'Sullivan, D. M. Dalrymple; *Tetrahedron Lett.*, **1995**, 36, 3451-3452.
- ¹⁴⁰ B. Kellam, B. W. Bycroft, S. R. Chhabra; *Tetrahedron Lett.*, **1997**, 38, 4849-4852.
- ¹⁴¹ J. A. Scalfani, M. T. Maranto, T. M. Sisk, S. A. Van Arman; *J. Org. Chem.*, **1996**, 61, 3221-3222.
- ¹⁴² M. L. Edwards, D. M. Stemerick, J. R. McCarthy; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 3417-3420.
- ¹⁴³ I. Levchine, P. Kajan, M. Borloo, W. Bollaert, A. Haemers; *Synthesis*, **1994**, 1, 37-39.
- ¹⁴⁴ O. Rosenheim; *Biochem. J.*, **1924**, 18, 1265-1272.
- ¹⁴⁵ P. P. Kung, R. Bharadwaj, A. S. Fraser, D. R. Cook, A. M. Kawasaki, P. D. Cook; *J. Org. Chem.*, **1998**, 63, 1846-1852.
- ¹⁴⁶ R. Sundaramoorthi, C. Marazano, J. L. Fourrey, B. C. Das; *Tetrahedron Lett.*, **1984**, 25, 3191-3194.
- ¹⁴⁷ a) B. Castro, J. R. Dormoy, G. Evin, C. Selve; *Tetrahedron Lett.*, **1975**, 14, 1219-1222. b) J. Coste, D. Le-Nguyen, B. Castro; *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 205-208.
- ¹⁴⁸ E. Fischer *Chem. Ber.* **1893**, 26, 2400-2410
- ¹⁴⁹ B. Fischer, A. Nudelman, M. Ruse, J. Herzig, H. E. Gottlieb; *J. Org. Chem.* **1984**, 49, 4988-4993.
- ¹⁵⁰ A. Michael, *Am. Chem. J.*, **1879**, 1, 305.
- ¹⁵¹ W. Koenigs, E. Knorr, *Chem. Ber.*, **1901**, 34, 957.
- ¹⁵² E. Fischer; Raske K. *Ber.*, **1909**, 42, 1465-1476.
- ¹⁵³ F. Mauthner; *J. Prakt. Chem.*, **1915**, 91, 174-179.

- ¹⁵⁴ a) T. Ogawa, M. Matsui, *Carbohydr. Res.*, **1976**, 51, 13-18., b) A. Lubineau, A. Malleron, *Tetrahedron Lett.*, **1985**, 26, 1713-1716. c) S. Kobayashi, K. Koide, M. Ohno, *Tetrahedron Lett.*, **1990**, 31, 2435-2438. d) K. C. Nicolaou, C. W. Hummel, Y. Iwabuchi, *J. Am. Chem. Soc.*, **1992**, 114, 3126-3128.
- ¹⁵⁵ a) K. Toshima, K. Tatsuta; *Chem. Rev.*, **1993**, 93(4), 1503-1531. b) C. Kaldapa, J. C. Blais, V. Carre, R. Granet, V. Sol, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz; *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41(3), 331-335.
- ¹⁵⁶ a) S. Trombotto, A. Bouchu, G. Descotes, Y. Queneau; *Tetrahedron Lett.* ; **2000**, 41(43), 8273-8277. b) Y. Queneau, J. Fitremann, S. Trombotto; *C.R. Chimie*, **2004**, 177-188.
- ¹⁵⁷ a) D.H.R. Barton, G.F. Laws, *J. Chem. Soc.*, **1954**, 52; b) G. Ohloff ; *Pure Appl. Chem.*, **1975**, 43, 481-502.
- ¹⁵⁸ S. Banfi, E. Curuso, S. Caprioli, L. Mazzagatti, G. Canti, R. Ravizza, M. Gariboldi, E. Monti; *Bioorg. Med. Chem.*, **2004**, 12, 4853-4860.
- ¹⁵⁹ O. Hammer, D. Harper, P. Ryan; Past: paeleontological statistics software package for education and data analysis paleontologia electronica, **2001**, 4, 9.
- ¹⁶⁰ Nagarajan, S.; Ganem, B. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 5725-5737.
- ¹⁶¹ N. H. Low, P. Sporns; *J. Food Sci.*, **1988**, 53, 558-561.
- ¹⁶² J. Cheetham; *Methods in enzymology*, **1987**, 136, 432-454.
- ¹⁶³ W. Lichtenthaler, P. Pokinskyj, S. Immel; *Zuckerind.*, **1996**, 121, 174-190.
- ¹⁶⁴ Y. Nagai-Miyata, K. Tsuyuki, T. Sugitani, T. Ebashi, Y. Nakajima; *Biosci. Biotech. Biochem.* **1993**, 57, 2049-2053.
- ¹⁶⁵ a) C. Venturello, M. Ricci; *J. Org. Chem.*, **1986**, 51, 1599-1602. b) M. Floor, K. M. Schenk, A. P. G. Kieboom, H. Van Bekkum; *Starch/Stärke*, **1989**, 41, 303-309.

Résumé

Benzoporphyrines polyaminées et glycosylées. Synthèses et tests biologiques.

Ce travail porte sur la synthèse multi-étapes, la caractérisation et l'évaluation biologique de nouveaux photosensibilisateurs vectorisés conçus pour une utilisation potentielle en photothérapie dynamique des cancers. Nous avons élaboré plusieurs tétrabenzoporphyrines symétriques substituées par quatre polyamines ou quatre molécules de glucose, dans le but d'augmenter leur sélectivité pour les cellules cancéreuses. Ces dérivés de benzoporphyrines ont été obtenus suivant deux approches distinctes. Ainsi, la fixation des vecteurs (spermidine, spermine, α -D-glucose ou β -D-glucose) a été effectuée soit en fin de synthèse, directement sur le précurseur macrocyclique, soit dans la phase initiale, sur le synthon aldéhydique. Tous les produits finaux obtenus ont révélé leur aptitude à produire de l'oxygène singulet en présence de lumière visible ; finalement, des tests de viabilité cellulaire ont été réalisés, *in vitro*, sur deux lignées cancéreuses humaines (MCF-7 et HaCaT).

Abstract

Polyaminated and glycosylated benzoporphyrins. Synthesis and biological tests.

This work reports the multi-step synthesis, characterization and biological evaluation of new vectorized photosensitizers designed for their potential use in phototherapy of cancers. This series of molecules consisted in symmetrical tetrabenzoporphyrins to which four glucosyl or polyamine units have been attached in order to increase their selectivity for cancer cells. These benzoporphyrin derivatives were obtained through two distinct approaches: attachment of the vectors (spermidine, spermine, α -D-glucose or β -D-glucose) has been carried out either at the very end of synthesis, on the macrocyclic precursor, or during the initial step, on the aldehydic synthon. All of these final products have proved their ability to produce singlet oxygen in the presence of visible light, and their effects on cell viability have been tested, *in vitro*, on two human cancer cell lines (MCF-7 and HaCaT).

Mots clefs

tetrabenzoporphyrine, polyamine, spermine, spermidine, D-glucose, photothérapie dynamique