

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté des Sciences et Techniques
École doctorale Sciences pour l'environnement ED n°523
Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Thèse N°

THÈSE

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES
Mention "Chimie Appliquée"

Présentée par

JEAN PIERRE MBAKIDI

***Élaboration et caractérisation de nouvelles
nanoparticules superparamagnétiques à motifs
porphyriniques pour une application en photothérapie
dynamique des cancers***

Sous la direction de Vincent SOL et de Robert GRANET

Soutenue publiquement le 14 décembre 2011 devant la commission d'examen

Rapporteurs :

M. Jean-Olivier DURAND, *Chargé de Recherche (HDR)*, Université Montpellier II

M. Gilles LEMERCIER, *Professeur*, Université de Reims

Examineurs :

M. Eric RIVIERE, *Ingénieur de Recherche*, Université de Paris-Sud 11

M. Vincent SOL, *Professeur*, Université de Limoges

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

M. Thomas SILOU, *Professeur*, Université Marien Ngouabi (CONGO Brazzaville)

Invité :

M. Robert GRANET, *Ingénieur de Recherche*, Université de Limoges

Remerciements

Ces trois années passées au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de l'Université de Limoges représentent pour moi une riche expérience scientifique, professionnelle et humaine. Je tiens donc à remercier tout d'abord trois personnes qui ont été les acteurs de ce travail. Mon ancien Directeur de Laboratoire le Professeur Pierre Krausz pour m'avoir offert l'opportunité de développer un projet, et surtout de la confiance que vous m'avez accordée en me permettant de présenter mes travaux à plusieurs congrès et votre suivi au quotidien de l'avancement de mes travaux. Mes remerciements chaleureux à mon encadreur et nouveau Directeur de Laboratoire, le Professeur Vincent Sol; votre disponibilité, votre rigueur scientifique et vos remarques pertinentes m'ont permis de faire évoluer mes travaux. Merci de m'avoir fait part de votre riche connaissance en chimie organique et particulièrement en chimie des porphyrines que vous m'avez fait connaître dès ma première année de Master ; veuillez trouver ici, Professeur, Vincent, les marques de ma profonde reconnaissance et de mon plus grand respect. Mes profonds remerciements à « le druide » de laboratoire, Monsieur Robert Granet, comme j'aime l'appeler, sans qui ces années n'auraient pas eu la même saveur à cause de votre encadrement et nos longues discussions professionnelles et amicales ; veuillez trouver ici le signe de ma reconnaissance. Votre culture scientifique et générale, intarissables, ont longuement animé les discussions de pause café ; j'en garderai d'excellents souvenirs.

Je suis très sensible de l'honneur que m'ont fait Messieurs les Professeurs Jean – Olivier Durand et Gilles Lemerrier en acceptant d'être rapporteur de ces travaux de thèse. Veuillez trouver ici les marques de ma profonde reconnaissance.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit du professeur Thomas Silou et de Monsieur Eric Rivière pour avoir accepté de juger ce travail en qualité d'examineurs. Je tiens à remercier Monsieur Erik Rivière pour avoir effectué les mesures de magnétisme de tous mes composés.

J'adresse mes profonds remerciements au Professeur Rachida Zerouki, pour vos conseils et encouragements que vous n'aviez cessé de me prodiguer.

Mes remerciements aussi au Professeur Michel Guilloton pour tout le temps consacré à la correction de mes résumés de communication.

Je remercie le Docteur Yves Champavier pour avoir effectué les analyses RMN et le Docteur Sandra Alvès pour les analyses en spectrométrie de masse de tous mes composés; veuillez trouver ici mes remerciements et mon profond attachement ; sans oublier Christophe Niniven pour les analyses thermogravimétriques ainsi que Pierre Carles pour la microscopie électronique à balayage ; qu'ils trouvent également l'expression de toute ma reconnaissance.

Je n'oublie pas de remercier le docteur Céline Frochot, pour avoir réalisé les mesures de rendement quantique en oxygène singulet des photosensibilisateurs.

Mes profonds et sincères remerciements au Professeur Philippe Bressolier ainsi qu'au Docteur Ouk Sothéa Tan pour leur grande disponibilité et leur rigueur scientifique, sans quoi ce travail n'aurait pas eu la finalité escomptée. Mes remerciements vont également à tous les membres de l'IUT génie biologie du Limousin pour votre accueil et bonne atmosphère au sein de votre équipe.

Je remercie aussi tous les thésards et l'ensemble des membres du LCSN pour leur multi forme aide et soutien précieux tout au long de la rédaction de ma thèse.

Un grand merci à Monsieur Duroud et Calliste pour leur soutien et encouragement tout au long de cette thèse.

Je remercie ceux qui de loin ou de près m'ont apporté un soutien constant pour venir aboutir de ce travail combien exaltant.

Mes chères parents,

Mes parents, vous avez toujours cru en moi. Je vous dédie tout simplement ce travail. Je vous remercie de l'encouragement inébranlable que vous m'avez apporté. Comme je le dis souvent mon équipe préférée de foot : mes cinq frères (Horsini, Davy, Hubert, Emard et Patou) et mes deux entraîneurs (mon père et ma mère), c'est grâce à vous que j'ai pu arriver jusque là ; je vous en serai éternellement reconnaissant. J'adresse mes profonds remerciements à tous les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu, mes tantes et oncles paternels et maternels et sans oublier KOKO OYOUROU, notre grande mère ce travail je te le dédie personnellement. Mes cousins (Vianey, Fanny ...) et cousines (ma petite galia, Harrielle...), mes belles sœurs (Roquéline, Neffertiti et Ornellia).

Ma pensée profonde que je dédie à mes amis et à tous mes parents qui ont quitté ce monde :

« Chemin de fer, l'homme doit se battre »

Table des Matières

Table des matières

Introduction générale.....	1
Chapitre I Contexte Biomédical et Stratégie de l'étude.....	5
I- Contexte Biomédical	7
A- Généralités sur la cellule	7
1- Définition.....	7
2- Structure d'une cellule humaine	7
B- La cellule cancéreuse	8
1- Carcinogenèse	8
2- Angiogenèse	10
2-1- Définition.....	10
2-2- Mécanisme de l'angiogenèse tumorale	10
2-3- Facteur de croissance régulateur: VEGF.....	12
3- Bilan historique sur la lutte contre le cancer	13
4- Statistiques du cancer	16
5- Comment faire reculer le cancer ?	17
II- Porphyrines-Nanoparticules : Application en PDT.....	19
A- Photothérapie dynamique et Porphyrines	19
1- Photothérapie dynamique	19
1-1- Rappel historique	20
1-2- Principe de la Photothérapie dynamique et mécanisme photochimique	21
1-3- Les photosensibilisateurs en thérapie photodynamique	23
1-3-1- Les photosensibilisateurs de première génération	24
1-3-2- Les photosensibilisateurs de deuxième génération	25
1-3-3- Les photosensibilisateurs de troisième génération	28
2- Quelques aspects de la chimie des porphyrines	31
2-1- Structure.....	31
2-2- Propriétés spectrales	34
2-2-1- Spectroscopie UV-Visible	34
2-2-2- Résonance magnétique nucléaire	36
2-2-2-1- Spectroscopie RMN du proton	36
2-2-2-2- Spectroscopie RMN du carbone 13	38
2-2-3- Spectrométrie de masse MALDI et ESI.....	38
2-3- Méthodes de synthèse	39
2-3-1- Synthèse de méso-porphyrines.....	40
2-3-2- Synthèse de porphyrines β -substituées	45
2-3-2-1- A partir d'unités monopyrroliques	45
2-3-2-2- A partir d'unités di et tripyrroliques	46
2-3-2-3- A partir d'unités tétrapyrroliques	47
2-3-3- Héli synthèse de porphyrines β -substituées à partir de pigments animaux ou végétaux ..	47
2-3-3-1- A partir des pigments d'origine animale	47
2-3-3-2- A partir des pigments d'origine végétale	48
2-4- Autres Applications	49
B- Nanoparticules magnétiques : Vectorisation, Ciblage et Thérapie thermique	51
1- Les (nano) biotechnologies au service de la médecine	51

1-1-	Vecteurs particuliers de la première génération	51
1-2-	Vecteurs particuliers de la deuxième génération	52
1-2-1-	Systèmes lipidiques	52
1-2-2-	Les nanoparticules lipidiques	55
1-2-3-	Les « quantum dots »	55
1-2-4-	Les nanotubes de carbone	56
1-2-5-	Les nanoparticules d'or	57
2-	Nanoparticules magnétiques : ciblage et thérapie thermique	58
2-1-	Ciblage magnétique	59
2-2-	Thérapie thermique	59
2-3-	Magnétisme des nanoparticules	60
2-4-	Agent de contraste	63
2-4-1-	Principe des agents de contraste	63
2-4-2-	Les agents de contraste utilisés en IRM	64
2-4-2-1-	Les agents de contraste paramagnétiques	65
2-4-2-2-	Les agents de contraste superparamagnétiques	66
III-	Bilan de l'étude bibliographique	68
IV-	Objectifs du travail	69
Chapitre II Nanoparticules d'oxyde de fer substituées par des porphyrines Hydrosolubles.....		71
1-	Introduction	73
2-	Stratégie de synthèse	73
3-	Synthèse des photosensibilisateurs hydrosolubles propargylés	76
3-1-	Synthèse de la porphyrine hydrosoluble propargylée neutre	76
3-1-1-	Synthèse du benzaldéhyde glucoacétylé	76
3-1-2-	Synthèse de la mono <i>para</i> -hydroxyphényl triglucosylporphyrine	77
3-1-3-	Synthèse de la mono-(4-propargyloxyphényl)triglucosylporphyrine	77
3-1-4-	Méallation au zinc de la porphyrine triglucosylée et propargylée	78
3-1-5-	Synthèse de la porphyrine hydrosoluble neutre	79
3-2-	Synthèse de la porphyrine hydrosoluble propargylée anionique	79
3-2-1	Synthèse de la mono-hydroxyl triphénylporphyrine (TPP-OH)	79
3-2-2	Synthèse de la mono-(4-propargyloxyphényl) triphénylporphyrine	80
3-2-3	Synthèse de la porphyrine hydrosoluble anionique	80
3-2-4	Méallation au zinc de la porphyrine hydrosoluble anionique	81
3-3-	Synthèse de la porphyrine hydrosoluble propargylée cationique	82
3-3-1	Synthèse de la mono carboxyphényltripyrindylporphyrine	82
3-3-2	Synthèse de la mono-(4-propargylamido phényltripyrindyl) porphyrine	82
3-3-3	Synthèse de la porphyrine hydrosoluble cationique méallée	84
4-	Caractérisation des porphyrines	84
4-1-	Spectroscopie UV-Visible	84
4-2-	Spectroscopie de fluorescence	86
4-3-	Spectrométrie de masse	87
4-4-	RMN proton	89
5-	Synthèse des Nanoparticules d'oxyde de fer Azidées	96
5-1-	Le dextrane	97
5-1-1-	Propriétés physicochimiques du dextrane	98
5-1-2-	Applications cliniques et biomédicales du dextrane	98
5-2-	Synthèse des Nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées par le dextrane T10	99

5-3-	Azoturation des Nanoparticules d'oxyde de fer	100
6-	Caractérisations des nanoparticules d'oxydes de fer	101
6-1-	Détermination de la distribution en taille	101
6-2-	Propriétés magnétiques	102
6-3-	Mise en évidence du dextrane par spectroscopie IR.....	104
6-4-	Analyse thermogravimétrique(ATG) des nanoparticules	105
6-5-	Analyse élémentaire des nanoparticules simples et azoturées.....	106
7-	Nanoparticules d'oxydes de fer triazolyl porphyriniques	107
7-1-	"Click-Chemistry".....	107
7-1-1-	Cycloaddition 1,3-dipolaires : cas particuliers des azotures et alcynes	108
7-1-2-	Point de vue mécanistique	109
7-2-	Elaboration des nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques.....	111
8-	Caractérisation des nanoparticules d'oxydes de fer triazolyl porphyriniques	113
8-1-	Spectroscopie IR	114
8-2-	Spectroscopie UV-Visible et de fluorescence	115
8-3-	Distribution en taille et morphologie des nanoparticules à motifs porphyriniques	116
8-4-	Propriétés magnétiques des nanoparticules à motifs porphyriniques	118
Chapitre III Nanoparticules superparamagnétiques substituées par des motifs porphyrines – Polyéthylèneimine..... 121		
1-	Introduction	123
2-	Stratégie de synthèse	123
3-	Nanoparticules d'oxyde de fer à motif polyéthylèneimine.....	124
3-1-	Polyéthylèneimine.....	124
3-2-	Propargylation de la Polyéthylèneimine	126
3-3-	Elaboration des nanoparticules d'oxyde de fer à motif Polyéthylèneimine	126
3-4-	Caractérisation de la PEI propargylée et des nanoparticules d'oxyde de fer à motif PEI.....	127
4-	Elaboration des nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques à motifs PEI 600.....	128
4-1-	Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques à motifs PEI 600	128
4-2-	Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques à motifs PEI 600...	130
Chapitre IV Evaluation biologique des photosensibilisateurs en PDT anti - cancéreux 135		
1-	Production d'oxygène singulet.....	137
2-	Photocytotoxicité des molécules synthétisées	138
2-1-	Etude de la cytotoxicité intrinsèque des molécules	140
2-2-	Le Photofrin®	141
3-	Evaluation biologique des photosensibilisateurs synthétisés.....	142
4-	Etude de la pénétration cellulaire des PS.....	145
5-	Conclusion	147
Conclusion générale et perspectives 148		
Chapitre V Partie expérimentale 151		
1-	Réactifs et solvants.....	153
2-	Chromatographie	155
2-1-	Chromatographie analytique.....	155
2-2-	Chromatographie préparative	156

3-	Analyse physico-chimiques	156
3-1-	Ultraviolet – visible.....	156
3-2-	Fluorescence.....	157
3-3-	Infra- rouge.....	157
3-4-	Température de fusion.....	157
3-5-	Analyses élémentaires.....	157
3-6-	Résonance magnétique nucléaire	157
3-7-	Spectrométrie de masse.....	157
3-8-	Analyse thermogravimétrique.....	158
3-9-	Microscopie électronique à transmission	158
3-10-	Rendement quantique d'oxygène singulet (1O_2).....	159
3-11-	Magnétisme.....	159
4-	Synthèses	160
5-	Evaluation biologique.....	187
5-1-	Culture cellulaire	187
5-2-	Evaluation de la photocytotoxicité des molécules synthétisées	187
5-3-	Etude de la pénétration cellulaire des photosensibilisateurs	188
	Produits synthétisés.....	189

Liste des Abreviations

Liste des abréviations

ϵ : coefficient d'absorption molaire

λ : longueur d'onde

ν : nombre d'onde

Φ_{Δ} : rendement quantique en oxygène singulet

Φ_t : rendement de l'état triplet

Φ_f : rendement de fluorescence

5-ALA : acide 5-aminolévulinique

ADN : acide désoxyribonucléique

AMM : autorisation de mise sur le marché

ATG : Analyse thermogravimétrique

CCM : chromatographie sur couche mince

CIS : conversion intern-système

cycloVEGI : peptide cyclique inhibiteur de la croissance endothéliale vasculaire

Coll. : collaborateur

DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-*para*-benzoquinone

DMF : diméthylformamide

DMLA : dégénérescence maculaire liée à l'âge

DMSO : diméthyle sulfoxyde

DOTA : 1, 4, 7, 10 – tétraazacyclododécane-1, 4, 7, 10-tétraacétique acide

éq. : équivalent

ESI : ionisation par électrospray

h : heure

HCCA : α -cyano-4-hydroxycinnamique

Hp : hématorphyrine

HpD : hématorphyrine dérivé

InVS : institut national de veille sanitaire

IR : infrarouge

IRM : imagerie par résonance magnétique nucléaire

J : constante de couplage

K_B : constante de Boltzman

KDR : kinase domain receptor

LCSN : Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

LCST : température critique de solubilité

m/z : rapport masse sur charge

MALDI : désorption-ionisation laser assisté par matrice

MDT : ciblage magnétique des médicaments

MDR : résistance multiple aux médicaments

m-THPC : tétra-(méta-hydroxylphényl) chlorine

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium

min : minute

MMPs : métalloprotéinases matricielle

MEC : matrice extra-cellulaire

MET : microscopie électronique à transmission

M.O : micro-ondes

NHS : N-hydroxysuccinimide

nm : nanomètre

NPM : nanoparticule magnétique

NRPs : neuropilines

PACT : photochimiothérapie antibactérienne

PAS : puissance spécifique absorbée

PBS : phosphate buffer saline

PDT : photothérapie dynamique

PEG : polyéthylène glycol

PEI : polyéthylèneimine

PpIX : protoporphyrine IX

ppm : partie par million

PS : photosensibilisateur

O-THPP : tétra-(ortho-hydroxylphényl)porphyrine

R_f : rapport frontal

RMN : résonance magnétique nucléaire

RGD : peptide arginine-glycine-acide aspartique

SPM : système de phagocytoses mononuclées

SPIO : particules superparamagnétiques d'oxyde de fer

s : singulet

sél. : singulet élargie

d : doublet

dél. : doublet élargie

dd : double doublet

q : quadruplet

m : multiplet

SM : spectrométrie de masse

T₁ : Temps de relaxation longitudinal

T₂ : Temps de relaxation transversal

TA : température ambiante

T_b : température de blocage

T_f : température de fusion

TFA : acide trifluoroacétique

THF : tétrahydrofurane

TMS : tétraméthylsilane

TOF : temps de vol

UV : ultrat-violet

USPIO : ultra-petite particule superparamagnétique d'oxyde de fer

VEGF : facteur de croissance endothéliale vasculaire

uma : unité de masse atomique

Introduction générale

Introduction générale

Actuellement le cancer constitue la première cause de mortalité prématurée en Europe, devant les maladies cardio-vasculaires. D'après les autorités publiques, les trois axes sur lesquels il faut œuvrer pour faire reculer cette pandémie sont :

- ✓ la prévention du grand public sur les causes sociétales comme l'alcoolisme et le tabagisme qui favorisent le développement de la maladie.
- ✓ Le diagnostic pour détecter de manière précoce et précise la maladie afin de proposer aux patients le traitement adéquat.
- ✓ Le traitement qui passe par un meilleur ciblage des cellules tumorales et la lutte contre la dégradation des tissus sains.

La lutte contre le cancer est devenue un enjeu majeur aussi bien d'un point de vue humain qu'économique. De nos jours on note une variété remarquable des techniques de traitement du cancer. La chirurgie associée à la radiothérapie ou à la chimiothérapie demeure un des moyens le plus utilisé. Cependant ces méthodes de traitement utilisent le plus souvent des molécules possédant une toxicité élevée. De plus au niveau des tumeurs et surtout des métastases difficilement accessibles, des réactions secondaires sérieuses peuvent être observées lors de ces traitements. Ces inconvénients ont orienté la recherche vers la mise au point de molécules moins toxiques pour l'organisme, limitant ainsi les effets secondaires des traitements. Ainsi la photothérapie dynamique (PDT) permet de concilier en grande partie la plupart de ces exigences. Elle peut également être utilisée avant et après les méthodes de traitements classiques.

La photothérapie dynamique est une méthode basée sur l'utilisation de photosensibilisateurs qui deviennent phototoxiques en cas d'exposition lumineuse. La cellule cancéreuse est par la suite détruite par une espèce réactive toxique produite au cours de ce processus, l'oxygène singulet. La plupart des photosensibilisateurs utilisés en PDT sont issus des macromolécules tétrapyrroliques telles que les porphyrines. De ce fait trois générations de porphyrines constituent l'arsenal thérapeutique actuel. Nous avons les agents de première génération qui sont des mélanges complexes de porphyrines naturelles, obtenus à partir du sang : l'hématoporphyrine dérivé (HpD) et le Photofrin II[®] disponibles en France depuis 1996. Les photosensibilisateurs introduits par la suite sont synthétiques. Nous pouvons citer comme molécules de seconde génération le Foscan[®] qui est actuellement utilisé dans le traitement des cancers de l'œsophage, du larynx et des poumons. Le manque de photosensibilisateurs à la fois fiables et capable de se concentrer sélectivement dans les cellules cancéreuses a orienté la

recherche vers le développement des molécules tétrapyrroliques hybrides. Ces photosensibilisateurs de troisième génération sont substitués par des motifs de vectorisation et d'adressage. Ces motifs sont généralement des biomolécules telles que des stéroïdes, des sucres, des amines, des acides aminés ou peptides.

La quête des motifs de vectorisation et d'adressage ne s'arrête pas qu'à ces biomolécules. Depuis une dizaine d'années, les nanotechnologies, autrefois utilisées en électronique et informatique, connaissent un fort développement dans le ciblage et le transport des médicaments. Les nanoparticules par un phénomène d'endocytose passive permettent de contourner les problèmes de résistances multiples acquises par les cellules cancéreuses lors des traitements (chimiothérapie, PDT...).

Dans le cadre du programme d'élaboration des nouveaux photosensibilisateurs en PDT entrepris au Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN), nous nous proposons dans le présent travail de fixer de manière covalente par réaction de « Click Chemistry » des porphyrines hydrosolubles (neutres, anioniques et cationiques) sur des nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées par le dextrane. Des polyamines (Polyéthylèneimines) ont par la suite été greffées également par la réaction de « Click Chemistry » afin d'améliorer la pénétration au niveau cellulaire.

Le nouveau type de photosensibilisateur superparamagnétique que nous proposons est composé de trois éléments :

- ✓ Une partie active qui est la porphyrine pour le traitement du cancer ;
- ✓ Un « véhicule », les nanoparticules d'oxyde de fer qui ont pour rôle de porter le principe actif, d'en limiter l'activité en dehors de la cible, et de servir également d'agent de contraste en IRM ou d'agent de nécrose des cellules cancéreuses par hyperthermie ;
- ✓ Un agent internalisant, la polyéthylèneimine qui améliore la pénétration au niveau cellulaire.

La création de cette interface entre chimistes et physico-chimistes a pour objectif le développement des photosensibilisateurs magnétiques dont les caractéristiques peuvent varier selon le type d'application. Les photosensibilisateurs hybrides réalisés dans le cadre de cette étude sont conçus pour être testés selon deux approches différentes :

- ✓ Une approche thérapeutique dans le cadre de la PDT anti cancéreuse, par l'action des porphyrines sous illumination ;
- ✓ Une approche diagnostique, dans le cadre d'une imagerie cellulaire (IRM) par phagocytose des nanoparticules magnétiques.

Enfin, pour évaluer l'activité anti cancéreuse de ces nanoparticules superparamagnétiques à motifs porphyrines, des tests biologiques sur la lignée cellulaire de kératinocytes humains (cellules Hacat) ont été réalisés.

Ce projet a été réalisé en collaboration avec l'institut de Chimie Moléculaire des Matériaux d'Orsay UMR 8182 CNRS de l'Université de Paris – Sud.

Notre objectif est d'améliorer l'efficacité des photosensibilisateurs en PDT anti cancéreux en créant des nanoparticules d'oxyde de fer à motifs porphyriniques qui permettront de coupler thérapie et diagnostic.

Ce manuscrit débute par un Chapitre de revue de la littérature illustrant d'une part la problématique du cancer et les principales thérapies utilisées actuellement et d'autre part quelques généralités sur les porphyrines et les nanoparticules devant être décrites dans ce chapitre.

A la suite de ce chapitre introductif, nous présenterons dans les chapitres 2 et 3 la mise au point d'un protocole expérimental visant à l'élaboration d'abord des nanoparticules d'oxyde de fer à motifs porphyrines et ensuite des nanoparticules d'oxyde de fer substituées par des motifs porphyrines-PEI (polyéthylèimine). Ce chapitre reporte également la caractérisation physico-chimique des nanoparticules obtenues, incluant leurs propriétés photosensibles et magnétiques.

Enfin au chapitre 4 nous évaluerons l'activité biologique de ces nouveaux photosensibilisateurs.

Chapitre I Contexte Biomédical et Stratégie de l'étude

I- Contexte Biomédical

Nous nous proposons dans cette première partie de présenter d'une part quelques généralités sur la cellule normale et cancéreuse avec un bref rappel sur les mécanismes de cancérogenèse. D'autre part quelques statistiques actuelles sur le cancer et un bilan historique sur la lutte contre cette maladie seront décrites.

A- Généralités sur la cellule

1- Définition

La cellule est l'unité de base de tout être vivant à l'exception des virus. Les organismes peuvent être constitués d'une seule cellule (unicellulaire) ou en contenir un nombre plus ou moins important (pluricellulaire).

L'être humain est constitué de plusieurs milliards de cellules. Il comporte de nombreux types de cellules présentant des formes et des caractères différents. En effet les cellules présentent une variété de tailles ; des petits globules rouges qui mesurent $0,76 \mu\text{m}$ aux cellules du foie qui elles peuvent être dix fois plus grandes.

2- Structure d'une cellule humaine

Bien qu'étant considérée comme la plus petite unité d'un organisme vivant, la cellule est constituée de nombreuses parties encore plus petites. En effet la cellule s'isole et se protège du milieu extérieur par une membrane cellulaire. Cette membrane est semi-perméable c'est-à-dire qu'elle laisse passer certains éléments nécessaires à la cellule par osmose et diffusion. Cette membrane est composée d'une bicouche phospholipidique et présente à sa surface des polysaccharides et des protéines. Polysaccharides et protéines servent entre autre de marqueurs cellulaires et de récepteurs pour certaines molécules.

L'élément majeur de la cellule est le noyau cellulaire. Il protège l'ADN (acide désoxyribonucléique) qui est l'élément le plus important dans la cellule. En effet l'ADN porte toutes les informations génétiques. Il détermine ainsi le développement des cellules. Au sein de la cellule, on trouve une organisation avec la présence des différents organites baignant dans un liquide (l'hyaloplasme). Ces organites cellulaires contribuent aussi bien à la production de l'énergie (mitochondrie), à la maturation (appareil de golgi) et la synthèse (réticulum endoplasmique) des protéines (figure 1).

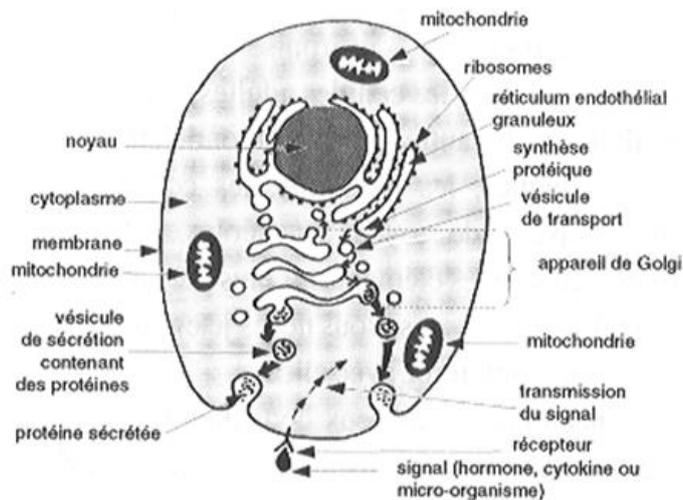


Figure 1 : Structure d'une cellule humaine
[http://biom2osw.com/gcartable/cellules .htm](http://biom2osw.com/gcartable/cellules.htm)

Les cellules vivantes sont généralement confrontées à des stress constants qui sont des réponses de cette dernière ou d'un organisme à des pressions ou des contraintes de la part de son environnement. Ces stress sont potentiellement générateurs de mutations et peuvent aussi générer d'autres types de lésions d'ADN. Dans certains cas ils peuvent conduire à l'obtention d'une cellule présentant des mutations importantes : on parle ainsi de cellules cancéreuses.

B-La cellule cancéreuse

1- Carcinogénèse

La cellule cancéreuse est une cellule qui présente des altérations intimes au sein de sa structure. Elle n'arrête plus de se multiplier, et reste en vie dans un organe où habituellement les cellules saines meurent et se renouvellent.

La capacité de se diviser, de se spécialiser, mais aussi de mourir est inscrite dans le génome de chaque cellule saine. Sous l'influence de facteurs de l'environnement (tabac, le soleil...), de certains agents chimiques ou physiques, ou encore de certains virus, le génome humain subit des altérations, appelées mutations génétiques, qu'il est en mesure de réparer. Lorsque ce système de réparation est défectueux ou débordé, la cellule conserve ces mutations et devient anormale (figure 2).

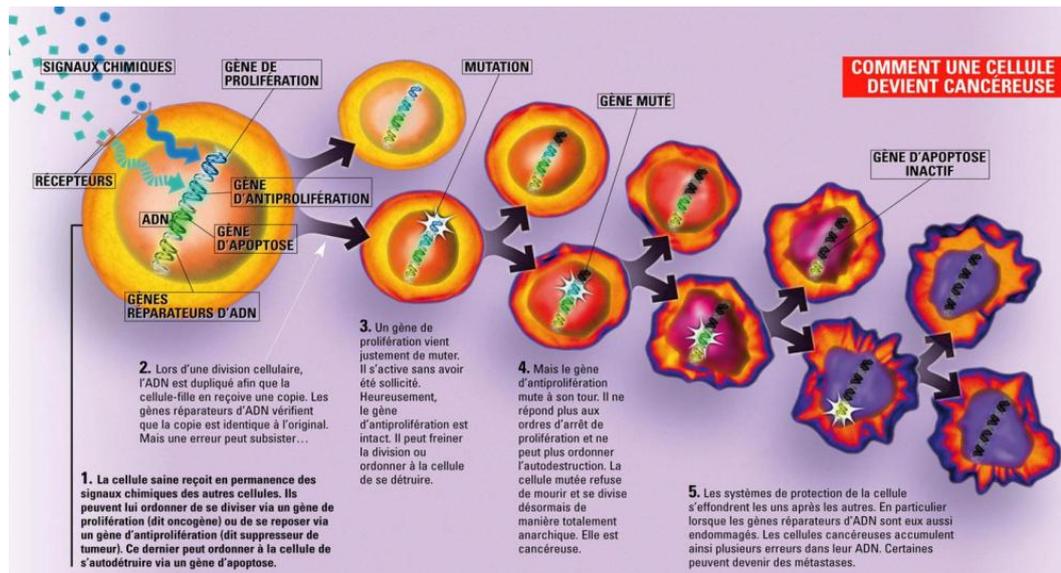


Figure 2 : Mécanisme de carcinogénèse (<http://tpe-cancerogenese.blogspot.com>)

Le cancer attaque ainsi les gènes régulant la croissance et la différenciation cellulaire. Ceux –ci peuvent être classés en trois catégories :

- Les oncogènes : dans le cas d'un cancer les oncogènes, régulateurs positifs de la prolifération cellulaire, deviennent hyperactifs.
- Les gènes réparateurs de l'ADN : ils ont pour rôle, comme leur nom l'indique, de détecter et réparer toute lésion de l'ADN. Ils deviennent à leurs tours inactifs.
- Les gènes suppresseurs de l'ADN : ce sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire (en quelque sorte des freins) et deviennent inactifs chez une cellule cancéreuse.

Ne répondant plus aux signaux environnants, elle échappe à toute régulation. Engagée dans un processus anarchique, elle devient une cellule cancéreuse. Elle ne ressemble plus aux autres cellules voisines (saines) : leur noyau est plus gros, traduisant leur intense activité, parfois leur taille est également plus grande. Les premiers regroupements de cellules sont généralement sans danger car ils restent « sous contrôle ». Ils sont parfois même détruits par le système immunitaire. Il faut un regroupement d'environ 100.000 cellules pour que l'on commence à parler de tumeur. ^[1]

Une tumeur en s'infiltrant devient dangereuse (maligne) pour l'organisme. En effet la cellule cancéreuse peut se « détacher » de la tumeur, migrer dans une autre partie du corps (par le sang ou par la lymphe). Elle détruit ainsi les cellules normales ; créant une nouvelle tumeur : on parle de métastase. Le développement tumoral se poursuivant ; la tumeur peut entrer dans un état dit d'hypoxie et déclenche ainsi l'angiogénèse tumorale. ^[2] Ce développement anarchique des cellules cancéreuses conduit à des altérations des fonctions vitales (respiration, digestion et excrétion) qui peuvent mener dans le cas les plus avancés au décès du patient.

Dans le paragraphe suivant, nous nous attacherons à définir et expliciter les phases métaboliques indispensables au développement tumoral. Il s'agira d'insister sur certains points clés qui seront autant de leviers pour améliorer ou imaginer des thérapies anti-tumorales.

2- Angiogenèse

2-1- Définition

L'angiogenèse est le processus biologique par lequel des nouveaux vaisseaux se forment à partir d'un réseau vasculaire préexistant. ^[2-3] Elle intervient de façon cruciale lors du développement embryonnaire. Ce phénomène physiologique hautement régulé ^[4] se raréfie par la suite et reste localisé dans les tissus, au niveau des zones en réparation, au cours du cycle menstruel ou lors des processus cicatriciels suite à une blessure. ^[5-6] Elle est relativement peu fréquente et très localisée chez l'adulte sain.

Le taux de renouvellement chez un adulte non malade des cellules endothéliales (tapissant les vaisseaux sanguins) est relativement faible ; et de l'ordre de 1000 jours. En effet inducteurs et inhibiteurs coexistent souvent dans les tissus présentant une angiogenèse consécutive. Il existe donc un équilibre naturel entre facteurs pro-et anti-angiogéniques. Lorsqu'un dysfonctionnement des mécanismes du contrôle de l'angiogenèse survient, on assiste au développement et à la progression des maladies variées, notamment inflammatoires ^[7] comme les rétinopathies diabétiques, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) ou le cancer. ^[8]

2-2- Mécanisme de l'angiogenèse tumorale

La réponse biologique des cellules endothéliales à un signal extracellulaire met en évidence l'angiogenèse. En effet la sécrétion de facteurs de croissance par les cellules tumorales, provoque la prolifération des cellules endothéliales qui s'orientent par chimiotactisme vers la cellule cancéreuse en sécrétant des métalloprotéinases matricielle (MMP_s), indispensables à la dégradation de la matrice extra – cellulaire (MEC), constituant ainsi un nouveau capillaire, très perméable.

L'angiogenèse peut se faire par bourgeonnement ou par intussusception (élargissement et séparation de vaisseaux déjà existants). ^[9] Nous nous intéresserons dans ce paragraphe à l'angiogenèse par bourgeonnement qui est la plus répandue.

Au début de la prolifération tumorale, la tumeur d'une taille inférieure à 1 ou 2 mm³, est indépendante de l'angiogenèse. L'apport de l'oxygène et des nutriments est assuré par diffusion simple. [10] On parle de phase dormante ou avasculaire.

Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intratumoral est généré. Les carcinomes *in situ* acquièrent ainsi un phénotype angiogénique ; intervient un « Switch » angiogénique. Ce « Switch » angiogénique résulte de la rupture de l'équilibre préexistant entre facteurs anti-angiogéniques et pro-angiogéniques. Ce qui déclenche l'angiogenèse tumorale. [11]

La croissance de la tumeur sera assurée par l'angiogenèse. L'angiogenèse va fournir l'oxygène et les nutriments nécessaires à sa prolifération. Ce mécanisme se fait par sécrétion des facteurs qui, à leur tour stimulent la croissance des cellules cancéreuses. [7] Les étapes de ce processus sont résumées dans la figure 3. [12] En effet les cellules tumorales, suite à une hypoxie, sécrètent des facteurs de croissance. Parmi ces facteurs de croissance le plus importante est le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) qui active les cellules endothéliales situées à l'extrémité du bourgeon. Ces derniers, vont sécréter à leur tour des métalloprotéinases matricielles (MMPs) responsables de la dégradation de la membrane basale. La destruction de cette membrane favorise par la suite l'allongement des bourgeons vers la source du stimulus angiogénique. Au cours de cette étape le plasminogène, protéine plasmatique, est transformée en plasmine sous l'action des activateurs tissulaires u-PA et t-PA. Plasmine et MMP sont à l'origine de la dégradation de la membrane extra - cellulaire (MEC). Ainsi les cellules endothéliales vont former des nouveaux vaisseaux sanguins vers la tumeur. Enfin la formation des nouveaux vaisseaux sera finalisée par remodelage. [13]

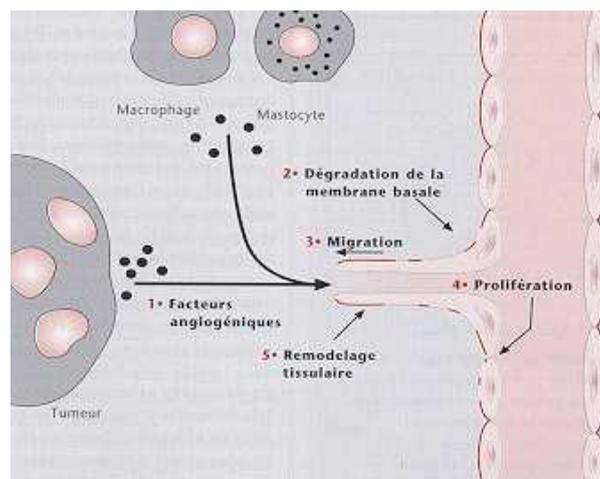


Figure 3 : Schémas de la réponse néoangiogénèse [12]

Le VEGF est probablement le régulateur le plus important de l'angiogenèse dans des conditions aussi bien physiologiques que pathologiques. Il est donc nécessaire de présenter de façon succincte l'expression et les différents récepteurs de ce régulateur angiogénique.

2-3- Facteur de croissance régulateur: VEGF

En 1983, Senger et coll. présentèrent pour la première fois une molécule capable d'induire une perméabilisation vasculaire. Cette molécule n'était autre que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor). Il est synthétisé par les cellules tumorales, mais également par les cellules endothéliales, les macrophages, les lymphocytes T, les cellules musculaires lisses et divers autres types cellulaires. [14,15,16,17,18] Le VEGF présente une importance capitale dans le processus d'expansion et de métastases. [19] C'est un facteur mitogène des cellules endothéliales. Il intervient dans plusieurs processus biologiques comme la dégradation de la membrane extracellulaire(MEC) après activation des protéases, mais aussi la survie des cellules endothéliales en inhibant l'apoptose. Ce rôle crucial est illustré par les études de modèles tumoraux employant des anticorps neutralisant le VEGF et inhibant la croissance tumorale. [20]

L'épissage alternatif est à l'origine de plusieurs isoformes de VEGF, le plus actif étant le VEGF₁₆₅. Il s'agit d'un glycopeptide de 165 acides aminés qui n'est actif que sous la forme de dimère. Sa structure a été déterminée par diffraction des rayons X (figure 4). [21]

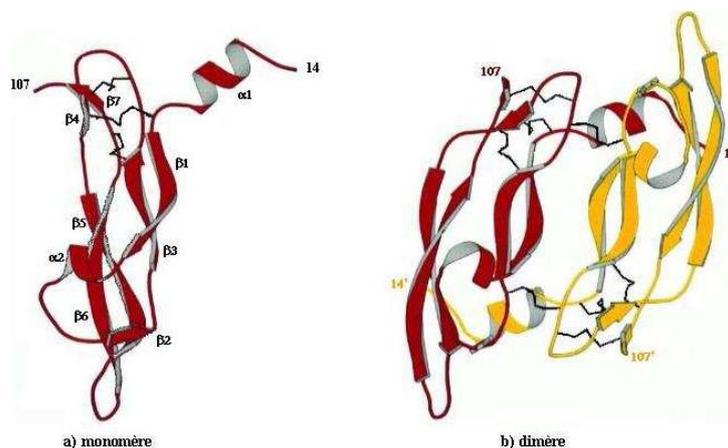


Figure 4 : Représentation de la structure secondaire du VEGF [21] (a) Sous forme de monomère, inactif ; (b) Homodimère de VEGF qui est la forme active

De plus la séquence responsable de l'activité biologique du VEGF [22] a été mise en évidence par une technique de mutagenèse dirigée. Cette séquence indispensable à l'activité biologique du VEGF est

l'enchaînement court Arg₈₂-Ile-Lys-Pro-His₈₆. La séquence (Arg₈₂-Ile-Pro-His₈₆) forme une structure flexible qui se situe à l'extrémité d'un feuillet β ; elle est appelée boucle A. Elle constitue le site de fixation du VEGF sur les KDR (tyrosines kinases). De moindre influence sur le contrôle de l'angiogenèse, une autre séquence active a été mise évidence. Cette dernière comprend des résidus de l'acide Aspartate₆₃, Glutamate₆₄ et Glutamate₆₇. Cette séquence est située à l'opposée de la boucle A : C'est la boucle β reconnu par les récepteurs Flt-1.

En dehors des récepteurs au VEGF à activité tyrosine kinase (le KDR et Flt-1), il existe d'autres récepteurs qui eux sont dépourvus de cette activité. Nous avons tout d'abord les neuropilines (NRPs) qui sont considérées comme jouant un rôle de co-récepteur des isoformes du VEGF liant ainsi l'héparine. ^[23-24] En effet la présence des neuropilines favorise la fixation du VEGF₁₆₅ en augmentant la liaison du VEGF₁₆₅ à KDR ^[25] ; mais aussi en potentialisant les effets mitogéniques et chimiotactiques médiés par KDR. Il s'ensuit une augmentation de la migration des cellules endothéliales. Un autre récepteur dépourvu d'activité kinase a été également identifié : il s'agit des intégrines. Les intégrines sont des récepteurs membranaires qui sont surexprimés par des cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse. Elles interviennent aussi dans la migration et l'adhésion des cellules endothéliales. Ces processus de migration et d'adhésion sont nécessaires à la formation de ramifications vasculaires.

Nous avons vu, d'une façon non exhaustive, différents éléments intervenant dans l'angiogenèse tumorale, qui sont autant de cibles potentielles pour les différents modes de thérapie tumorale connue jusqu'à ce jour.

3- Bilan historique sur la lutte contre le cancer

Le cancer, du mot grec Karkinos qui signifie crabe, est une maladie connue depuis plusieurs millénaires. Les premières descriptions du cancer remontent au XXIII^e Siècle avant J.C inscrites sur les Papyrus égyptiens. Ces derniers préconisaient son traitement par des pommades.

Pour Hippocrate (300 avant J.C) et Galien (150 après J.C), le cancer résultant d'un déséquilibre entre les liquides corporels, pouvait être traité par une alimentation saine ou des saignées abondantes. Les premiers traitements chirurgicaux du cancer ont vu le jour à partir de 1890. Ils consistaient à retirer la tumeur avec une large zone de tissus sains environnants.

Au début des années 1900, la découverte par les biologistes du processus de prolifération de la cellule cancéreuse permet de trouver des traitements plus adéquats. La démarche consistait à tester un nombre considérable de molécules sur des cellules tumorales in vitro. Celles qui stoppaient leur prolifération

ou les tuaient, étaient sélectionnées pour des essais chez l'homme. Ces molécules agissaient principalement au niveau du noyau. Nous pouvons citer comme exemple le cisplatine et la doxorubicine (figure 5). C'est en 1944 que la caryolysine ^[26] (dérivé du gaz moutarde) fut utilisé la première fois en chimiothérapie pour traiter un cancer du sang (Figure 5). En 1964, les propriétés anti-tumorales d'une substance naturelle issue de l'if ont par ailleurs été découvertes. Son principe actif, le taxol (figure 5) fut isolé en 1966 mais ne sera commercialisé qu'en 1993. ^[27] Cependant, toutes ces molécules tuent sans distinction les cellules à prolifération rapide, telles que celles du sang ou des bulbes pileux. Elles engendrent ainsi des effets secondaires sur les patients comme la chute des cheveux, mais également des phénomènes de résistance (Multidrug resistance : MDR).

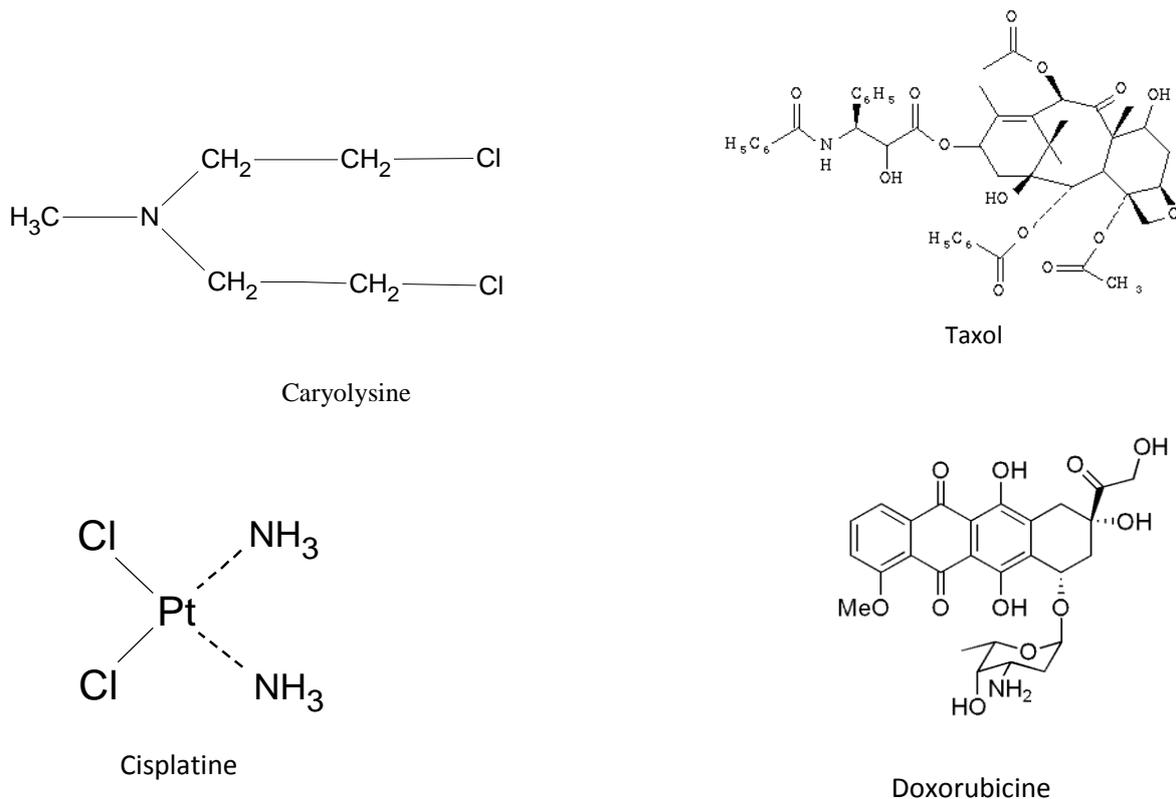


Figure 5 : Structure des premiers anti - cancéreux

Ce n'est vraiment qu'à partir des années 1970 que les connaissances sur les cellules tumorales se sont précisées. Les chercheurs ont ainsi découvert la capacité des tumeurs à stimuler la croissance de vaisseaux sanguins pour les alimenter. En 1971, le chirurgien Judah Folkman ^[28] observe qu'en inhibant la croissance des vaisseaux autour de la tumeur on empêche son développement. Les biologistes Harold Vanus et Mickael Bishop découvrent par la suite (1976) le premier oncogène humain muté d'un gène normal, qui rend la cellule tumorale. ^[29]

Il faudra attendre 2001 pour que le premier agent anticancéreux « le Glivec » ciblant un oncogène muté soit commercialisé. Son principe actif, une petite molécule conçue en 1993 agit sur une enzyme mutée, une tyrosine kinase essentielle à la division cellulaire. C'est l'équipe du Dr. Brian Drucker ^[30] qui eu l'idée de bloquer l'activité de cette tyrosine kinase. En effet cette dernière possède une structure tridimensionnelle qui présente une sorte de poche responsable de son activité biologique. En insérant, sur le biais du principe clé-serrure, la petite molécule du principe actif dans la poche de l'enzyme, son activité biologique est stoppée. Les kinases étant impliquées dans de nombreux cancers, les bloquer est une stratégie utilisée aujourd'hui pour lutter contre de nombreux cancers (cancers du sein, cancer colorectal...).

Toutefois, une cellule cancéreuse est instable par nature. Son taux de mutation est assez élevé. Ainsi le « Glivec » peut s'avérer inefficace lorsque la cellule cancéreuse mute. Le patient, au cours du traitement, peut développer des résistances à l'agent thérapeutique. Un autre agent anticancéreux faisant partie des thérapies ciblées, « l'herceptin » qui agit contre le cancer du sein (anticorps ciblant le récepteur HER2 surexprimé dans le cas des cancers du sein), connaît lui aussi le même problème que le « le Glivec ». Les structures de ces deux anticancéreux sont représentées sur la figure 6.

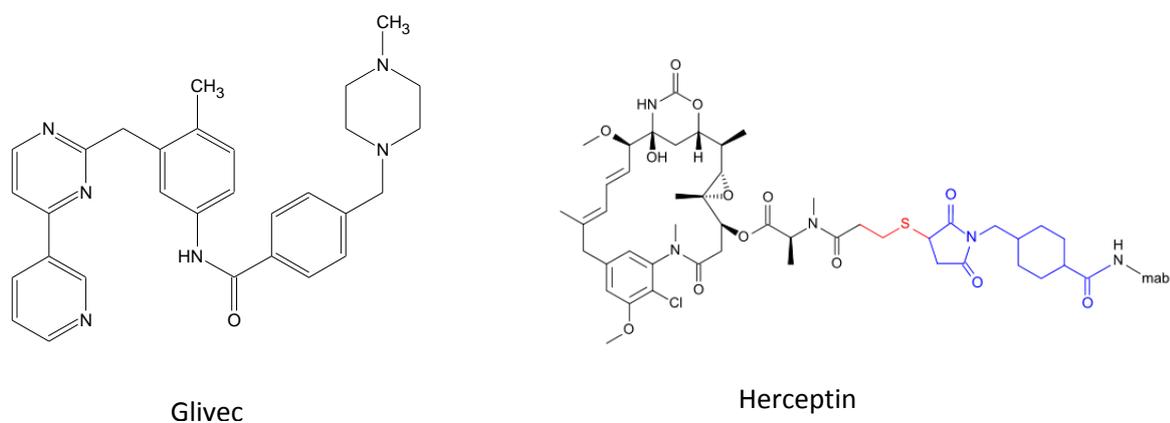


Figure 6 : Structures du « Clivec » et « Herceptin »

Le phénomène de résistance est commun à toutes les substances anticancéreuses ; on parle alors de Multidrug resistance (MDR). Pour palier cet inconvénient il faudrait combiner plusieurs thérapies (chimiothérapie, radiothérapie, photothérapie et thermo thérapie).

La figure 7 représente les 9 anticancéreux les plus prescrits en France en 2008 dans le secteur public. En effet les thérapies ciblées (Mabthéa ou Rituximab, Avastin ou Bevacizumab, Herceptin, Taxotère) représentent plus de la moitié (59 %).

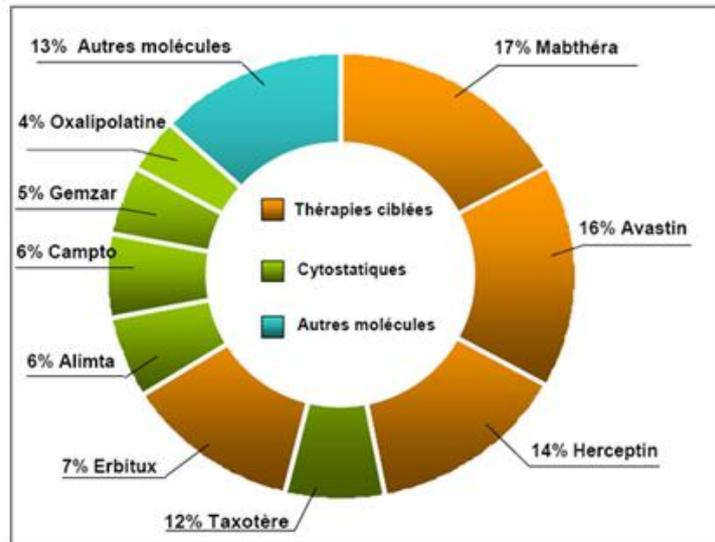


Figure 7 : Les 9 anticancéreux les plus prescrites en France en 2008 (Répartition en fonction des coûts de traitement).Source INCA (Institut national du cancer)

4- Statistiques du cancer

Même si les possibilités de guérir d'un cancer atteignent aujourd'hui plus de 50 %, avec pour certains des remissions presque totales, comme le cancer de la prostate par exemple, et si les progrès incessants réalisés tant en matière de traitement que de détection et de prévention, cette maladie reste l'une des premières causes de mortalité dans le monde. En particulier en France, il devance les maladies cardiovasculaires et les accidents de la route.^[31] Ainsi d'après le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC) 25 millions de personnes sont atteintes d'un cancer dans le monde. Son rapport en 2008 montre que le nombre de malades a doublé entre 1970 et 2000. Plus de 12 millions de nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en 2008. Au cours de cette même année, 7 millions de malades ont trouvé la mort.

Le cancer est une maladie qui touche à un moment ou à un autre un homme sur deux et une femme trois. Selon l'Institut national de Veille Sanitaire (InVS), le nombre de nouveaux cas de cancer était en France de 320 000 en 2005. Parmi les cancers les plus répandus la même année, on retrouve le cancer de la prostate chez l'homme et les cancers mammaires chez la femme (figure 8). En 25 ans l'occurrence du cancer a quasiment doublé : 93 % chez l'homme et 84 % chez la femme. Malgré une baisse de risque de décès, l'InVS prévoit une augmentation de 10,8 % de nouveaux cas de cancer qui ont été diagnostiqués en 2009. Selon ces statistiques, près de 147 000 patients atteints de cancer décèderont des suites de leur maladie.

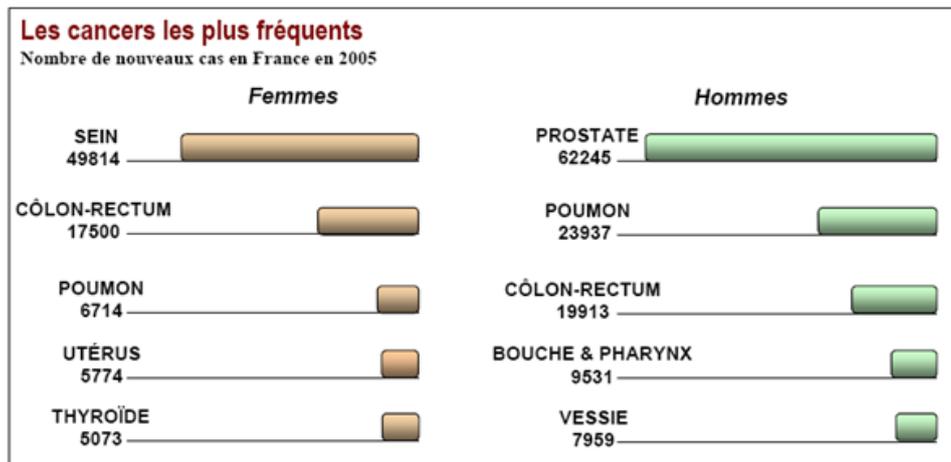


Figure 8 : Statistiques des cancers en France pour l'année 2005. Source de InVS (Institut national de veille Sanitaire)

5- Comment faire reculer le cancer ?

La communauté scientifique s'accorde à dire qu'il faut se baser sur trois grands axes intimement liés :

- La **prévention** auprès du grand public : cette prévention passe par une hygiène de vie saine (alimentation équilibrée, activité sportive régulière, consommation modérée d'alcool, et absence de tabagisme). En effet les données épidémiologiques préliminaires montrent que certains composants alimentaires peuvent jouer un rôle dans la diminution du risque de développer un cancer. Comme exemple les antioxydants ou les acides gras oméga-3.

- Le **diagnostic** précoce : la détection précoce et précise de la maladie permet au patient de bénéficier d'un traitement plus adéquat et efficace. Dans ce domaine il existe un large éventail d'outils de diagnostic. Nous pouvons citer l'examen clinique (auscultation, analyses urinaires et sanguines), l'endoscopie pour explorer une cavité (estomac, bronche, côlon), la radiographie pour examiner les poumons et les os, et la mammographie pour explorer les seins. Parmi tous ces outils de diagnostic récent, l'IRM se démarque du point de vue efficacité. Il s'impose comme la méthode de dépistage incontournable qui permet non seulement de déceler les tumeurs plus facilement mais surtout plus tôt. Par exemple, des études réalisées sur le dépistage du cancer du sein ont montré que les tumeurs cancéreuses sont découvertes à un stade moins avancé de la maladie que par mammographie. Ainsi la détection par l'IRM permet d'avoir un traitement anticipé et donc de meilleures chances de guérison. Ces résultats justifient notre choix de synthétiser des matériaux présentant un contraste en IRM ; matériaux qui seront largement développés dans la seconde partie de ce mémoire.

Depuis quelques mois, un centre hospitalier du Nord de la France (le Centre Hospitalier d'Armentières) a reçu un nouvel appareil, dérivé de l'IRM de détection du cancer du sein : « Le

Senobright ». Cet appareil permet de réaliser une angiommographie spectrale de contraste et de donner un diagnostic aussi précis qu'une IRM, mais plus spécifique (figure 9).

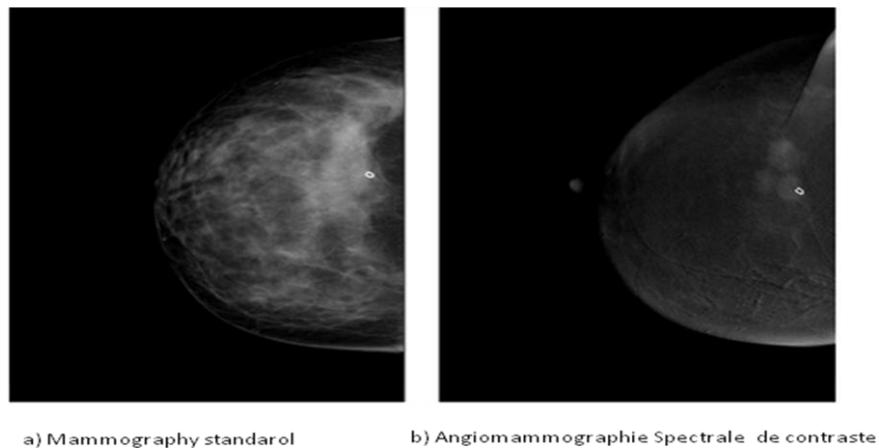


Figure 9 : Depistage du cancer du sein par mammographie standar (a) et « Senobright » (b)
(www.gehealthcare.com)

Cette figure montre que l'angiommographie permet de repérer directement les tumeurs, voir si elles sont malignes, et l'état d'avancement du cancer avec l'identification des foyers de calcification et d'hypervascularisation, alors qu'une mammographie classique permet seulement de visualiser des « tâches ».

- Le **traitement** pour mieux cibler les cellules tumorales et éviter toute dégradation des tissus sains. En effet il existe une multitude de traitements (chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie, curiethérapie, immunothérapie, greffe...) qui le plus souvent sont complétés par des soins dits « de support ». Ces soins « de support » ont pour rôle de gérer les effets secondaires d'un traitement afin de garantir au mieux au patient une meilleure qualité de vie.

La nécessité d'améliorer le traitement et le diagnostic du cancer implique la mise en place des systèmes dénuant le médicament de toute toxicité intrinsèque et des effets secondaires. La photothérapie dynamique (PDT pour Photo-Dynamic Therapy) est une méthode de traitement des cancers assez récente et qui présente des avantages majeurs. En effet dans le cadre de la PDT, la lumière et le photosensibilisateur (PS) sont dénués de toute toxicité intrinsèque. Seules les zones ayant accumulées le photosensibilisateur et recevant de la lumière vont subir l'effet toxique du traitement. Nous avons porté une attention toute particulière à la photothérapie dynamique anticancéreuse que nous nous proposons d'examiner plus en détail dans le paragraphe suivant.

II- Porphyrines-Nanoparticules : Application en PDT

A- Photothérapie dynamique et Porphyrines

1- Photothérapie dynamique

La photothérapie dynamique des cancers est une méthode curative basée sur l'utilisation d'un agent photosensibilisateur. Le photosensibilisateur doit être capable de générer des espèces hautement réactives après une activation photochimique de l'oxygène. La grande toxicité de ces espèces est exploitée sur différents types de cancers épithéliaux, tel que le cancer de la peau, du poumon, de l'œsophage, de la vessie, de l'estomac, ou encore du col de l'utérus. La PDT est une méthode efficace et peu traumatisante qui connaît de ce fait un engouement croissant de la part de nombreuses équipes scientifiques et médicales (figure 10).



Figure 10 : Traitement des dommages solaires par PDT
(source <http://www.villabianca.fr>)

On regroupe en trois grands axes les activités curatives de la lumière :

- la photothérapie utilise uniquement les effets intrinsèques de la lumière (Par exemple dans le traitement du rachitisme) ;
- la photochimiothérapie implique l'association entre un médicament photoactivable et la lumière ;

- la photothérapie dynamique ou la photochimiothérapie dynamique qui fait appel à l'action conjuguée d'une molécule chimique non toxique et de la lumière, générant ainsi des espèces réactives issues principalement de l'oxygène moléculaire très toxique pour les organismes vivants.

1-1- Rappel historique

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Les Egyptiens utilisaient déjà l'exposition au soleil (héliothérapie) pour traiter certaines affections cutanées. Von Tappeiner et Jesionek ^[32] ont été les premiers à utiliser la PDT en cancérologie. En effet ils ont traité pour la première fois en 1903 des tumeurs de la peau par une application topique d'éosine suivie d'une exposition à la lumière blanche. L'hématoporphyrine et ses dérivés ont été les premiers photosensibilisateurs à être utilisés en PDT des cancers. Leurs propriétés photodynamiques et leurs capacités à se concentrer dans les tissus tumoraux ont été mises en évidence par Baldes et Lipson ^[33] en 1960. Ce n'est qu'à partir des années 1970 que les premières applications cliniques en cancérologie ont été initiées. ^[34] L'hématoporphyrine a énormément contribué au véritable essor de la PDT. ^[35,36] En effet la photocytotoxicité de ce nouvel agent anticancéreux est due à la production intracellulaire d'oxygène singulet après absorption de l'énergie photonique. ^[37] Pour finir les résultats centraux menant à l'élaboration de la PDT sont regroupés dans le tableau 1.

Tableau 1 : Résultats expérimentaux conduisant à l'élaboration de la PDT

Année et Auteur(s)	Observations ou événements
1907 Hausmann	Hémolyse des erythrocytes par action simultanée de la Chlorophylle et la lumière
1909 Hasselbach	Importance de l'O ₂ dans la photohémolyse des erythrocytes
1913 Meyer - Bertz	Hp cause des effets photosensibles à l'homme
1924 Policard	Fluorescence des porphyrines naturelles dans les tumeurs
1960 Lipson et al.	Première synthèse de l'HpD
1975 Kelly et al.	Traitement des tumeurs humaines transplantées chez des souris par PDT avec l'HpD
1976 Kelly et Snell	Première utilisation clinique de l'HpD en PDT

La PDT est une technique originale de par son principe et présente de surcroît l'avantage de ne provoquer que peu ou pas d'effet secondaire par rapport aux autres thérapies anticancéreuses que sont la chimiothérapie et la radiothérapie.

1-2- Principe de la Photothérapie dynamique et mécanisme photochimique

Le principe de la photothérapie dynamique est basé sur la destruction sélective des cellules tumorales par l'action combinée d'un photosensibilisateur et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée. La PDT peut être utilisée pour deux types d'applications : une application thérapeutique et diagnostique. En effet la première étape en PDT consiste à introduire par voie intraveineuse l'agent photosensibilisateur au sein d'un tissu présentant une tumeur. L'illumination de ce tissu enrichi en porphyrine induit des réactions chimiques oxydatives entraînant des altérations cellulaires irréversibles tout en préservant les tissus sains dépourvus de photosensibilisateur.

Dans le cas du photodiagnostic, le photosensibilisateur excité par une lumière de longueur d'onde appropriée émet une fluorescence. Cette fluorescence cible avec précision les lésions néoplasiques avec une grande sensibilité. La figure 11 représente le principe de ces deux applications.

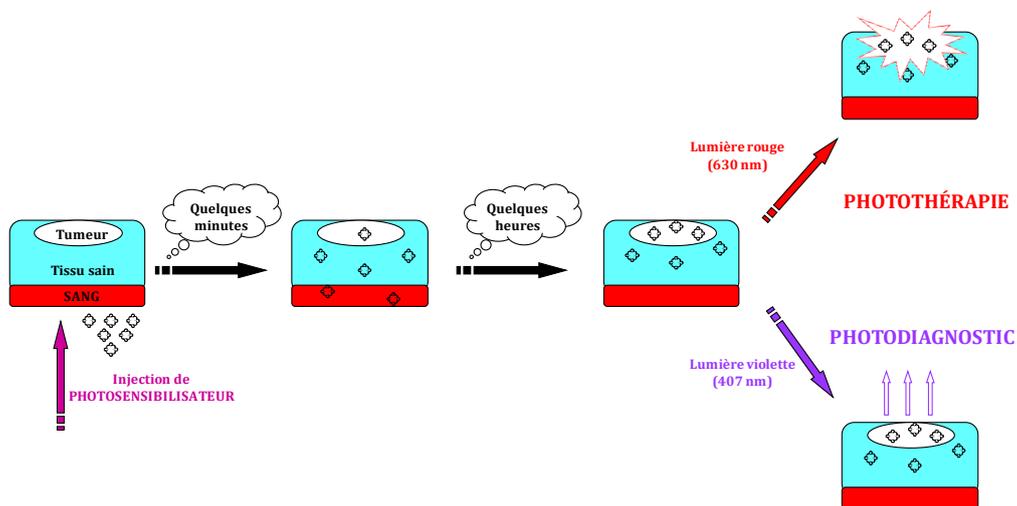


Figure 11 : Représentation Schématique du principe de la photothérapie dynamique.

L'illumination par la lumière du photosensibilisateur implique un processus photochimique. En effet l'irradiation induit l'absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ par le photosensibilisateur. Cette absorption

entraîne le passage du photosensibilisateur du niveau de son état fondamental S_0 à un état singulet excité S_1 (figure 12). Le retour à l'état fondamental peut se faire par conversion intersystème (CIS) de l'énergie photonique en chaleur, ou bien par émission de photons de fluorescence. La conversion intersystème (CIS) a lieu si la durée de vie de l'état singulet excité est suffisamment longue (ce qui est souvent le cas pour la plupart des photosensibilisateurs utilisés en PDT) pour passer dans un état excité triplet noté T_1 par inversion de spin électronique. Dans ce cas, le photosensibilisateur peut se désactiver par phosphorescence ou en réagissant avec son environnement selon deux mécanismes :

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

Ces deux mécanismes provoquent l'oxydation des biomolécules dans la cellule.

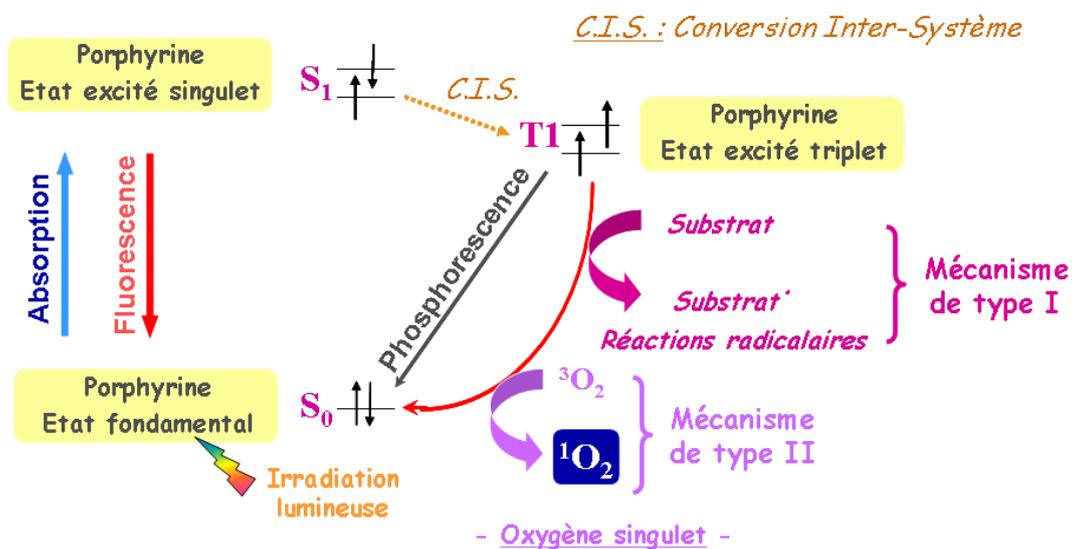


Figure 12 : Mécanisme photochimique de la PDT. ^[38]

Le choix du photosensibilisateur adéquat est crucial pour une bonne application en PDD et PDT. Les propriétés photophysiques déterminent la capacité photosensible des composés. Cependant notre attention s'est portée sur le rendement quantique de la production d'oxygène singulet Φ_{Δ} de chaque

photosensibilisateur (pour une application en PDT) et de la production de fluorescence Φ_f (pour une application en PDD).

De ce fait un bon photosensibilisateur doit avoir un Φ_t (rendement de l'état triplet) élevé, un ΔE_t (différence d'énergie entre l'état S0 et l'état T1) supérieure à ΔE_Δ (différence d'énergie entre 1O_2 et 3O_2 qui vaut $94 \text{ KJ.mol}^{-1} = 0,97 \text{ eV}$). Il ne doit pas s'agréger dans l'organisme, car l'agrégation diminue le Φ_t et Φ_Δ .^[39] Il doit s'accumuler facilement et de façon sélective dans la tumeur ; puis s'éliminer rapidement de l'organisme après illumination. Enfin être non toxique en absence de lumière.

1-3- Les photosensibilisateurs en thérapie photodynamique

La majorité des photosensibilisateurs utilisés en PDT ont un cycle tétrapyrrolique et constituent les dérivés substitués des porphyrines, chlorines et bactériochlorines. Il existe également des photosensibilisateurs non-tétrapyrroliques comme les hypericines, les hypocrellines et les prenylenequinones (figure 13).

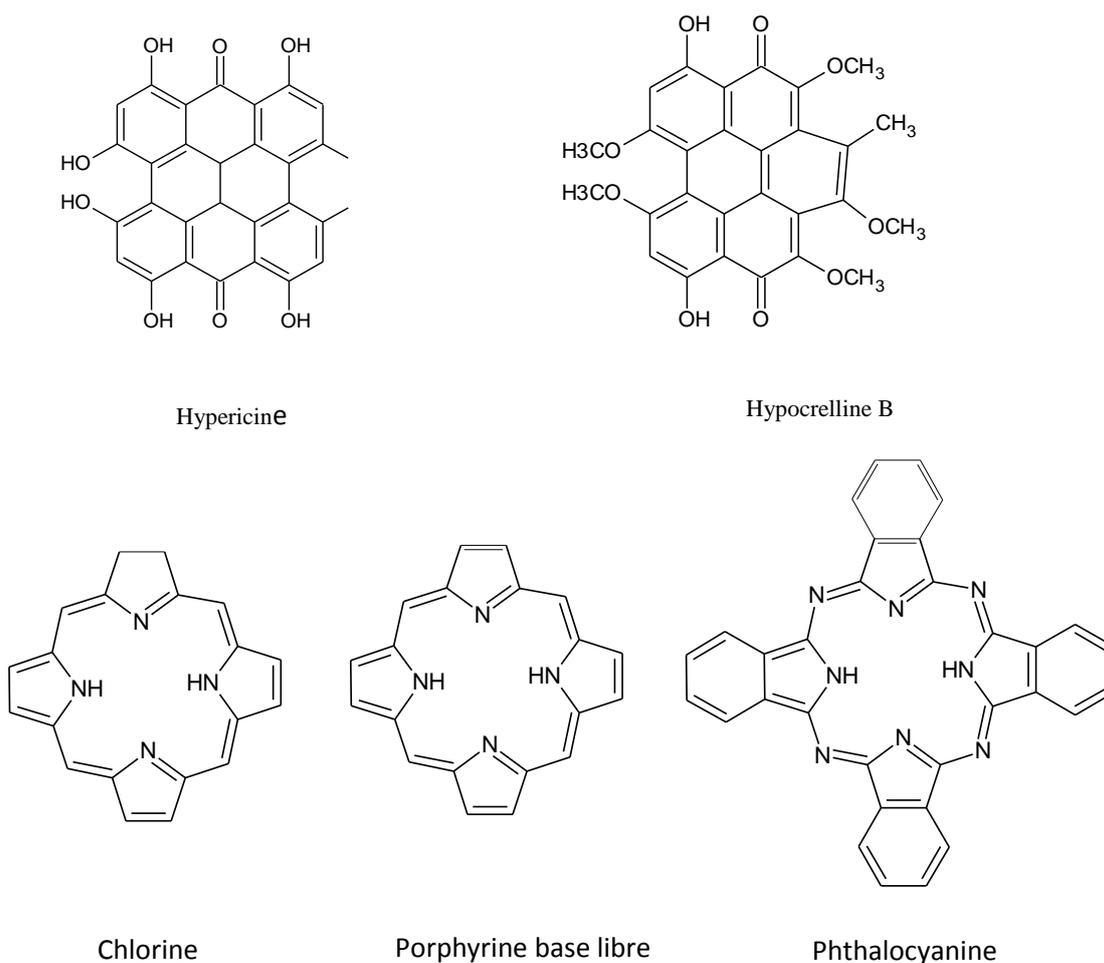


Figure 13: Exemples des structures de base des principaux photosensibilisateurs utilisés en PDT

1-3-1- Les photosensibilisateurs de première génération

L'hématoporphyrine (Hp) et ses dérivés que sont l'« hématoporphyrine dérivée » (HpD) et le Photofrin (b) constituent la première génération des photosensibilisateurs.

L'HpD est obtenu par acétylation de l'hématoporphyrine suivie d'une saponification. Il s'agit d'un mélange complexe de plusieurs monomères parmi lesquels l'hématoporphyrine (20 %), l'hydroxy – éthyl-vinyl-deutéro-porphyrine (20-30 %) ou encore la protoporphyrine (3 – 5 %) mais aussi de nombreux oligomères (de 2 à plus de 10 unités) formés de ponts éthers, esters ou carbone-carbone.

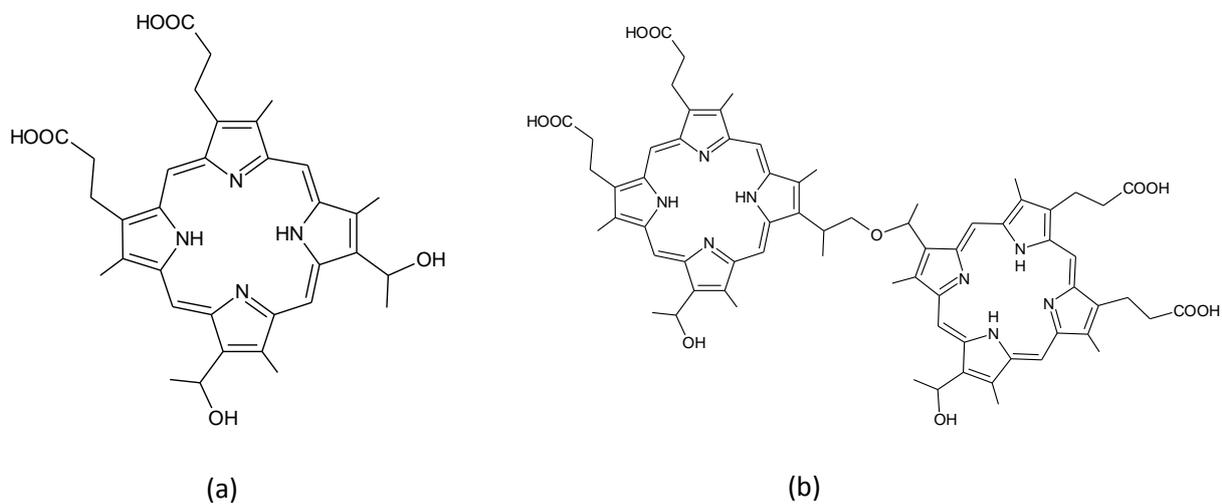


Figure 14 : Exemple de photosensibilisateurs de première génération (a) hématoporphyrine (b) Éther de dihématoporphyrine

Les dimères et trimères d'hématoporphyrine formés par des ponts éthers constituent la fraction active du photofrin. ^[40] Ces premiers agents sont incontestablement phototoxiques. Cependant ils présentent beaucoup de limites :

- C'est un mélange complexe et certains de ses composants ne sont pas photoactifs
- On a une faible accumulation dans la tumeur estimée entre 0,1-3 %
- La profondeur de l'effet thérapeutique n'est comprise qu'entre 5-10 mm ^[41]
- L'aggrégation du Photofrin diminue le $\Phi_{\Delta} = 0,20$ et son action en PDT.

1-3-2- Les photosensibilisateurs de deuxième génération

La mise au point de photosensibilisateurs dits de « seconde génération » est apparue indispensable face aux limites présentées par ceux de la première. Ces molécules ont une bonne capacité à générer $^1\text{O}_2$, car ils ont un Φ_Δ (rendement de production d'oxygène singulier) élevé qui est attribué par un fort Φ_t (rendement de l'état triplet). Ils s'éliminent également plus facilement que le Photofrin[®]. Cette seconde génération de photosensibilisateurs comprend plusieurs familles de molécules telles que les porphyrines (o-THPP), les phthalocyanines, les porphycènes, les texaphyrines (Lutrin), les chlorines (Foscan), les bactériochlorines ou encore les précurseurs des porphyrines endogènes (Acide 5-aminolevulinique ou 5-ALA) considérés comme un promédicament.

Depuis 2002, la tétra- (méta-hydroxylphényl) chlorine (m- THPC), connue sous le nom de Foscan[®], est la molécule commercialisée la plus active en PDT (en France). En effet elle est 25 – 30 fois plus efficace que la HpD ou le Photofrin[®]. Cette efficacité est liée aux bons rendements $\Phi_\Delta = 0,57$ et $\Phi_t = 0,69$ et à une forte absorption de la lumière rouge. Cependant, le Foscan demeure un photosensibilisateur peu sélectif vis-à-vis des cellules cancéreuses. Ce composé s'est avéré néanmoins un bon candidat pour les traitements des cancers de la prostate ou du pancréas. [\[42,43\]](#)

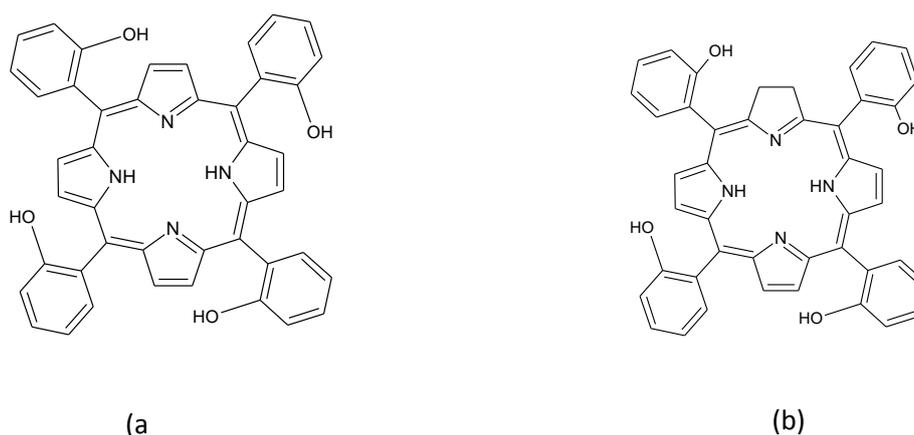


Figure 15 : Exemples de photosensibilisateurs de seconde génération (a) o-THPP. (b) le Foscan

Comme molécules commercialisées, on peut également citer le 5-ALA (acide 5 aminolevulinique) qui est le premier promédicament de la seconde génération de photosensibilisateurs qui a obtenu l'autorisation d'être commercialisé sous le nom de Lévilan (AMM en France en 2000). Le 5-ALA

par un mécanisme biosynthétique conduit à la formation *in situ* de la protoporphyrine IX (Pp IX) (figure 16). La protoporphyrine IX (Pp IX) est actuellement utilisée pour les traitements en PDT des cancers cutanés et gastro-intestinal, des lésions précancéreuses. [44,45,46]

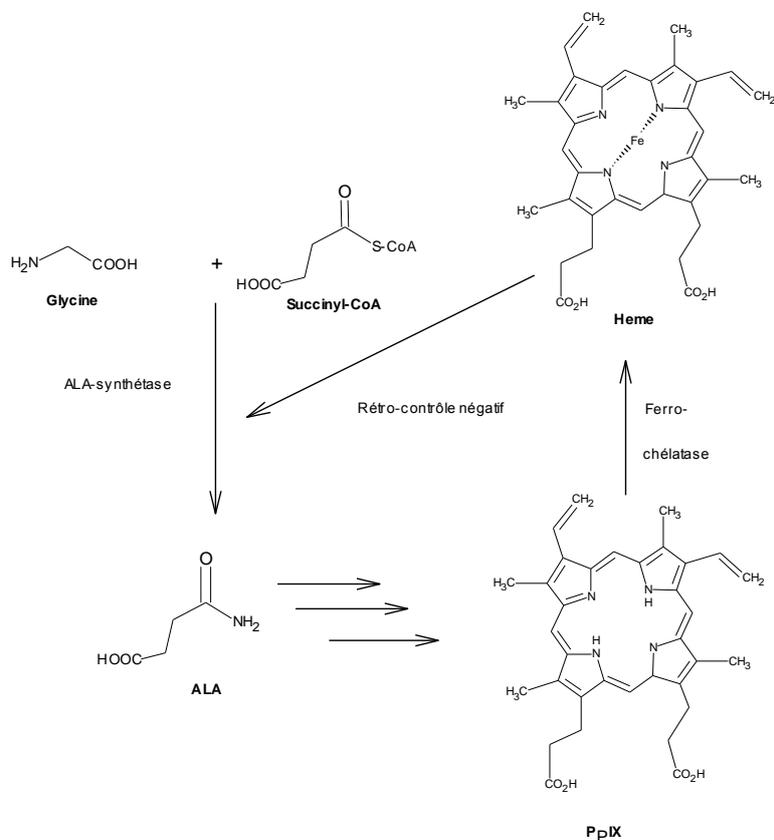
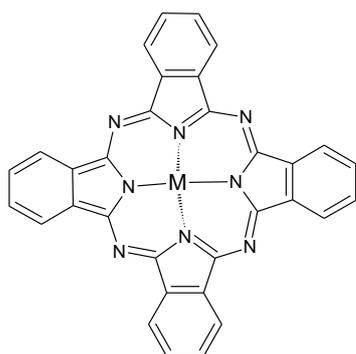
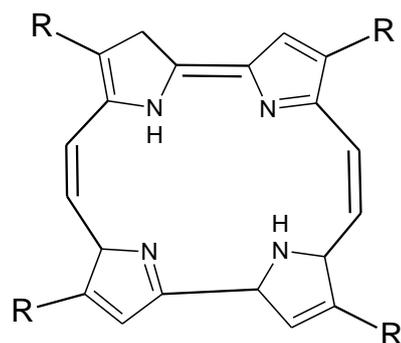


Figure 16: Biosynthèse de la protoporphyrine IX à partir de l'acide 5 - amino-lévulinique (5-ALA)

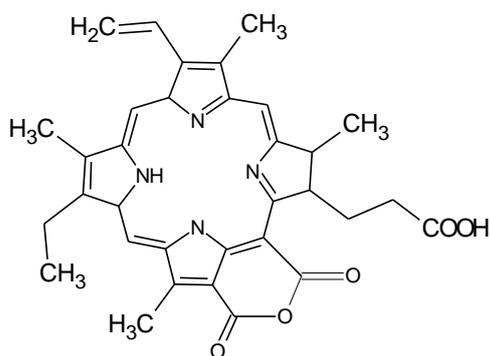
Les benzoporphyrines ou encore phthalocyanines, regroupant la famille des macrocycles tétrapyrroliques étendus, présentent une absorption importante aux grandes longueurs d'ondes [47,48,49] (figure 17). Elles sont généralement plus stables que les chlorines. Ces composés peuvent ainsi être utilisés à faible dose $0,2-0,5 \text{ mg.Kg}^{-1}$, comparé avec le photofrin où on a $1-5 \text{ mg.Kg}^{-1}$. [50] On peut également citer dans cette classe de photosensibilisateurs les porphycènes qui sont des isomères structuraux des porphyrines et des texaphyrines dans lequel un noyau pyrrole a été remplacé par un noyau phényle (figure 17). Les porphycènes sont également d'excellents candidats pour la PDT. [51]



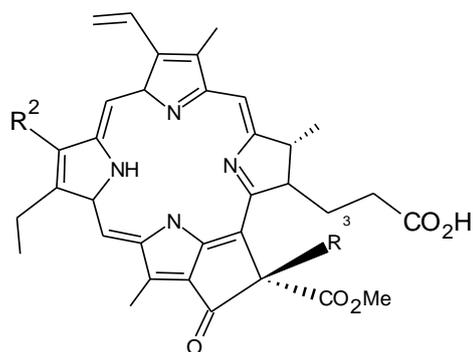
Phthalocyanine métallée (M = Zn(II) ou Cu (II))



Porphycene R = H



Purpurine



Phéophorbide

Figure 17 : Photosensibilisateurs de seconde génération

D'autres photosensibilisateurs peuvent être obtenus à partir d'une synthèse partielle des précurseurs en abondance dans la nature comme le protohème et la chlorophylle... Dans cette famille on retrouve un grand nombre de chlorines d'origine naturelle. Ces dernières peuvent être subdivisées en trois sous-groupes : les rhodines (exemple la chl b), les phorbines, les chlorines au sens large. [52,53] Les purpurines (chlorines) (figure 17) représentent le sous-groupe le plus avantageux. En effet, elles sont extraites facilement à partir d'un grand nombre de plantes et d'algues (spirulines). Par rapport aux chlorines synthétiques, l'exocycle est à l'origine d'une stabilité *in vivo* satisfaisante.

Les photosensibilisateurs de deuxième génération marquent d'importantes avancées thérapeutiques surtout en termes de profondeur de l'effet thérapeutique (forte absorption à la lumière rouge). Cependant ces agents manquent encore de sélectivité. De ce fait le greffage sur le macrocycle de substituant d'adressage se révèle être une excellente approche. Ainsi ces composés présentant une certaine affinité et spécificité vis-à-vis des sites tumoraux représentent la dernière génération de photosensibilisateurs.

1-3-3- Les photosensibilisateurs de troisième génération

Les photosensibilisateurs de troisième génération regroupent en grande majorité des porphyrines de type *méso* substituées par des motifs de vectorisation et d'adressage. Ces motifs sont généralement des biomolécules (stéroïdes, des sucres, des amines, des acides aminés ou peptides) qui peuvent être reconnus spécifiquement par les cellules cancéreuses. Quelques exemples sont représentés ci-dessous.

Les photosensibilisateurs glycoconjugués

Comme l'ont montré les travaux de notre laboratoire, les *méso*-porphyrines glycosylées sont reconnus pour le ciblage des lectines ; récepteurs transmembranaires surexprimés par certaines cellules cancéreuses. ^[54] Généralement, l'unité glucidique est fixée sur la ou les positions *méso* du macrocycle par l'intermédiaire d'un espaceur ^[55] (figure 18).

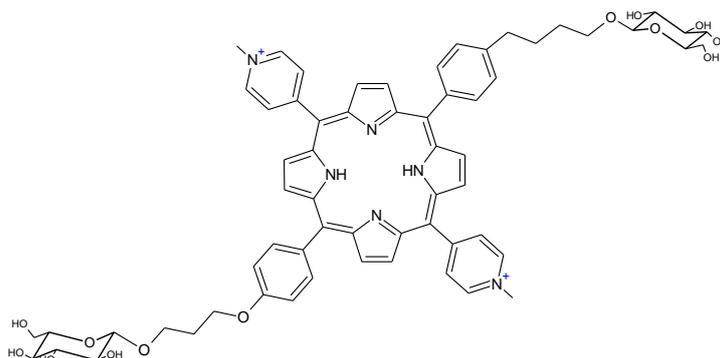


Figure 18 : Exemples de *méso*-porphyrines glycosylées phototoxiques préparées au LCSN

Les premiers résultats *in vitro* ont montré que seuls les macrocycles substitués par deux ou trois monosaccharides présentent une phototoxicité importante. Néanmoins le remplacement d'un monosaccharide par un disaccharide diminue voire supprime totalement l'action phototoxique. ^[56]

Les photosensibilisateurs à motifs polyaminés ^[57]

Des méso-tritolylporphyrines et protoporphyrines ont été fixés à des motifs spermidine ou spermine (figure 19). L'objectif de cette synthèse est de viser la métabolisation de ces polyamines qui est anormalement élevé chez les cellules malignes dont l'activité mitotique est intense. ^[58] Ces composés ont présenté un effet photocytotoxique sur les mélanomes. ^[59]

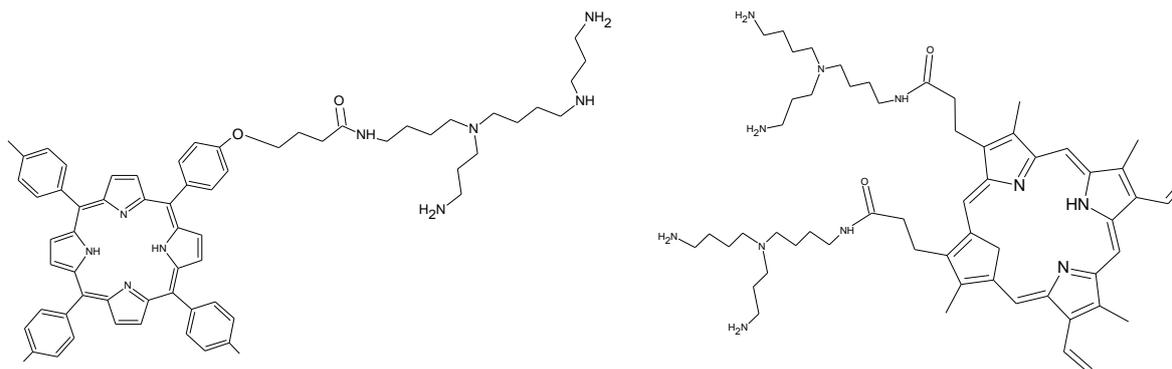


Figure 19: Exemples de photosensibilisateurs à motifs spermine ou spermidine

Les photosensibilisateurs à motifs peptidiques

Le LCSN a pu mettre en place des méso-porphyrines glycosylées portant un ou plusieurs acides aminés (alamine). Cette approche permet de cibler les sites de transport des acides aminés essentiels. ^[60] La présence de sucres à ce niveau permet non seulement la reconnaissance mais également une augmentation de la biodisponibilité du photosensibilisateur (figure 20).

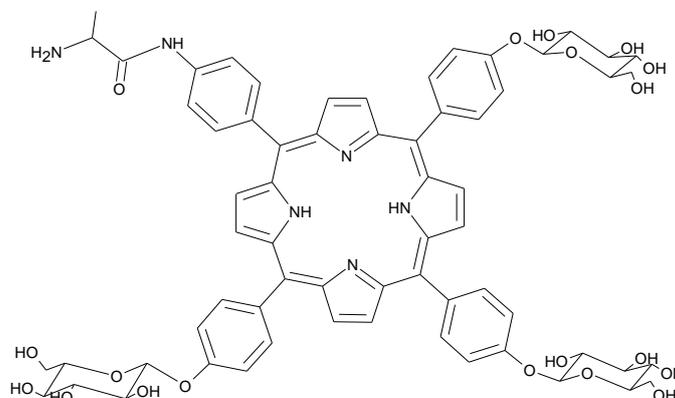


Figure 20 : Porphyrine triglycosylée portant un résidu alamine

La connaissance des mécanismes moléculaires impliqués dans la néoangiogenèse a permis de choisir d'autres cibles biologiques. Ainsi trois résidus glucosyles portant la séquence RGD *via* un bras espaceur peuvent être synthétisés.^[61] L'affinité du photosensibilisateur s'est nettement améliorée, tout en conservant ses propriétés photosensibilisatrices.^[62] La séquence linéaire s'est avérée facilement hydrolysable par les peptidases. Ainsi, un photosensibilisateur substitué par trois résidus glucosyles et portant un RGD cyclisé ont été synthétisé pour la première fois au sein de notre laboratoire^[63] (figure 21).

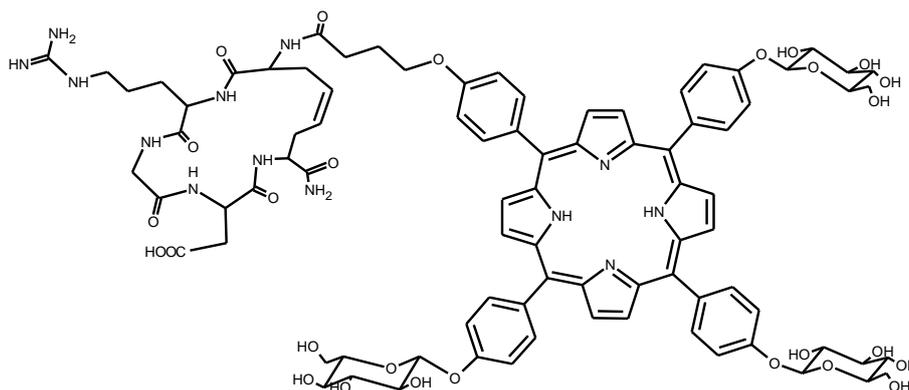


Figure 21 : Porphyrine triglucosylée portant un résidu RGD cyclisé

Le caractère ubiquitaire des intégrines réduit par contre la sélectivité avec le motif RGD. De ce fait pour palier à cet obstacle, des photosensibilisateurs (mésotriolporphyrines) hybrides portant cette fois le peptide cycloVEGI^[64] ont été élaborés. Ce peptide est un véritable vecteur moléculaire assurant une fixation spécifique au niveau des néo-vaisseaux, formés par et pour les tumeurs cancéreuses. Le couplage entre le photosensibilisateur et le peptide s'est fait selon deux méthodes : par liaison amide ou par formation d'un triazole 1,4-disubstitué (réaction de « Click Chemistry »).

La photothérapie dynamique (PDT) est une méthode basée sur l'utilisation des photosensibilisateurs qui deviennent phototoxiques en cas d'expositions lumineuses. Parmi ces photosensibilisateurs, les plus répandus sont des macrocycles tétrapyrroliques tels que les porphyrines. En effet les porphyrines ont un vaste champ d'application en PDT. Une mise au point bibliographique s'avère donc primordiale sur ces composés.

2- Quelques aspects de la chimie des porphyrines

2-1- Structure

Les porphyrines sont des macrocycles aromatiques fortement conjugués avec 18 électrons π . Leur structure est constituée de quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthines (figure 22). Cette forte conjugaison leur confère une stabilité importante et une forte absorption dans le visible. En fonction du pH du milieu, sa structure hétérocyclique peut se comporter soit comme une dibase ou un diacide. Leurs quatre azotes donneurs dirigés vers l'intérieur du macrocycle, leur confère un très fort effet chélation. Elles peuvent être métallées par presque tous les métaux. On parle ainsi de porphyrines « métallées » au détriment de base « libre » (figure 22). La réduction d'une double liaison pyrrole conduit alors à la formation de chlorines possédant trois noyaux pyrroliques et une unité pyrrolidine. Lorsque les deux doubles liaisons sont réduites sur la porphyrine, on parle alors de bactérochlorines ou d'isobactérochlorines.

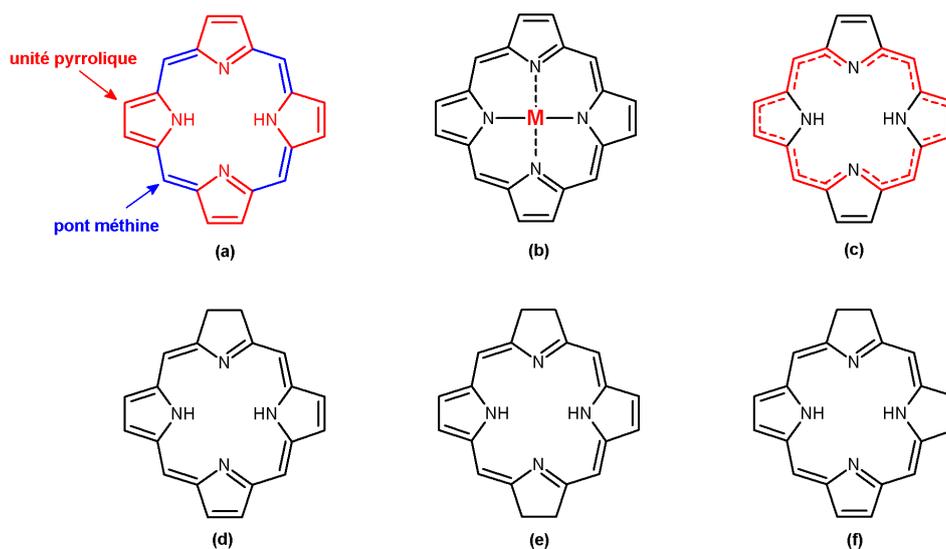


Figure 22 : (a) Porphyrine base libre ; (b) Porphyrine métallée ; (c) Représentation du système de 18 électrons π aromatiques ; (d) Chlorine ; (e) Bactérochlorine ; (f) Isobactérochlorine

Le chimiste allemand Fischer fut le premier dans les années 1930 à proposer un système de nomenclature pour désigner les porphyrines (figure 23). Les atomes de carbone en position β -pyrroliques sont numérotés de 1 à 8, tandis que les ponts méthines, aussi appelés « méso », sont numérotés α , β , γ et δ .

Face à la complexité des porphyrines synthétisées, une numérotation systématique du macrocycle s'est avérée nécessaire afin de simplifier la nomenclature de ces molécules. ^[65] Les carbones méso portent

alors les numéros 5, 10, 15, 20, les positions α et β des cycles pyrroliques sont notées respectivement 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 et enfin les numéros 21, 22, 23, 24 ont été attribués aux quatre atomes d'azote (figure 23).

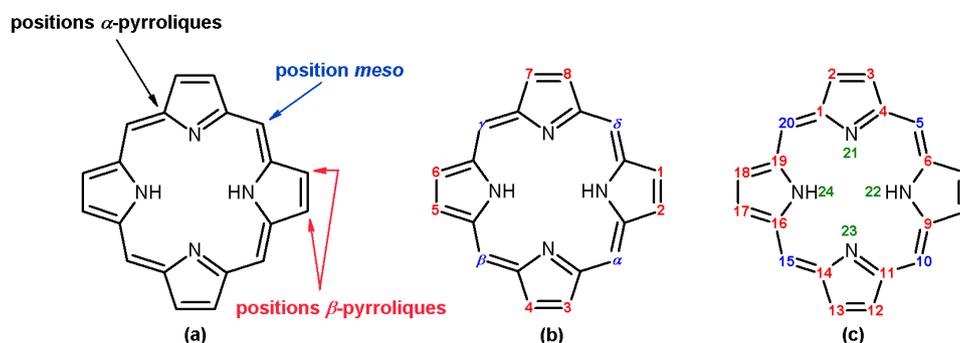


Figure 23 : (a) nomenclature triviale ; (b) nomenclature de Fischer ; (c) nomenclature systématique officielle.

Les porphyrines possèdent également certains analogues appelés «porphyrinoïdes» ; illustrés sur la figure 24. Il s'agit de corroles, de corrines, de porphyrines « *N*-confusent », d'hétéroporphyrines et l'ensemble des macrocycliques apparentés de plus grande taille ; certains ont jusqu'à 16 unités pyrroliques, les hexadécaphyrines. ^[66]

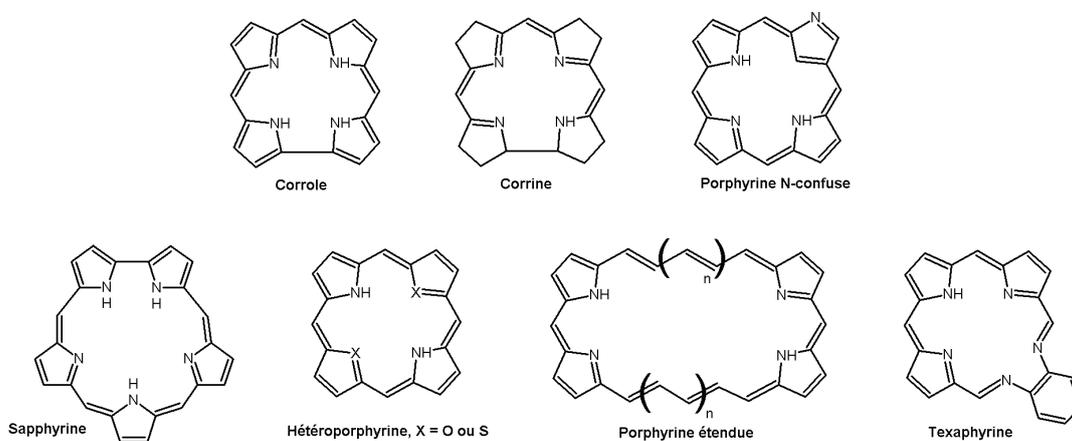


Figure 24 : Dérivés de porphyrines

Le macrocycle tétrapyrrolique a priori plan par sa conjugaison possède quelques degrés de liberté en raison de sa taille. De ce fait, il est capable d'adopter dans certains cas des conformations non planes. Cette flexibilité est à l'origine de distorsions observées lors de la protonation des deux atomes d'azote non hydrogénés ou après métallation. ^[67] En effet la présence d'un petit ion métallique tel que Ni(II) engendre la distorsion du cycle (figure 25). ^[68]

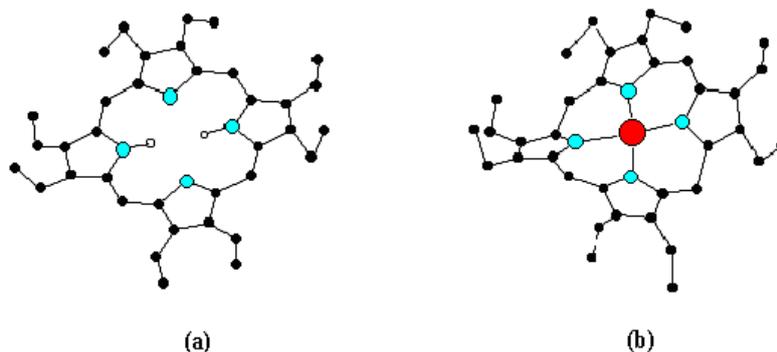


Figure 25 : (a) octaéthylporphyrine base libre plane ; (b) octaéthylporphyrine de Nickel non plane (Ruffled)

La présence des groupements volumineux en position méso ou la substitution des positions β -pyrroliques peut également engendrer une conformation non plane. Par exemple les groupements phényles, en position méso, s'orientent dans le plan perpendiculaire à celui de la porphyrine, pour ainsi limiter les interactions stériques avec les hydrogènes β -pyrroliques.

Les macrocycles tétrapyrroliques sont très largement présents dans les milieux vivants. En effet leurs propriétés oxydo-réductrices ou photochimiques sont mises en œuvre dans tous les systèmes vivants. Dans ces systèmes, les macrocycles sont généralement métallés et associés à des protéines. La figure 26 présente quelques exemples choisis parmi les plus représentatifs.

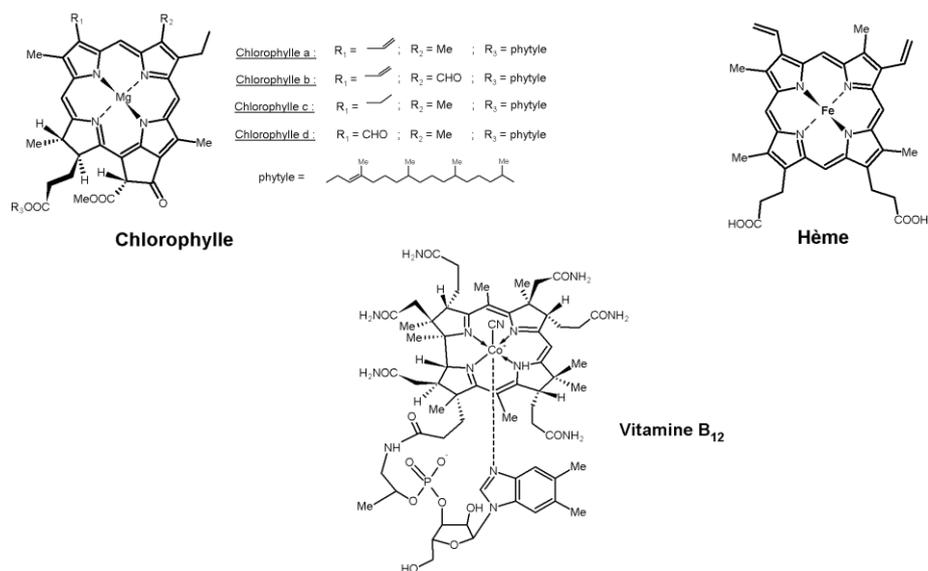


Figure 26 : Exemples de macrocycles tétrapyrroliques naturels

Les propriétés remarquables de ces macrocycles bien qu'étant dans tous les cas inducteur de processus d'oxydo-réduction, diffèrent sensiblement lorsqu'on passe du règne animal au règne végétal. Par exemple dans le règne animal le transport et le stockage des gaz respiratoires (O_2 , CO_2) sont assurés par l'hémoglobine (transport) et la myoglobine (stockage). Ces deux protéines, de structure proche, possèdent comme groupement prothétique l'hème qui est la protoporphyrine IX métallée par le fer (II). On trouve d'autres métalloprotéines ; la classe des cytochromes ; construites autour d'un noyau héminique. Comme exemple on peut citer le cytochrome P450 métabolise des composés xénobiotiques (substance possédant des propriétés toxiques) en catalysant leur oxydation ou leur réduction.^[69] Enfin, on a la vitamine B_{12} qui est une corine métallée par un atome de cobalt se trouvant à divers degrés d'oxydation.

Chez les végétaux, les noyaux porphyriniques sont des pigments présent dans toutes les plantes vertes ; ce que l'on nomme couramment « chlorophylle ». En réalité c'est un mélange de plusieurs molécules de structures chimiques très proches. Ils possèdent un squelette de base qui est celui d'un noyau chlorine avec une chaîne carbonnée à sa périphérie et sont généralement complexés à un ion magnésium. Ces composés jouent des rôles essentiels dans la photosynthèse comme nous l'avons montré dans le cas du règne animal.

2-2- Propriétés spectrales

2-2-1- Spectroscopie UV-Visible

Afin d'évoquer leur très forte coloration, les macrocycles tétrapyrroliques ont été nommés « porphyrine », du grec « porphura » (pourpre). Leur intense coloration des porphyrines provient de leur système fortement conjugué à 18 électrons π . Ces molécules absorbent dans le domaine du visible et présentent un spectre d'absorption très caractéristique résultant de transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. Le spectre UV-visible des porphyrines se compose d'une bande d'une bande intense ($\epsilon > 10^5 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret et quatre autres bandes de moindre intensité aux plus grandes longueurs d'ondes (entre 500 et 680 nm) nommées bandes Q (figure 27).

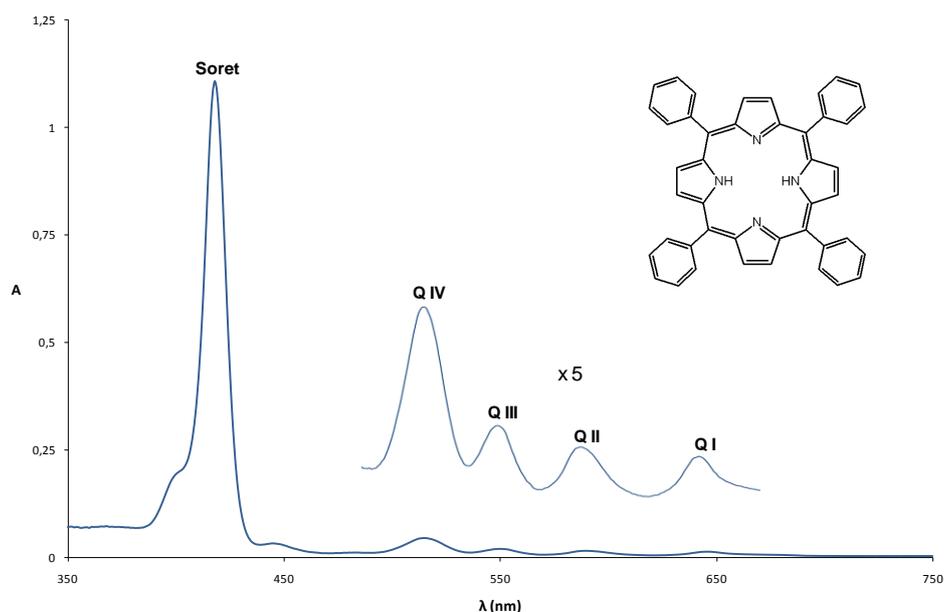


Figure 27 : Spectre UV-visible caractéristique d'une porphyrine base « libre » : la H2TPP (dans le CHCl₃)

L'intense bande de Soret est caractéristique de la conjugaison du macrocycle, mais la région du spectre située dans le visible est plus utile. Cette région est généralement sensible aux variations de structure et renseigne de surcroît sur une éventuelle substitution du macrocycle. En effet les quatre bandes Q (figure 27) qui sont numérotés de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités relatives varier notablement en fonction de la nature et l'agencement des substituants.^[70] On distingue essentiellement quatre types de spectre appelés *étio*, *rhodo*, *oxorhodo* et *phyllo* (figure 28).^[71]

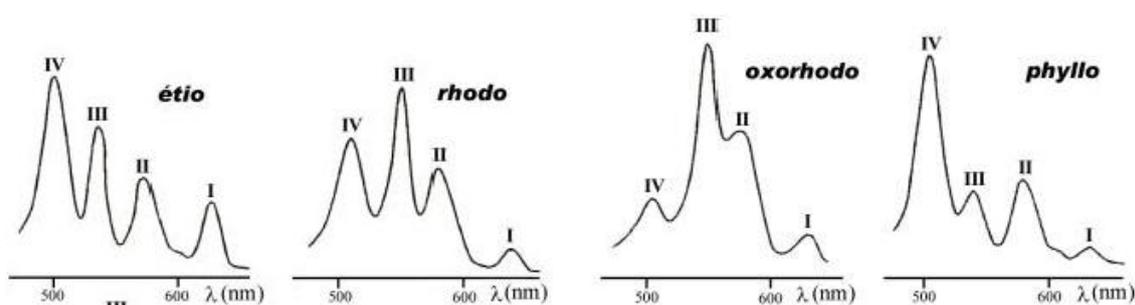


Figure 28 : Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres d'absorption de porphyrines bases libres

Le type *étio* est principalement rencontré dans le cas de porphyrines β -substituées par au moins six groupements, ou dans le cas des *méso*-arylporphyrines. Cependant le type *phyllo* est obtenu avec les *méso*-porphyrines substituées par des groupements saturés (chaînes alkylées). La présence de groupements riches en électron π sur la position β ; comme dans le cas des bactériochlorophylles ;

génère un profil de spectre type *rhodo*. Une porphyrine, qui porterait ces mêmes substituants portés par deux pyrroles opposés présentera un spectre de type *oxorhodo*.

La protonation en milieu acide ou la métallation des porphyrines bases libres conduit à une symétrie accrue du macrocycle. On observe alors la fusion des bandes IV à I en deux bandes Q (figure 29), tandis que la bande de Soret y demeure. Ces derniers sont nommés α et β et leurs intensités sont fonction de la nature du métal.

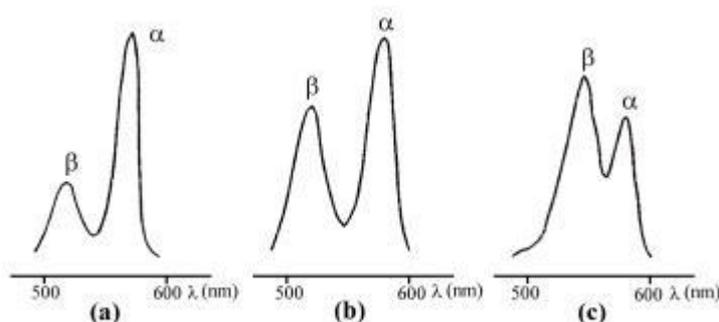


Figure 29 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par : Ni (a), Pd (b), Zn (c)

2-2-2- Résonance magnétique nucléaire

La résonance magnétique nucléaire (RMN) des porphyrines a fait l'objet d'un grand nombre de travaux. ^[72]

2-2-2-1- Spectroscopie RMN du proton

La RMN du proton appliquée à l'étude des macrocycles porphyriniques fournit des spectres caractéristiques. Les porphyrines possèdent un courant de cycle important affectant ainsi l'ensemble des protons du macrocycle. Ce courant de cycle induit par un champ magnétique (imposé par l'appareil) génère un important cône d'anisotropie magnétique dont l'axe est perpendiculaire au plan du macrocycle (figure 30).

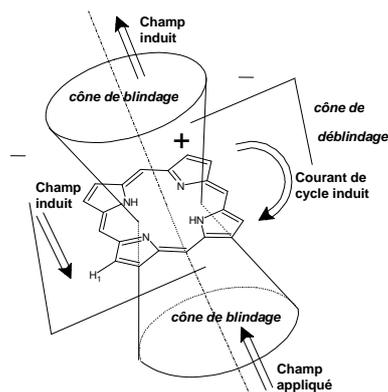


Figure 30 : Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine

Les protons situés à l'intérieur de ce cône sont blindés alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont déblindés. En effet le spectre RMN ^1H de la porphyrine (porphyrine sans aucun substituant), possède 3 singulets à -3,76 ; 9,74 ; 10,50 ppm. Ces signaux sont attribués respectivement aux protons liés aux atomes d'azote, aux protons des positions β – pyrroliques et aux protons méso (H méthine). Ces derniers liés à des carbones essentiellement déficients en électrons, ils sont plus déblindés que les protons β -pyrroliques. Notons par ailleurs que l'unicité du signal des 8 protons β -pyrrolique résulte de la tautomérisation des protons NH internes (figure 31)

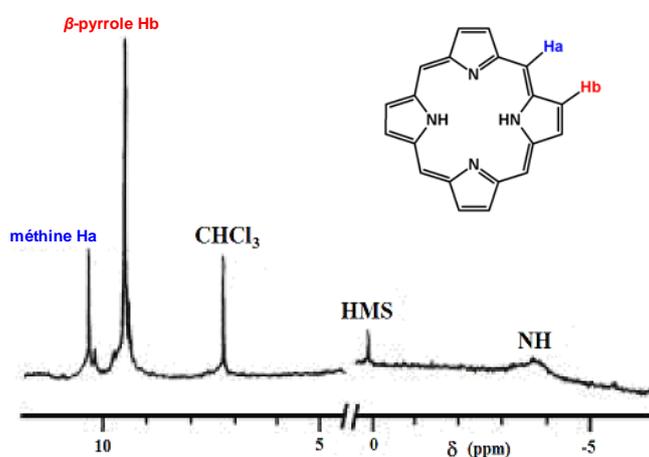


Figure 31 : Spectre RMN ^1H de porphyrine dans CDCl_3

Pour les porphyrines de structures plus complexes, les variations de déplacement chimiques sont plus importantes. Prenons le cas des porphyrines méso-substituées ou β -substituées où les substituants affectent les déplacements chimiques des protons du macrocycle. Il ya un blindage des protons périphériques et un déblindage des protons internes dus à une diminution du courant de cycle. Néanmoins, on retrouve d'une façon globale les spectres caractéristiques des porphyrines.

L'insertion d'un métal de transition ou d'un lanthanide au sein d'un macrocycle porphyrinique modifie sensiblement le spectre. On observe ainsi la disparition des signaux NH pyrroliques qui

s'accompagnent de variations des déplacements chimiques des protons périphériques (β -pyrroliques et *méso*).

2-2-2-2- Spectroscopie RMN du carbone 13

Bien que la résonance des noyaux soit relativement peu affectée par les courants de cycle, le spectre RMN du carbone (RMN ^{13}C) du macrocycle porphyrinique comprend trois zones : Les carbones *méso* qui résonnent entre 95 et 120 ppm, les carbones β -pyrroliques vers 130 ppm et les carbones α -pyrroliques vers 145 ppm.

Un abaissement de la température (-60 °C) ralentit la tautomérie et à cette température on observe pour les carbones α -pyrroliques deux pics correspondant chacun à quatre carbones.^[73] Le signal correspondant aux carbones α -pyrroliques est généralement élargi et assez mal défini. Ceci est la conséquence de la tautomérie des protons NH internes. Ce phénomène peut également affecter dans certains cas la forme des signaux des carbones β -pyrroliques.

2-2-3- Spectrométrie de masse MALDI et ESI

Les porphyrines se caractérisent entre autres par une très faible volatilité ; les techniques classiques d'ionisation ne sont généralement pas adaptées. Il est donc nécessaire d'utiliser les méthodes de désorptions directes comme la Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI).

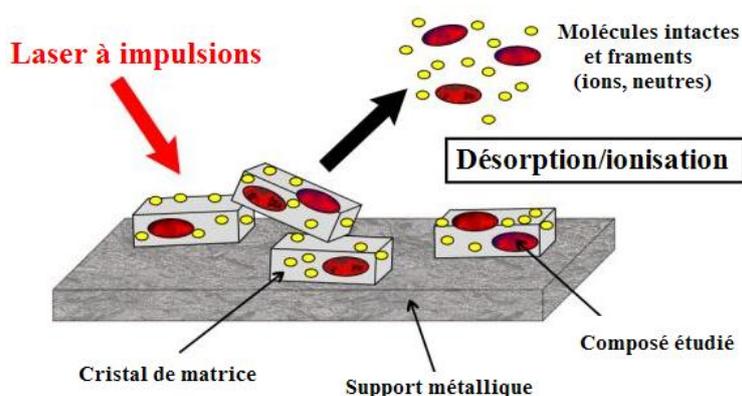


Figure 32 : Principe de la Technique MALDI

La technique MALDI permet le passage en phase gazeuse de molécules ionisées intactes à hauts poids moléculaires (figure 32).^[74] Le composé à analyser, mélangé à un excès de molécules d'un composé servant de matrice, est absorbé sur un support métallique. Le dépôt est irradié par des impulsions laser courtes (quelques nanosecondes) dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption de la matrice. L'énergie délivrée par le laser est absorbée de manière sélective par la matrice ce qui conduit à un phénomène de désorption et d'ionisation. Une faible partie de l'énergie absorbée est transmise sous forme d'énergie cinétique et d'énergie interne à la substance analysée ce qui provoque l'éjection d'espèces moléculaires essentiellement intactes. De ce fait les ions produits sont généralement $[M+H]^+$, $[M+H]^+$ ou peuvent être issus de processus de cationisation comme $[M+Li]^+$, $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$. La nature de la matrice est importante. En effet, elle doit être soluble dans les mêmes solvants que la substance étudiée de façon à obtenir un dépôt homogène. Elle doit également présenter une forte absorption à la longueur d'onde du laser. Comme matrice couramment employée nous pouvons citer l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA). Il existe une gamme assez étendue de composés pouvant être utilisés comme matrice en fonction des caractéristiques des porphyrines étudiées.^[75]

Le mode ESI (ionisation par électrospray) est aussi utilisé pour ces composés et permet d'obtenir l'ion moléculaire. L'ionisation par électro-vaporisation revient à introduire une solution de l'échantillon dans un capillaire soumis à un haut potentiel électrique. Les ions formés sous pression atmosphérique sont alors canalisés dans un ensemble d'échantillonneurs dans l'analyseur où règne un vide poussé.

2-3- Méthodes de synthèse

La méthodologie de synthèse des macrocycles tétrapyrroliques ou de leurs analogues a connu un grand développement depuis plus d'un demi-siècle. Quelle que soit la stratégie suivie, le noyau porphyrinique est formé par la mise en jeu de deux types de réaction : dans un premier temps des substitutions électrophiles sont réalisées pour former le macrocycle qui sera par la suite oxydé pour conduire au produit attendu. En fonction de la nature, du nombre et de la position des substituants à introduire sur le macrocycle, différentes stratégies ont été développées. Nous nous proposons dans ce qui suit de faire un tour d'horizon des grandes méthodes de synthèse.

2-3-1- Synthèse de méso-porphyrines

2-3-1-1- Condensation de pyrrole sur des aldéhydes

La condensation de pyrroles (quatre) sur des aldéhydes est une approche de synthèse particulièrement adaptée pour la préparation des méso-porphyrines. Les premières porphyrines synthétiques ont été obtenues à travers cette méthode. En effet, Rothermund ^[76] en 1935 décrit pour la première fois la synthèse d'une porphyrine symétrique substituée en position *méso*. Il a formé la méso-tétraphénylporphyrine avec un très faible rendement, en faisant réagir sous atmosphère d'azote un mélange d'éthanal et de pyrrole dans le méthanol à diverses températures. En 1941, Rothermund ^[77] améliore les très faibles rendements obtenus. Ainsi, en chauffant à 220 °C pendant 48 heures un mélange de pyrrole et de benzaldéhyde dans la pyridine, il obtient dans une ampoule scellée la méso-tétraphénylporphyrine avec un rendement de l'ordre de 5 % (figure 33). ^[78] Dans de telles conditions, seuls les aldéhydes aromatiques les plus résistants au chauffage ont pu former des méso-tétraphénylporphyrines symétriques.

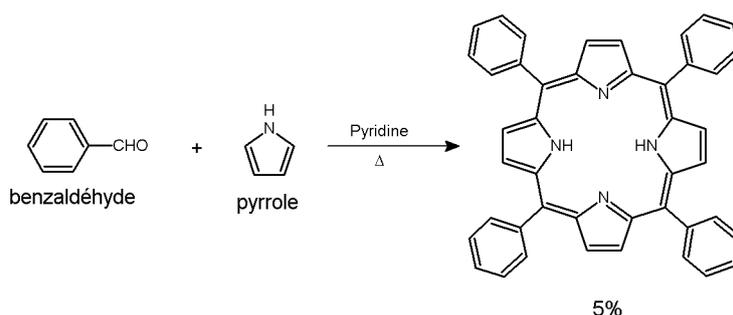


Figure 33 : Méthode de Rothermund appliquée à la synthèse de la méso-tétraphénylporphyrine

En 1967, Adler et Longo ^[79] ont amélioré significativement la synthèse de porphyrines par condensation d'aldéhydes et de pyrrole. En effet, ils obtiennent la méso-tétraphénylporphyrine avec un rendement supérieur à 20 % après condensation du pyrrole et du benzaldéhyde dans l'acide propionique à reflux. La méthode d'Adler Longo, grâce à ces conditions de réactions plus douces, a permis d'accéder à un éventail beaucoup plus large de méso-porphyrines symétriques.

En 1975, Little et Coll ^[80] ont adapté cette méthode à la synthèse de méso-arylporphyrines substituées par un, deux et trois groupements aromatiques identiques. Cette méthode dite des « aldéhydes mixtes » consiste à condenser, toujours dans l'acide propionique à reflux, du pyrrole avec cette fois-ci

deux aldéhydes différents (figure 34). La stœchiométrie des aldéhydes initiaux permet d'obtenir une méso-porphyrine non symétrique.

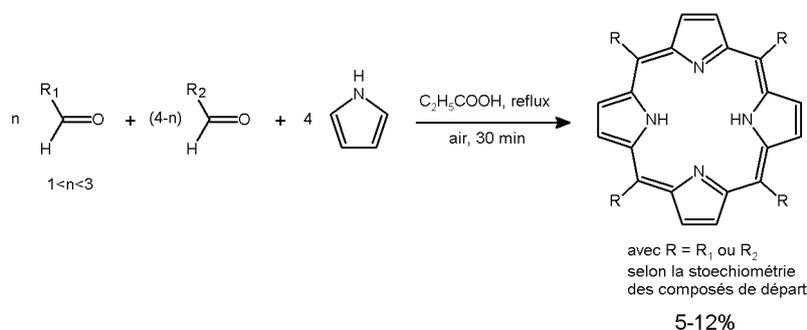


Figure 34: Méthode des aldéhydes mixtes

Les rendements modestes obtenus par cette méthode (de 4 à 12 %) s'explique par sa faible sélectivité (formation concomitante des autres méso-porphyrines substituées), mais aussi par les réactions de polymérisation du pyrrole qui ont lieu au cours de la synthèse. Largement appliquée, l'approche de Little reste la méthode de choix pour la préparation des méso-porphyrines monofonctionnelles. Cette méthode sera plus largement détaillée de la seconde partie de ce travail.

En 1985, Gonzalves et Coll. ^[79] ont suggéré que l'origine des faibles rendements observés lors de la synthèse de Rothemund est due aux difficultés à oxyder les porphyrinogènes, produits intermédiaires de cette synthèse. En partant de cette hypothèse, Lindsey et Coll. ^[80] ont synthétisé un grand nombre de méso-trétraarylporphyrines avec des rendements beaucoup plus importants (figure 35). Ils font réagir du pyrrole et de l'alkylaldéhyde en présence d'acide trifluoroacétique ou d'acide de Lewis en quantité catalytique pour former un porphyrinogène. Le porphyrinogène obtenu est ensuite oxydé en porphyrine par une quinone (par exemple le DDQ).

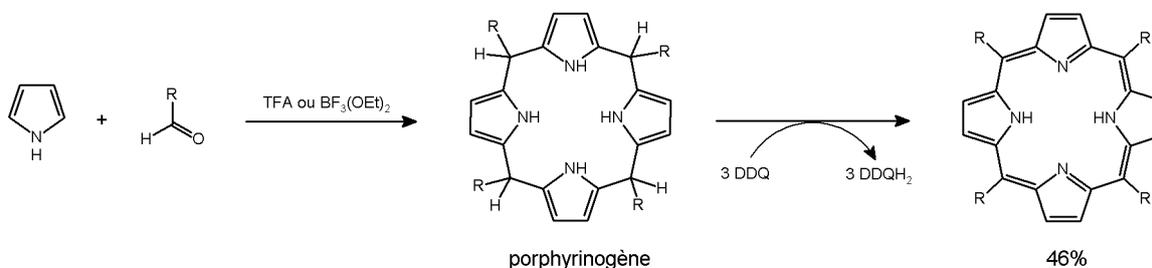


Figure 35 : Méthode de Lindsey

Les conditions assez douces de la méthode de Lindsey autorisent aussi l'emploi d'aldéhydes thermiquement peu stables (substitués par des sucres ou portés par des hétérocycles). Les rendements optimaux ont été obtenus en milieu dilué (de l'ordre de 10^{-2} M en concentration des réactifs) en présence de quantité catalytique d'acide (TFA ou $\text{BF}_3\text{-Et}_2\text{O}$).

Une méthode alternative à celle de Lindsey a été développée au sein de notre Laboratoire. Cette méthode originale utilise sous micro-ondes de l'iode comme catalyseur acide (figure 36), et a la particularité d'employer des réactifs et des solvants non distillés.

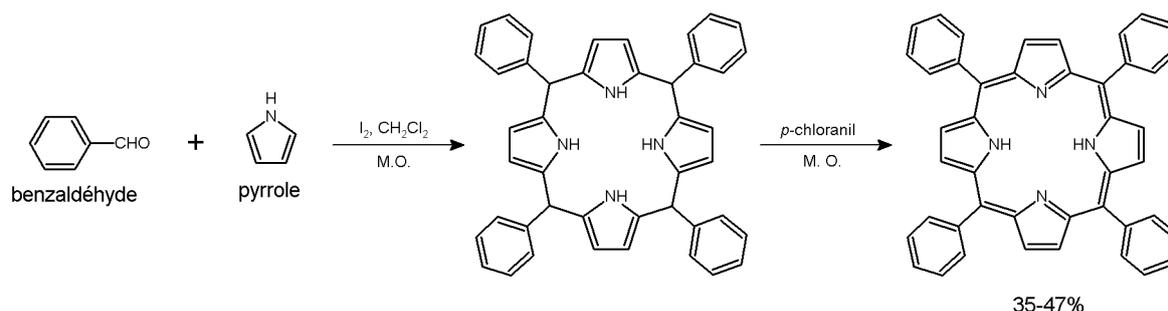


Figure 36: Synthèse de méso-tétraphénylporphyrine assistée par micro-ondes

La condensation du benzaldéhyde et du pyrrole dans le dichlorométhane, à des fortes concentrations conduit à des rendements de l'ordre de 35 à 47 %. Le meilleur rendement (47 %) est obtenu avec des concentrations en réactifs de 10^{-2} M (condition de Lindsey) et une quantité catalytique d'iode.

D'autres méthodes de synthèse en absence de solvant ont fait l'objet de travaux. Par exemple, Petit et Coll. ^[81] ont décrit une synthèse de tétraphénylporphyrine sous micro-ondes en utilisant comme catalyseur de la silice ou de l'argile. Face aux faibles rendements obtenus (7 à 8 %), cette méthode n'a pas pu être développée. La synthèse sans solvant de porphyrines n'a que peu évolué durant ces dix dernières années.

Dans le cadre de son programme de chimie verte, le LSCN a récemment développé une méthode en utilisant du charbon actif ^[82] prétraité à l'acide nitrique comme promoteur acide. Les méso-porphyrines symétriques comme la tétratolyl- et la tétra-anisylporphyrine (figure 37) sont ainsi obtenus avec d'excellents rendements (respectivement 40 % et 33 %). Des porphyrines monofonctionnelles, portant notamment des substituants glycosylés, ont également été obtenues.

Cette méthode écologique est transposable à grande échelle car elle est simple à mettre en œuvre, rapide, efficace et économique.

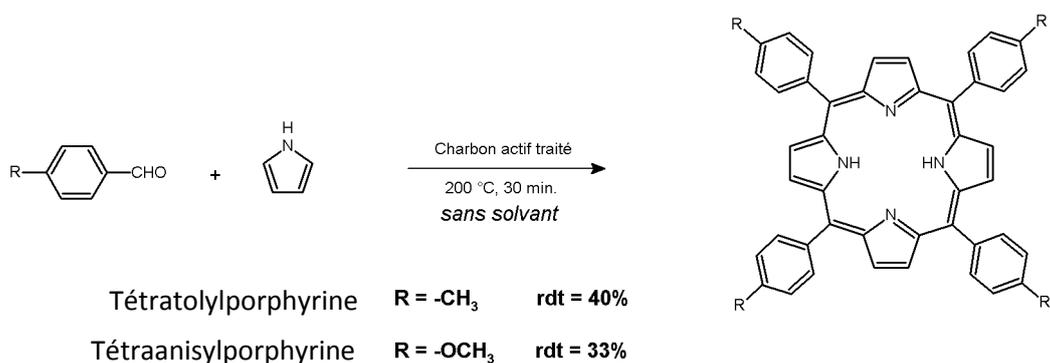


Figure 37: Synthèse sans solvant par le charbon actif traité, de tétra-arylporphyrines symétriques

2-3-1-2- Condensation de dipyrrométhane sur des aldéhydes

Cette approche vise plus particulièrement l'obtention des *méso*-porphyrines β -substituées par réaction d'un dipyrrométhane non substitué sur les positions 5 et 5' avec un 5,5'-bis-formyldipyrrométhane. Cette méthode, connue sous le nom de méthode MacDonald ou «2+2», conduit dans un premier temps à la formation d'un porphyrinogène qui est ensuite oxydé par l'air (figure 38). [83]

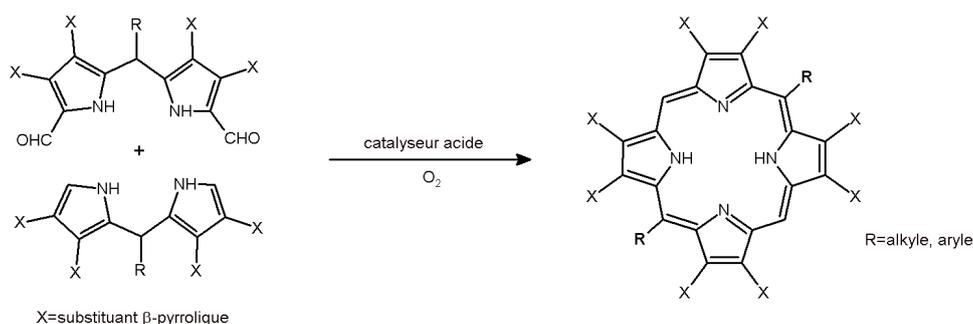


Figure 38 : Procédure générale de la méthode de condensation des dipyrrométhanes

Les dipyrrométhanes sont généralement obtenus en faisant réagir un aldéhyde aliphatique sur un excès de pyrrole par l'intermédiaire d'un réactif de Grignard. [84] Une autre méthode d'obtention de dipyrrométhane a été mise au point par Vignond [85], réalisant la condensation directe du pyrrole sur différents aldéhydes dans un mélange THF/acide acétique. Finalement, Lindsey est parvenu à synthétiser « one-flask » plusieurs *méso*-dipyrrométhanes [86], l'aldéhyde réagissant avec un excès de pyrrole sous catalyse acide (TFA ou $BF_3 \cdot ET_2O$) à température ambiante.

L'utilisation de dipyrrométhane a été par la suite très largement étudiée et appliquée à la synthèse de *méso*-porphyrines, plus particulièrement des *méso*-porphyrines *trans*. Cependant, les rendements obtenus se sont avérés modestes et le produit attendu doit invariablement être isolé d'un mélange de porphyrines isomères, difficilement séparables. La formation des isomères *cis* s'explique par un processus appelé « scrambling ». Au cours des dix dernières années, Lindsey a réalisé une étude très détaillée sur ce processus, et en a déduit que le mélange isomérique *cis/trans* est dû à l'acidolyse de l'intermédiaire réactionnel, puis à la recombinaison des unités libérées (figure 39). Ce processus d'échange, « scrambling », est fréquemment observé lors de la condensation de polypyrranes. ^[87]

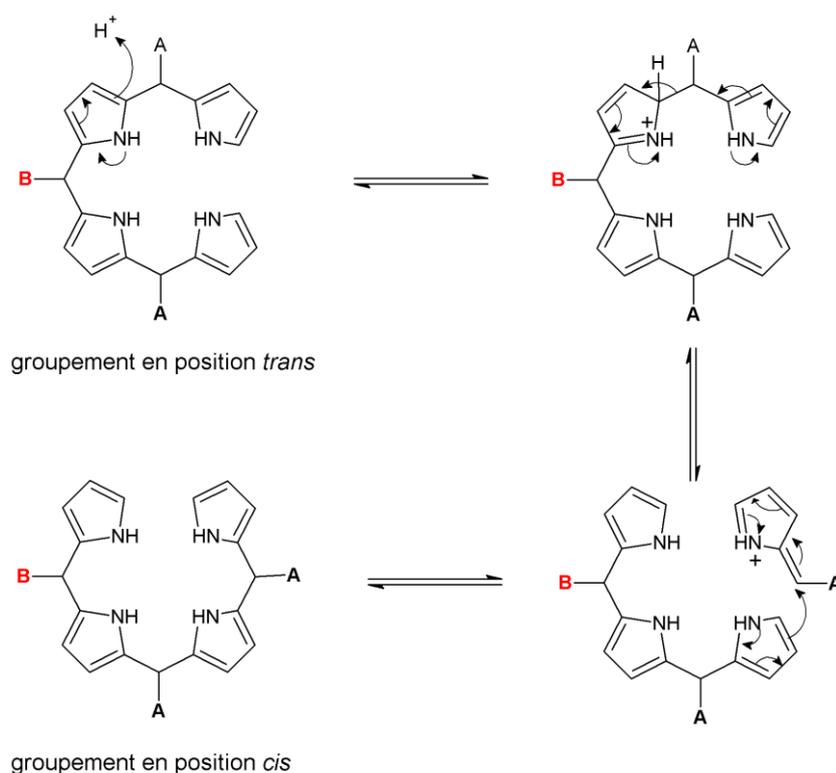


Figure 39 : Mécanisme du phénomène de « scrambling »

A l'appui de ces résultats, Lindsey a montré qu'il était possible d'obtenir spécifiquement une *trans*-porphyrine en utilisant des dipyrrométhanes encombrés comme le mésityldipyrrométhane. ^[88] Il a obtenu de cette façon la 5,15-bis (mésityl-)-10,20-bis (4-méthylphényl) porphyrine avec un rendement de 48 % sans observer la formation de l'isomère *cis* (figure 40).

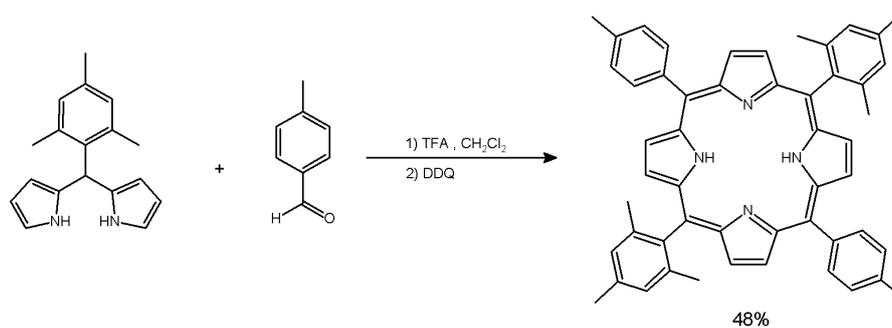


Figure 40: Adaptation de la méthode MacDonald « 2+2 » à la synthèse de trans méso-porphyrines

2-3-2- Synthèse de porphyrines β -substituées

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

Cette méthode de synthèse repose sur le principe de la tétramérisation de pyrroles non substitués en position α en présence de composés assurant la formation des ponts méthine. Treibs et Haberle ^[89] ont ainsi pu obtenir l'octaméthylporphyrine par réaction du 3,4-diméthylpyrrole avec le formaldéhyde dans l'acide acétique et en présence de pyridine. Le rendement de cette réaction est de 77 % (figure 41).

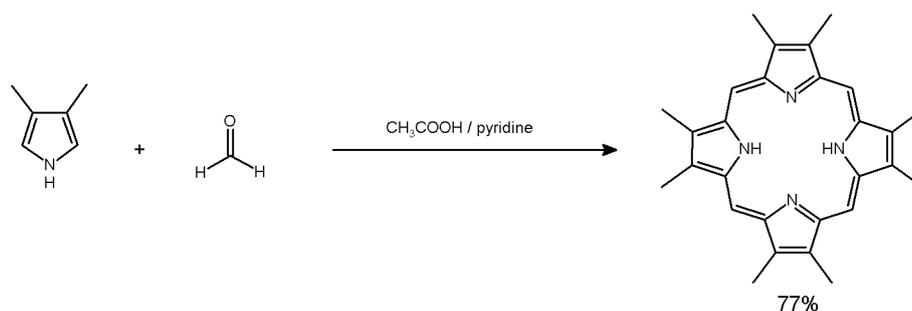


Figure 41 : Synthèse de l'octaméthylporphyrine

Une autre approche consiste de passer par la condensation de pyrroles substitués en position 2 et/ou 5 représentés sur la figure 42.

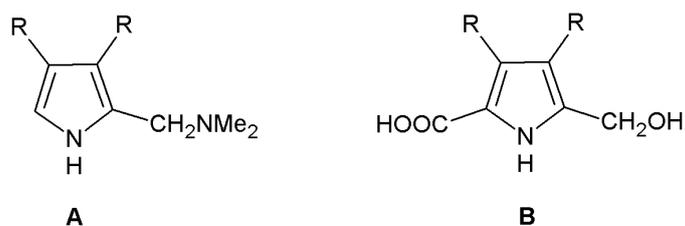


Figure 42 : Pyrroles substitués

Ce type de réaction donne des résultats satisfaisants que si les deux positions β -pyrroliques sont substituées. ^[90]

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

Les intermédiaires de type dipyrrométhane ou dipyrrométhène sont adaptés à la synthèse de porphyrines centrosymétriques ou ayant une symétrie dans l'une ou l'autre moitié de la molécule. Ainsi Fischer et Coll. ^[91] ont synthétisé, de nombreuses porphyrines β -substituées à partir de dipyrrométhènes dans des solvants organiques acides à des températures supérieures à 200 °C (figure 43).

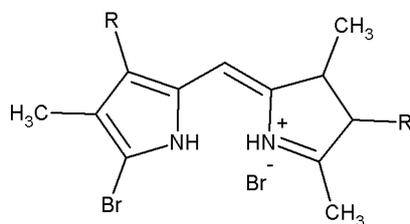


Figure 43 : Dipyrrométhènes utilisés par Fischer

La méthode « 2+2 » que nous avons décrite précédemment pour la synthèse de *méso*-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 (figure 44). Celle-ci consiste à condenser un tripyrrane sur un diformyl-pyrrole.

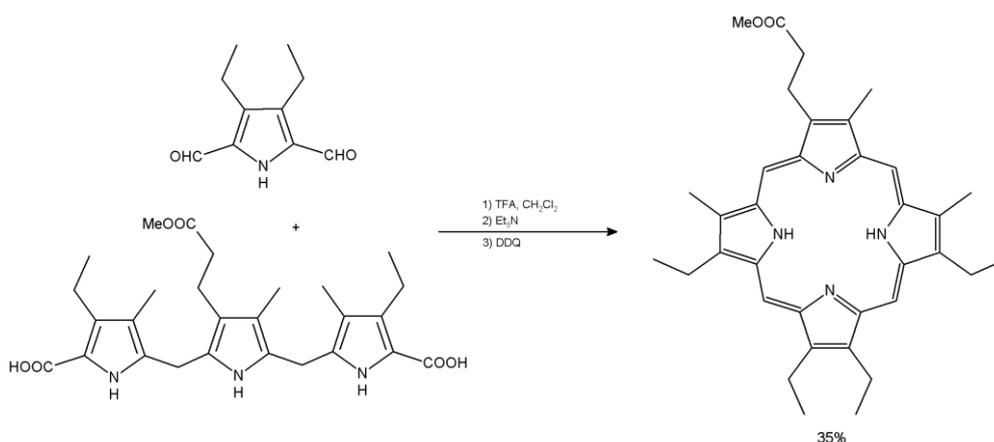


Figure 44 : Exemple de synthèse par la méthode « 3+1 »

La méthode « 3+1 » a permis d'obtenir des porphyrines β -substituées mono-fonctionnalisées ou di-fonctionnalisées sur le même pyrrole avec des rendements de l'ordre de 35 %.^[92]

2-3-2-3- A partir d'unité tétrapyrroliques

La dernière possibilité de former le macrocycle tétrapyrrolique consiste à cycliser des intermédiaires tétrapyrroliques linéaires. Cette approche est utilisée pour la synthèse des porphyrines β -substituées qui ne possèdent pas de symétrie.^[93] Nous pouvons citer en exemple la synthèse de l'isocoporphyrine. En effet l'intermédiaire est élaboré au cours d'une synthèse multi-étapes comme le sont les séquences peptidiques ou nucléotidiques. Il est ensuite cyclisé, puis oxydé pour donner la porphyrine attendue.

2-3-3- Hémi synthèse de porphyrines β -substituées à partir de pigments animaux ou végétaux

2-3-3-1- A partir des pigments d'origine animale

Nous présenterons ici quelques exemples de macrocycles tétrapyrroliques naturels ; plus particulièrement les porphyrines β -substituées. Le groupe prosthétique de l'hémoglobine est la protoporphyrine de fer (II) ou hème. Il constitue le dérivé porphyrinique le plus abondant dans les animaux supérieurs. La chloroporphyrine de fer (III) résulte de l'oxydation du fer (II) lors de son extraction. La protoporphyrine IX est obtenue quant à elle par simple démétallation de la protohème IX. La mésoporphyrine IX et l'hématoporphyrine IX sont obtenues par modification des bras vinyliques (figure 45).

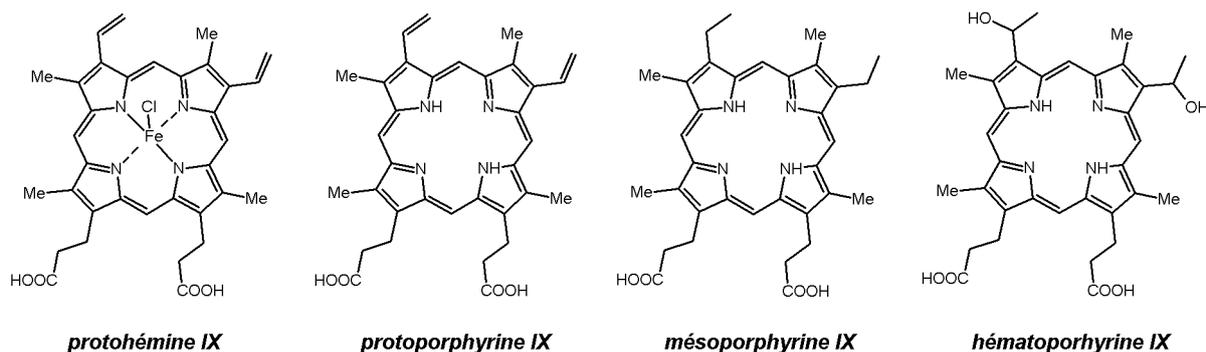


Figure 45 : Structures de la protohème et dérivés

La protohème quant à elle, est obtenue à partir du sang selon l'une des deux méthodes décrites ci-dessous.

- *La méthode de Fischer*^[94]

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

- *La méthode de Labbe et Nishida*^[95]

Labbe et Nishida ont proposé une méthode basée sur l'usage de chlorure de Strontium, afin d'éliminer la majorité des protéines par filtration à chaud. La protohème cristallise ainsi dans le filtrat en cours de refroidissement, puis elle est purifiée également par recristallisation. Les rendements obtenus par cette méthode sont sensiblement identiques que ceux obtenus par la méthode de Fischer.

2-3-3-2- A partir des pigments d'origine végétale

Les chlorophylles naturelles peuvent être extraites en abondance à partir des feuilles des végétaux supérieurs. La méthanolyse de la chlorophylle a permis d'obtenir la chlorine-*é*triméthylester.^[96] D'autres dérivés porphyriniques ont également pu être obtenus par modification

chimique de la chlorophylle a, notamment la phylloporphyrine XV diméthylester et la pyrroporphyrine XV diméthylester (figure 46).^[97]

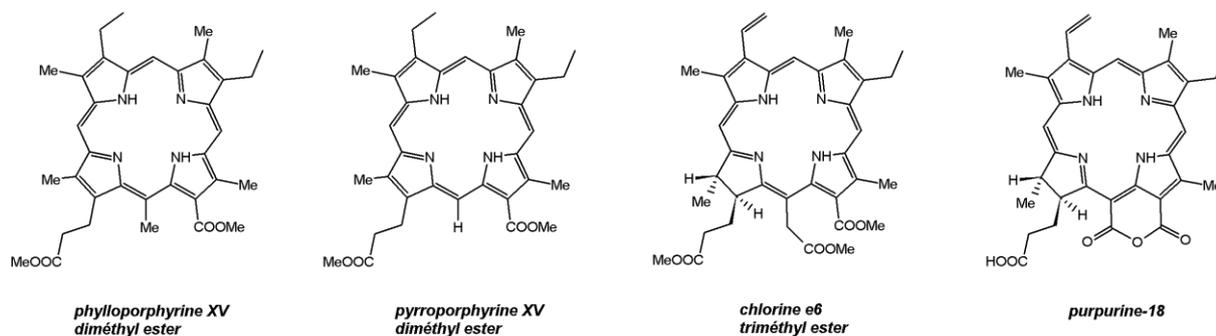


Figure 46 : Macrocyces tétrapyrroliques issus de la chlorophylle a

2-4- Autres Applications

Bien qu'utilisées en tant que photosensibilisateurs de choix en PDT, les porphyrines présentent des propriétés chimiques remarquables. De ce fait, les quatre azotes donneurs dirigés vers l'intérieur du macrocycle plan confèrent un très fort effet chélatant aux porphyrines. Sous leur forme chélatée, ils forment de puissants systèmes oxydoréducteurs. Ils peuvent ainsi être utilisés dans l'époxydation des oléfines, l'hydroxylation d'alcane, mais aussi comme catalyseur dans des clivages oxydatifs. Les porphyrines trouvent également d'autres applications comme l'oxydation photo-induite des composés organiques (la cellulose par exemple) et la photodécomposition de l'eau.^[98]

Ces dernières années, les macrocycles tétrapyrroliques métallés ou non se sont révélés être d'excellents candidats pour la conception de dispositifs moléculaires photoniques. Dans ce domaine, le champ d'application des macrocycles tétrapyrroliques est vaste ; élaboration de cristaux liquides^[99], exploitation des propriétés d'optique non linéaire de matériaux résultant de l'assemblage de porphyrines pour le développement de systèmes de communication optique, de stockage de données.

Les porphyrines trouvent également d'autres applications thérapeutiques en dehors de la cancérologie. Elles sont utilisées par exemple dans le traitement des maladies dégénératives de la rétine ou DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge). Cette maladie atteint ainsi les vaisseaux sanguins proliférant sous la rétine. Depuis 2000 une molécule nommée commercialement Visudyne est utilisée pour traiter cette maladie (figure 47). En s'accumulant naturellement et rapidement dans les vaisseaux rétiens,

elle permet après son activation par un laser optique l'obstruction des vaisseaux tout en épargnant la rétine. ^[100]

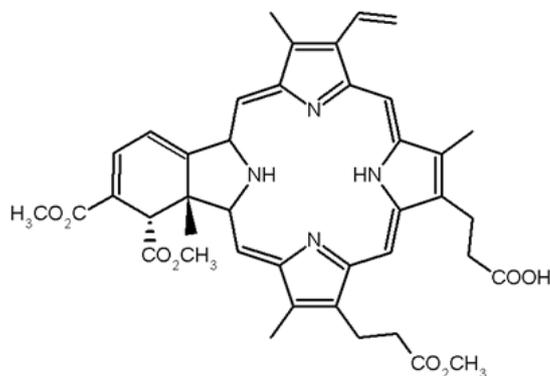


Figure 47 : Structure de Visudyne (Vertéporfine)

Une autre application thérapeutique a pu être mise en évidence ces dernières années ; c'est l'effet antimicrobien. Il s'agit d'un concept de photochimiothérapie antibactérienne (PACT ou Photo-Antimicrobial ChemoTherapy). Ce principe basé, comme la PDT, sur l'utilisation combinée de sensibilisateur et de lumière visible, est une approche prometteuse pour l'inactivation des micro-organismes. ^[101]

Selon le type d'administration (voie orale ou injection), les porphyrines pourront être distribuées dans l'organisme en fonction des propriétés intrinsèques liées à leur structure moléculaire. La quantité finale de porphyrines atteignant un site ciblé correspond généralement à une faible proportion de la dose administrée. De plus l'accumulation de ces substances dans des tissus sains peut provoquer des réactions et conduire à des effets secondaires indésirables. De ce fait l'administration de ces macrocycles est prise en compte en fonction de la balance risque/bénéfice. Ainsi la vectorisation des porphyrines constitue alors un concept extrêmement séduisant, car elle consiste à apporter sélectivement les principes actifs là où ils doivent agir dans l'organisme.

B- Nanoparticules magnétiques : Vectorisation, Ciblage et Thérapie thermique

1- Les (nano) biotechnologies au service de la médecine

Une nanoparticule est une particule dont le diamètre nominal est compris entre 5 et 500 nm. La (nano) biotechnologie est donc basée sur les propriétés intrinsèques des composés de taille nanométrique et sur la possibilité de les utiliser ou de les assembler de façon à obtenir des propriétés spécifiques en biologie.

Un vecteur est un composé capable de transporter le principe actif jusqu'à traverser les différentes barrières physiologiques pour atteindre la cible (organe, tissu, cellule, noyau, etc...). De ce fait, de nombreuses stratégies de vectorisation vers des zones pathologiques ont été développées au cours de ces dernières années : de la modification directe de la molécule médicamenteuse par conjugaison de protéines ou peptides (immunotoxines, prodrogues, peptides chimériques, peptides de Troie) ^[102] à l'utilisation de porteurs particuliers de principes actifs, conjugués ou non à des molécules de ciblage (peptides, vitamines...). Cependant ces stratégies de vectorisation sont confrontées à un certain nombre de limitations comme :

- la quantité d'agent administrée,
- La libération du principe actif au cours de sa diffusion dans l'organisme avant d'atteindre les tissus pathologiques
- La mise en place d'une réponse immunitaire à la suite d'une injection de trop grande quantité de vecteurs.

Pour palier à ces nombreuses limites, un nouveau concept de vectorisation s'est développé ; il s'agit des vecteurs particuliers. Ces vecteurs particuliers sont des objets conçus pour transporter une grande quantité de principe actif. Ils doivent en outre améliorer leur pénétration intracellulaire. ^[103] Les vecteurs particuliers peuvent être classés selon leur cible.

Dans ce qui suit, nous nous proposons de rappeler les principaux systèmes (que ce soit dans le domaine du traitement ou du diagnostic) aujourd'hui à l'étude et/ou commercialisés.

1-1- Vecteurs particuliers de la première génération

Les vecteurs particuliers de la première génération sont constitués de microsphère et de microcapsules.

- **Les microsphères** : ce sont des particules de polymères réticulés, dans lesquelles les substances médicamenteuses sont introduites *via* un solvant qui gonfle les particules. Certaines microsphères à base de polymère thermosensible sont hydrophobes et rétractés à 30 °C. En revanche à 20 °C, elles sont hydrophiles, expansées et permettent la libération du principe actif. ^[104] De tels matériaux seraient applicables en vectorisation, à condition de pouvoir ajuster cette température de transition, appelée température critique limite de solubilité (LCST) estimée à environ 37 °C. Des microsphères à base de polymère naturel existent également. Par exemple Kramer et coll. ^[105] ont pu préparer des microsphères à base d'albumine et en présence de médicaments de plusieurs classes. Cependant cette méthode est limitée par la stabilité thermique du médicament et le contrôle de sa quantité introduite dans les microsphères du fait de son fractionnement en deux phases.

- **Les microcapsules** : sont obtenues soit par un mécanisme de coacervation, soit par évaporation de solvant d'une suspension de gouttelettes polymériques contenant le médicament. ^[106] Ces vecteurs sont constitués d'une enveloppe solide renfermant un liquide, un solide ou une substance pâteuse. Du fait de leur taille élevée (> 1 µm), ils sont surtout utilisés en chimioembolisation. Cette dernière est une technique thérapeutique qui consiste à faire régresser une tumeur en oblitérant sélectivement par cathétérisme ses artères ou artérioles nourricières au moyen de particules chargées en agents anticancéreux.

1-2- Vecteurs particuliers de la deuxième génération

Cette deuxième génération regroupe les systèmes nanoparticulaires, essentiellement des systèmes lipidiques (liposomes et nanoparticules lipidiques), des nanoparticules de polymères, des nanoparticules d'or, des quantum dots, des nanotubes de carbone et des nanoparticules magnétiques précisément celles d'oxyde fer qui ont particulièrement attirées notre attention.

1-2-1- Systèmes lipidiques

Les systèmes lipidiques occupent une place de choix car ils sont présents dans la membrane plasmique de la cellule. Ils s'organisent sous la forme de liposomes ou sous la forme de nanosphères (nanocapsules lipidiques). ^[107]

Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules constituées d'une ou plusieurs doubles couches concentriques de phospholipides et de molécules de cholestérol encapsulant un réservoir aqueux. Leurs caractères biocompatibles et biodégradables ont largement motivé leur développement comme vecteur. ^[108] Ils se présentent sous la forme de vésicules sphériques constituées d'une ou plusieurs bicouches de phospholipides, similaires aux phospholipides présents dans les membranes cellulaires.

Les liposomes sont synthétisés à partir de films de phospholipides (ou glycérolphospholipides), dispersés en solution aqueuse. Leur diamètre varie de quelques nanomètres à quelques dizaines de microns. On distingue ainsi trois types de liposomes : les liposomes multilamellaires, relativement stables, mais polydisperses (80 nm à 10 μm) ; les liposomes unilamellaires larges de diamètre moyen variant entre 0,2 à 1 μm de plus grande capacité ; le troisième type de liposomes, les liposomes unilamellaires de petite taille, de distribution de taille plus étroite (20 à 50 nm), mais de contenance faible. Leur disposition originale s'explique à la fois par leurs caractères hydrophile et hydrophobe, dus respectivement à la portion (glycérol-phosphate) et aux chaînes carbonées qui les composent (figure 48).

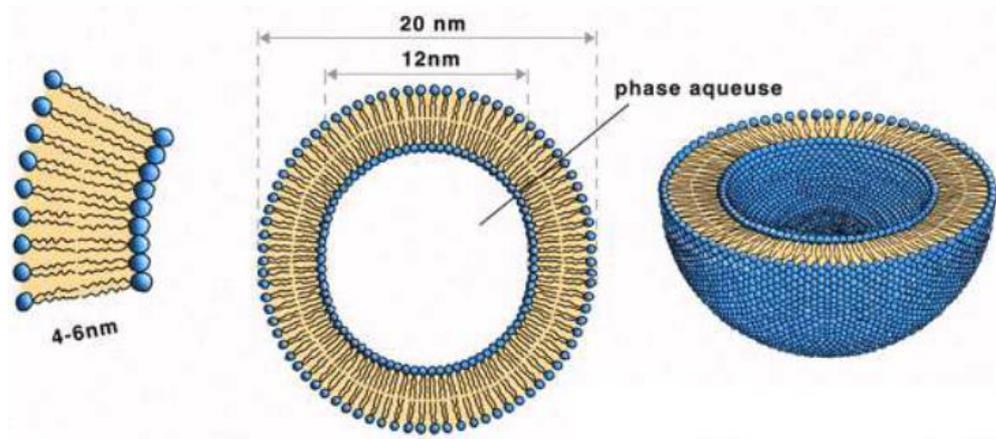


Figure 48 : Structure des Liposomes de petite taille

En fonction de leur capacité de ciblage vers des cellules tumorales, certains chercheurs ^[111] parlent de liposomes de première, deuxième ou troisième génération.

En effet les liposomes de première génération représentent ceux qui n'ont aucune capacité de ciblage. Aussitôt injectés par voie intraveineuse, ils sont interceptés par les opsonines qui alertent les cellules mononuclées du système des phagocytoses (macrophages, cellules de Kuppfer du foie et une zone marginale de la rate). Cet adressage naturel vers le foie ou la rate est intéressante lorsqu'on veut traiter ou diagnostiquer des cellules tumorales présentes au niveau du foie (métastase hépatique). Cependant

lorsqu'il s'agit de cibler des cellules autres qu'hépatiques, ces liposomes trouvent rapidement leur limite.^[109]

Cette limite a pu être repoussée avec la venue des liposomes de deuxième génération. Ceux-ci sont recouverts sur leur surface de PEG (polyéthylène glycol) ; on parle alors de liposomes « peggylés ». Ceci dans le but d'empêcher leur opsonisation et leur destruction par les cellules de Kupffer et de la rate. Ces liposomes échappant aux macrophages du SPM ont ainsi un caractère « furtif ». Cette furtivité augmente considérablement le temps de circulation dans le flux sanguin et la probabilité de traverser les tissus tumoraux, pour atteindre les cellules malades. Ce ciblage est donc dit « passif » (figure 49).

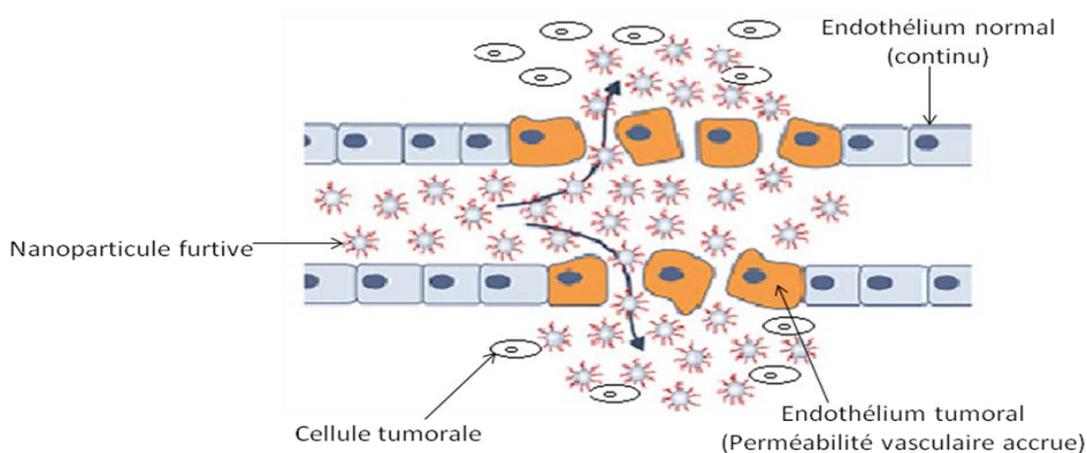


Figure 49 : Diffusion de nanoparticules « furtives » à travers un endothélium tumoral

Cependant malgré cette avancée de tels vecteurs restent néanmoins incapables de cibler spécifiquement une cellule cancéreuse. On a ainsi développé les liposomes de troisième génération. L'enjeu pour ces liposomes est d'arriver à reconnaître les cellules cancéreuses. Ce ciblage « intelligent » exige la présence d'agents de ciblage (anticorps, peptides, sucres, acide folique...) qui sont greffés à la surface du vecteur « peggylé ».^[110]

Actuellement 6 types de liposomes sont commercialisés ; et le tableau 2 reporte quelques exemples de vecteurs commercialisés à base de liposomes.

Tableau 2 : Quelques vecteurs commercialisés à base de Liposomes

Nom commercial	Principe actif	Peggylé	Agent de ciblage	Application(s)
Doxil®	Doxorubicine	oui	non	Cancer ovarien
Caelyx®	Doxorubicine	oui	non	Cancer du sein Cancer ovarien

1-2-2- Les nanoparticules lipidiques

Les nanoparticules lipidiques sont des particules structurées autour d'un cœur lipidique généralement à base de triglycérides biodégradables, bioassimilables et non toxiques. Elles occupent une place de choix dans leur utilisation comme nanovecteurs de principes actifs. ^[111] En effet les lipides sont obtenus par émulsion et peuvent se présenter sous la forme de nanocapsules ou nanosphères (~ 100 nm) ^[111] (figure 50). De la même manière que pour les liposomes, des agents dispersants (de type PEG par exemple) et des agents de ciblage peuvent être greffés à leur surface pour acquérir respectivement un caractère « furtif » et un ciblage spécifique.

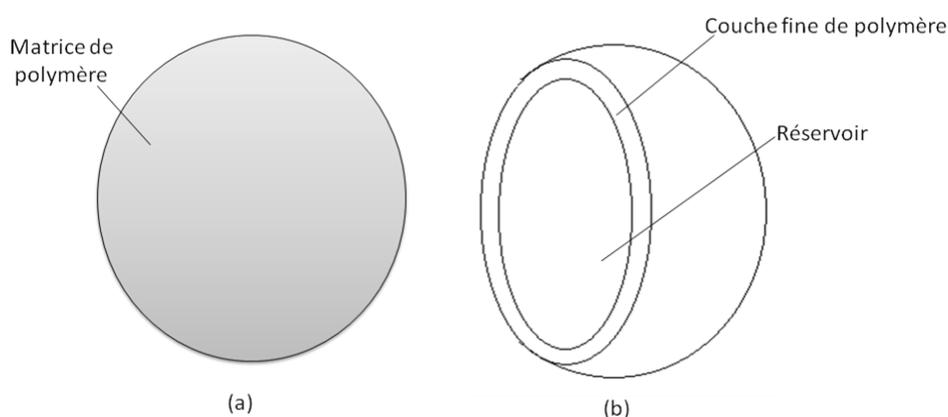


Figure 50 : Nanoparticules sous la forme de nanosphère (a) et de nanocapsule (b)

1-2-3- Les « quantum dots »

Les « quantum dots » sont des nanocristaux semi-conducteurs fluorescents mesurant 2 à 10 nm de diamètre. Leur développement s'inscrit plutôt dans le domaine du diagnostic par imagerie par fluorescence que pour le domaine de la thérapie.

Les sondes actuellement utilisées sont des molécules organiques de type rhodamine, fluorescéine, isothiocyanate, pyrène et anthracène. ^[112] Cependant ces molécules présentent plusieurs inconvénients :

- dégradation rapide sous irradiation ; entraînant une décroissance rapide de l'intensité de fluorescence. Le temps d'observation est relativement court ; on parle de photobleaching ; ^[113]

- spectre d'émission présente des bandes larges qui peuvent interférer avec d'autres bandes d'émission appartenant à des fluorophores (nicotinamide, collagène...) naturellement présents dans les tissus biologiques et responsable de l'autofluorescence des tissus ; ^[114]
- variation de la longueur d'onde d'excitation avec le milieu chimique (pH, interaction avec les ions voisins...).

Pour palier à ces inconvénients, certains scientifiques ont développés des « quantum dots ». Ces vecteurs sont formés de nanocristaux minéraux combinant des éléments des groupes II et VI (CdS, CdSe, CdTe) ou encore des groupes III et V (GaAs, InP). La particularité de ces molécules c'est d'avoir une longueur d'onde d'émission qui varie uniquement en fonction de leur diamètre. Ils présentent ainsi une variété de couleurs d'émission.

Cependant ces « quantum dots » dépourvus de couches protectrices peuvent être dégradés par photo-oxydation. Ils sont le plus souvent recouverts par des couches transparentes de type ZnS, TOPO (trioctylphosphine oxide). On parle dans ce cas de semi-conducteurs fluorescents « cœur-coquille ». Néanmoins ces couches protectrices étant hydrophobes compromettent leur application en milieu biologique. Pour y remédier, ces « quantum dots » sont encapsulés dans des couches de phospholipides ou encore recouverts de silice. ^[115] Ces couches protectrices permettront par la suite d'envisager le greffage d'agents anticancéreux sur leur surface.

Ces vecteurs (quantum dots) révèlent néanmoins des inconvénients. En effet leur luminescence est « aléatoire » du fait qu'elle disparaît et réapparaît ; on parle de phénomène de scintillement. Ceci n'est pas adapté pour des observations de longue durée. D'autre part leur application dans le domaine médical est controversée du fait de la présence d'éléments toxiques (le cadmium par exemple) rentrant dans leur composition. Enfin, les modes d'élimination naturelle de ces composés demeurent jusqu'à preuve du contraire méconnus.

1-2-4- Les nanotubes de carbone

Mentionnés pour la première fois dans la littérature scientifique en 1976, les nanotubes de carbone ont une structure soit mono-paroi, soit multi-parois. ^[116] On a ensuite attribué à ces nano-objets des propriétés mécaniques, thermiques et électriques. C'est en 2002 que certains chercheurs mettent en évidence la présence de « bande gap » de fluorescence dans les nanotubes de carbone mono-paroi. ^[117] Ces nanotubes mono-paroi ont ainsi suscités un intérêt grandissant dans le domaine de l'imagerie. Néanmoins au même titre que les quantum dots, ils sont controversés pour des applications dans le domaine médical et font l'objet d'intense recherche. ^[118]

1-2-5- Les nanoparticules d'or

Depuis l'antiquité l'or a suscité l'intérêt de certains médecins pour ces vertus thérapeutiques. ^[119] L'or était utilisé pour traiter les désordres nerveux et l'épilepsie. ^[120]

De nos jours, avec le développement des nanotechnologies, les nanoparticules d'or suscitent un intérêt grandissant dans le domaine médical. En effet à l'échelle nanométrique l'or change de couleur, il passe d'une couleur de fluorescence bleue au rouge violacée (figure 51). Ce changement de fluorescence, lié au phénomène de résonance plasmonique de surface, constitue un outil de caractérisation prometteur pour l'imagerie médicale. ^[121]



Figure 51 : Propriétés de fluorescence des nanoparticules de tailles comprises entre 2 et 10 nm
(source : <http://www.lefigaro.fr>)

Les nanoparticules d'or sont obtenues par réduction des sels d'or en présence de « capping agents ». ^[122] Pour améliorer leur dispersion, les nanoparticules sont recouvertes d'une couche de silice SiO_2 ou encore de chitosan. ^[123, 124] Ces nanoparticules peuvent être fonctionnalisées par des fonctions thiols, amines qui ont une très grande affinité avec les atomes d'or. Par ailleurs des molécules comme l'acide folique peuvent également être greffées à la surface de nanoparticules d'or. ^[125] Enfin des tests biologiques réalisés récemment montrent que ces nanoparticules sont internalisées par les cellules cancéreuses.

En définitive, l'utilisation de vecteurs en photothérapie présente des multiples intérêts. ^[126] D'une part ils permettent de diminuer les effets secondaires : la liaison du médicament anticancéreux sur le vecteur empêche son activité cytotoxique et permet de diminuer les doses en ciblant le médicament. D'autre part, le ciblage d'une grande quantité d'agents anticancéreux vers des cellules tumorales augmente l'efficacité du traitement et permet d'éviter les phénomènes de biorésistance.

Parmi les vecteurs particuliers une catégorie à particulièrement attiré notre attention ; ce sont les nanoparticules magnétiques. En effet l'association de médicaments anticancéreux (porphyrines dans notre cas) à un vecteur magnétique permettrait de suivre l'évolution de la tumeur au cours du traitement et donc de faire un suivi diagnostique par IRM.

2- Nanoparticules magnétiques : ciblage et thérapie thermique

Les nanoparticules magnétiques les plus couramment rencontrées en médecine sont constituées des cristaux de magnétite (Fe_3O_4) ou de maghémite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). Ces nanoparticules d'oxyde de fer sont appelées SPIO (Superparamagnetic iron oxide particles) lorsque leur taille est comprise entre 50 nm et 500 nm, et USPIO (ultra-small superparamagnetic iron oxide particles) lorsque leur taille est inférieure à 50 nm. Ces nanoparticules sont généralement synthétisées par co-précipitation à partir de sels de fer (chlorures, nitrates ou encore sulfates). Pour prévenir leur agglomération dans le milieu biologique et leur capture par les cellules du système SPM (système de phagocytoses mononuclées), leur surface peut être recouverte de polymères de type PEG ^[127], de dextrane ^[128], chitosan ^[129], PEI (polyéthylèneimine) ^[130], ou encore par des phospholipides. ^[131] Pour assurer un ciblage spécifique vers les cellules tumorales, des ligands (petites molécules comme l'acide folique, peptides, protéines, anticorps) peuvent être également greffés.

L'association de propriétés magnétiques dans des micro- ou nanoparticules présente plusieurs intérêts dans le domaine de la vectorisation. Les propriétés magnétiques de ces matériaux confèrent aux vecteurs une fonctionnalité qui ouvre des perspectives vers des nouvelles applications thérapeutiques originales, comme le ciblage par guidage magnétique et la magnéto-cytolyse induite par hyperthermie, et diagnostics, comme le contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM). Le tableau 3 montre quelques exemples d'applications aussi bien dans le domaine du traitement par hyperthermie, que dans le domaine du diagnostic par IRM.

Tableau 3 : Exemples d'applications pour les nanoparticules d'oxyde de fer

Agents de ciblage	Récepteurs	Application	Références
<u>Petites molécules :</u>			
-Acide folique	Récepteurs folates	Cancer du sein (imagerie)	[132]
-Méthotrexate	Récepteurs folates	Cancer du cerveau (imagerie et thérapie)	[133]
<u>Peptides :</u>			
RGD	A ν β 3 integrin	Cancer du sein (imagerie)	[134]
Chlorotoxin	MMP-2	Cancer du cerveau (imagerie et thérapie)	[135]
<u>Anticorps :</u>			
Herceptin	Her2/neu	Cancer du sein (imagerie et thérapie)	[136]

D'ailleurs, deux types de nanoparticules SPIO sont actuellement commercialisés sous le nom de Feridex® et Resovist®.

2-1- Ciblage magnétique

Le ciblage magnétique de médicament (MDT, magnetic Drug targeting) est une application des vecteurs magnétiques, abondamment étudiée ces dernières années. ^[137,138] Cette voie thérapeutique a déjà fait ces preuves chez la souris et chez l'homme. Elle consiste à injecter des vecteurs magnétiques (ferro- ou ferrimagnétiques) d'agents anticancéreux à proximité de la tumeur et à les y maintenir de façon concentrée, au moyen d'un champ magnétique extérieur généré à partir d'un aimant dur (de haute coercitivité et de forte aimantation rémanente) (figure 52). ^[139] La force du champ magnétique est variable (de 0,2 à 0,8 Tesla) en fonction de la taille de la tumeur.

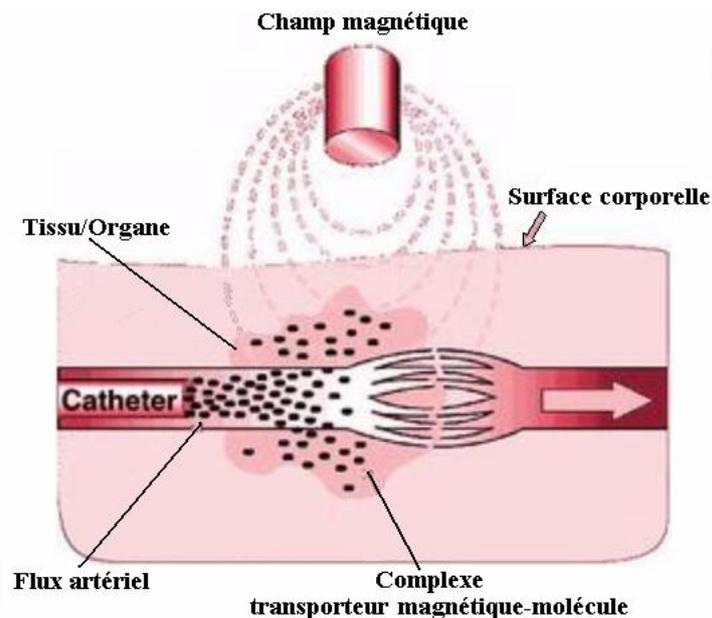


Figure 52 : Représentation d'un cathéter placé sur un vaisseau irriguant le site et soumis à un champ magnétique ^[139]

2-2- Thérapie thermique

Les nanoparticules magnétiques présentent un fort potentiel pour le traitement des tumeurs par hyperthermie ; leur efficacité dépend de leur taille et la nature du matériau.

L'hyperthermie est une voie thérapeutique utilisée pour détruire les tumeurs par élévation de la température locale. Cette méthode consiste à chauffer les tissus tumoraux au-delà de 43 °C (généralement 47 °C) pour les détruire par nécrose. En effet les cellules cancéreuses sont très sensibles à une variation de température ; un échauffement modéré ($T = 43- 45 \text{ °C}$) induit une nécrose. ^[140] Plusieurs sources énergétiques sont utilisées telles que les ultrasons focalisés, les micro-ondes ou l'infrarouge..., dans le cas de traitements superficiels comme les mélanomes.

Cependant, dans le cas de l'hyperthermie induite par les fluides magnétiques, appelée aussi magnéto-cytolyse, la source énergétique se situe dans le domaine des radiofréquences (1-10 MHz). Cette technique s'appuie sur le fait que la relaxation des aimantations des particules ferro- ou ferrimagnétiques provoque une dissipation de l'énergie en chaleur par effet Joule. Cette dissipation est d'autant plus élevée que le régime de pulsation est à la fréquence de résonance ferromagnétique. ^[141]

Ainsi il est important d'avoir une idée générale sur le magnétisme dans des objets de taille nanométrique.

2-3- Magnétisme des nanoparticules

Une aimantation apparaît lorsque les moments magnétiques portés par les atomes (fer, nickel, cobalt) sont couplés entre eux parallèlement. La configuration de ces moments résulte de la compétition entre trois énergies :

- l'échange entre les moments magnétiques atomiques ;
- l'anisotropie qui tend à aligner les moments suivant une direction définie relative au réseau cristallin ;
- l'interaction dipolaire qui tend à fermer le flux et donc à faire tourner les moments.

De ce fait, pour les objets macroscopiques, on observe une configuration en domaines dans lesquels les moments sont alignés (figure 53). Par contre plus la taille diminue, plus il est coûteux d'avoir de tels domaines. En dessous d'une certaine taille critique ($d < 28 \text{ nm}$ pour le fer), tous les moments s'alignent ; on parle de configuration mono-domaine. Dans cette configuration, nous pouvons assimiler l'aimantation de la particule à un moment géant (macrospin).

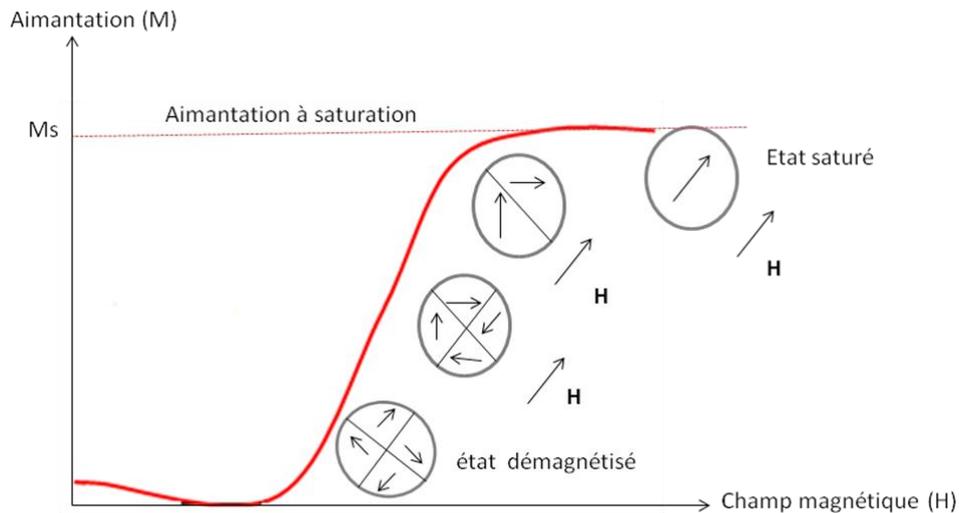


Figure 53 : Représentation de la courbe de première aimantation d'un composé : effet du champ appliqué sur les domaines magnétiques

Dans le cas d'une anisotropie uniaxiale (structure cristalline), le moment possède deux configurations stables : parallèle et antiparallèle à la direction de l'anisotropie (appelée axe de facile aimantation). Les configurations parallèle et antiparallèle sont séparés par une barrière énergétique KV (K : anisotropie magnétique et V : le volume de la particule). Le moment magnétique oscille donc spontanément entre ces deux configurations avec un temps caractéristique τ_N (temps de relaxation de Néel), donné par l'expression :

$$\tau_N = \tau_0 \text{Exp} (KV/K_B T)$$

Où τ_0 représente le temps de relaxation critique ($\sim 10^{-9}$ s),

K_B la constante de Boltzman et

T la température

Si ce temps τ_N est grand par rapport au temps de mesure, le moment a peu de probabilité de se retourner : On parle de moment « bloqué » et de ferromagnétisme (figure 54). Par contre si ce temps (τ_N) est court, le moment de la particule oscillera au cours de la mesure : c'est le superparamagnétisme.

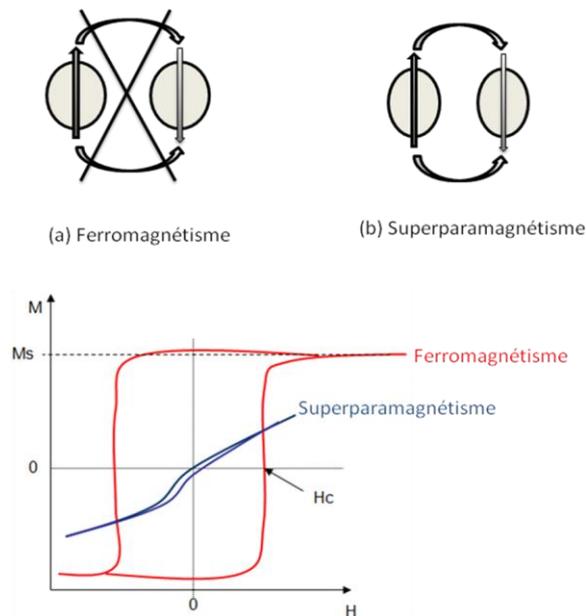


Figure 54 : Comportement ferromagnétique (a) et superparamagnétique (b)

En ce qui concerne l'hyperthermie, la distinction entre ces deux états est importante. En effet l'efficacité des particules en hyperthermie est quantifiée par un paramètre ; la PAS (la puissance absorbée spécifique) qui est directement reliée à l'aire (A) du cycle d'hystérésis :

$$PAS = A \times f$$

Où f représente la fréquence du champ magnétique (H)

Ainsi là où une particule superparamagnétique aura une hystérésis faible, une particule ferromagnétique présentera elle une aire d'hystérésis plus large, donc plus avantageuse pour une application en hyperthermie. Pour augmenter l'hystérésis, il faut que le matériau possède un fort moment (aimantation) et que la taille des particules soit suffisamment grosse (pour le fer la taille est comprise entre 13-15nm). Leurs moments doivent néanmoins pouvoir osciller sous l'effet du champ faible utilisé en hyperthermie (10 mT).

Les premiers essais cliniques ont montré une augmentation de la température interne de 4,7°C au niveau des cellules. ^[142] Depuis, les progrès réalisés dans la conception des sources magnétiques et des vecteurs ont permis d'atteindre des élévations de température de plus de 9°C. Les particules utilisées, généralement à base de ferrites, sont le plus souvent des liposomes magnétiques ^[143,144] ou des nanoparticules de magnétite stabilisées par du dextrane. ^[145] Cependant cette méthode n'est efficace que si les particules magnétiques sont concentrées en nombre suffisant et réparties de façon homogène dans la tumeur. ^[146] Par ailleurs, la température et la durée de chauffage sont des facteurs à contrôler de manière à ne pas détruire les cellules saines avoisinantes.

Les nanoparticules magnétiques (NPM) sont plus utilisées dans le traitement par hyperthermie pour des tumeurs difficilement opérables ou faiblement vascularisées.^[147]

2-4- Agent de contraste

Les agents de contraste magnétiques ont la faculté d'induire un contraste en IRM ; ce qui permet de révéler des pathologies dans les tissus ou les organes avec une très bonne résolution.

L'imagerie par résonance (IRM) est une technique d'imagerie médicale de diagnostic clinique. Les images obtenues par IRM sont utilisées par les neurochirurgiens en préopératoire pour définir la trajectoire de leurs sondes chirurgicales. Les neurologues et radiologues les utilisent, pour leur part, pour diagnostiquer et suivre l'évolution des troubles dégénératifs comme la sclérose en plaques. Le développement de l'IRM est lié à l'apparition de matériaux à faible résistivité pour la conception d'aimants supraconducteurs et également l'apparition des outils informatiques pour le stockage et le traitement des données.

Les premiers essais en imagerie datent de 1973. Lauterbur, Mansfield et Damadian^[148,149] ont démontré la faisabilité de cette technique en utilisant les principes de la résonance magnétique nucléaire (RMN) pour concevoir les premiers imageurs, et réaliser les premières images d'un doigt en 1973 et d'un thorax en 1976. Depuis l'IRM est devenue une technique diagnostique de prédilection car elle a la capacité de distinguer les différences d'intensité entre les tissus mous normaux et pathologiques.

2-4-1- Principe des agents de contraste

Le principe des agents de contraste consiste à modifier localement les paramètres intrinsèques des tissus. Contrairement aux produits de contraste iodés utilisés en tomodensitométrie (imagerie par absorption des rayons X), ce n'est pas le produit de contraste lui-même que l'on observe, mais ses effets sur l'aimantation des noyaux d'hydrogène qui se trouvent dans les tissus. Une première génération de produits de contraste, appelés agents de densité de spin, a permis de conférer une meilleure définition de l'image.^[150] Ces agents lipidiques agissent en modifiant localement la densité de noyaux d'hydrogène ce qui a pour effet de rehausser le signal. Ensuite, une deuxième génération d'agents de contraste se sont développés. Leur mode d'action consiste à modifier les temps de relaxation des noyaux d'hydrogène.

Ces produits de contraste dits de « deuxième génération » diminuent les temps de relaxation T_1 et/ou T_2 . On définit ainsi une vitesse de relaxation (exprimée en $\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1}$) :

$$1/T_{1,2} = R_{1,2}$$

Les vitesses de relaxation ($1/T_1$ et $1/T_2$) observées résultent de l'addition des vitesses intrinsèques tissulaires et de la contribution de l'augmentation des vitesses sous l'effet des agents de contraste obtenue par l'expression suivante :

$$1/T_{\text{observé}} = 1/T_{\text{intrinsèque}} + 1/T_{\text{agent de contraste}}$$

L'efficacité des produits sur le temps de relaxation est d'autant plus forte que la concentration est élevée. Cette relation permet de déterminer les vitesses de relaxation en fonction de la concentration en produit de contraste (figure 55).

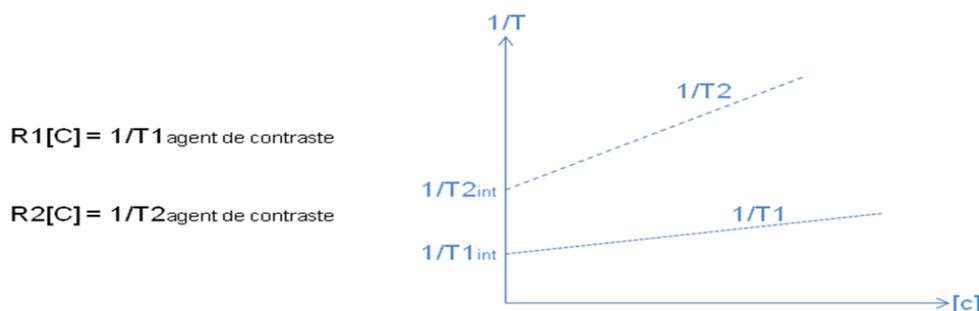


Figure 55 : Principe de détermination graphique des vitesses de relaxation $R1$ et $R2$

2-4-2- Les agents de contraste utilisés en IRM

Les agents de contraste utilisés en IRM sont généralement de deux catégories en fonction de leurs vitesses de relaxation : les agents paramagnétiques et superparamagnétiques.

Les agents paramagnétiques ont une vitesse de relaxation $R1$ et $R2$ du même ordre de grandeur (tableau 4). Néanmoins ils présentent un effet $T1$ prépondérant, car les $T1$ des tissus sont beaucoup plus élevés que les $T2$ (de l'ordre de 10 fois). Les agents paramagnétiques diminuent le $T1$ des tissus ce qui revient à augmenter l'intensité du signal (hypersignal) ; d'où leur nom de contraste positif. Cependant les agents superparamagnétiques possèdent quant à eux une vitesse de relaxation $R2$

élevée et prépondérante par rapport à R1 (tableau 4). La diminution du T2 (ou l'augmentation du R2) conduit à l'effondrement du signal (hyposignal). Ces agents de contraste, dont l'effet est prépondérant en T2, sont appelés agents de contraste négatifs.

Tableau 4 : vitesse de relaxation des composés paramagnétiques et superparamagnétiques

Agent de contraste	R1 (mM.s) ⁻¹	R2 (mM.s) ⁻¹	R2/R1
Paramagnétique : Gd-DTA	4,5	5,9	1,3
Superparamagnétique : AMI-25	23,9	98,3	4,1

2-4-2-1- Les agents de contraste paramagnétiques

Les électrons, tout comme les noyaux, possèdent aussi un moment magnétique appelé spin électronique. Le déplacement du nuage électronique autour des noyaux génère un moment magnétique dipolaire permanent qui peut être nul si la couche externe de l'atome sont appariés (diamagnétiques) ou non nul si la couche électronique externe possède des électrons non-appariés (paramagnétiques).

Les matériaux diamagnétiques, qui composent la majorité des composés organiques ou inorganiques, soumis à un champ magnétique extérieur, possèdent une susceptibilité magnétique négative très faible. La majorité des molécules ou ions constituant la matière biologiques, notamment l'eau, est diamagnétique et leurs effets en IRM sont négligeables.

Les matériaux paramagnétiques comme les molécules de dioxygène, les radicaux libres comme les nitroxydes ou certains ions métalliques (Fe³⁺, Mg²⁺, Co²⁺, Mn²⁺, Cu²⁺, Gd³⁺...) présentent une susceptibilité positive lorsqu'ils sont mis en présence d'un champ magnétique extérieur. En absence de ce champ, les moments dipolaires élémentaires prennent toutes les directions possibles et le moment résultant est nul. Sous l'effet d'un champ magnétique extérieur, ces moments magnétiques s'orientent dans sa direction pour former une aimantation résultante directement proportionnelle à ce champ.

Les premiers agents de contraste paramagnétiques testés en IRM étaient des sels métalliques (sels de Fe³⁺, Cu²⁺, La³⁺, Ce³⁺, Gd³⁺). Ces sels présentent à l'état libre une toxicité trop importante pour une utilisation chez l'homme. ^[151] En effet, au pH physiologique ils se condensent pour former des hydroxydes insolubles, qui ne sont pas biodégradés. Cependant, ils sont utilisés sous formes chélatés, limitant ainsi leur toxicité (figure 56).

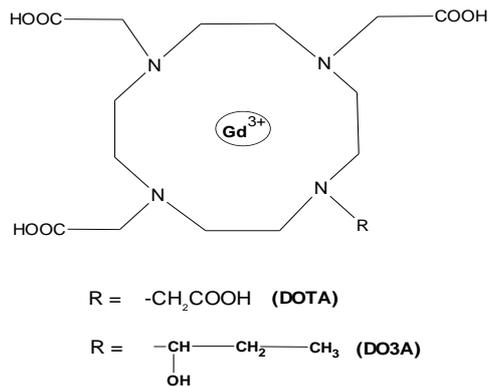


Figure 56 : Structure deux complexes du gadolinium

Actuellement les agents commercialisés sont constitués d'ions gadolinium Gd^{3+} . Cet agent de contraste possède le plus grand nombre d'électrons non-appariés, ce qui lui confère un moment magnétique plus élevé et donc une grande efficacité sur le signal.

2-4-2-2- Les agents de contraste superparamagnétiques

Les composés ferromagnétiques ont une aimantation résultante non nulle qui découle du fait que les spins sont parallèles et se compensent. Cependant, lorsque les particules ferromagnétiques utilisés sont de taille colloïdale, typiquement de 3 à 20 nm, les grains magnétiques deviennent monodomaines et portent chacun un moment magnétique résultant (paragraphe 2-3-). Ainsi les nanoparticules acquièrent un comportement superparamagnétique.

Au niveau clinique, les agents de contraste superparamagnétiques les plus couramment utilisés en IRM sont constitués de monocristaux d'oxyde de fer ($\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-}\gamma$, Fe_3O_4) de taille moyenne allant de 5 à 20 nm et recouverts par des macromolécules biocompatibles de natures diverses (dextrane, albumine ^[152], amidon, chitosan, héparine. ^[153] Le dextrane est de loin le polymère le plus employé dans la conception de ces produits. En effet il permet de prolonger la demi-vie plasmatique des nanoparticules in vivo par rapport à d'autres polysaccharides comme le mannose ou le galactose. ^[154]

Ces nanoparticules présentent des tailles variables qui conditionnent leur bio distribution. On distingue deux catégories d'agents de contraste superparamagnétiques formés à partir d'oxyde de fer et de dextrane (tableau 5) :

- les SPIO (Superparamagnetic Particle Iron Oxide) de taille comprise entre 30 et 100 nm. Parmi elles, on peut citer le Ferdex I.V ou Endorem qui sont les premiers à être commercialisés. ^[155] D'autres systèmes ont également été testés in vivo sur des rats comme les DM (dextran-magnétite, de taille 100 nm) ^[156] ou les MD (magnétite-dextran, 50 nm). ^[157] Ces

molécules ont montrés une spécificité hépatique. Du fait de leur taille relativement élevée, ces produits subissent une capture par le système des phagocytes mononucléés (SPM) au niveau du foie, de la rate et de la moelle osseuse ;

- les USPIO (Ultrasmall SPIO) et les MION (Monocrystalline Iron Oxide Nanocompound) de taille comprise entre 10 et 20 nm sont actuellement les systèmes magnétite-dextran les plus utilisés en IRM. ^[158] Ils ont une demi-vie plasmique plus importante. En effet ces particules, plus petites, migrent à travers l'interstitium et diffusent vers les ganglions lymphatiques.

^[159]

Tableau 5 : Caractéristique de marqueurs superparamagnétiques (milieux aqueux : 0,47 T/ 37 °C)

Composés	taille moyenne des particules (nm)	R2/R1
SPIO (AMI-25)	50-100	160/40
SPIO (SHU-555)	30-50	190/24
USPIO (AMI-227)	17-20	53/24
MION-46	18-24	35/16

III- Bilan de l'étude bibliographique

Sur la base de l'étude bibliographique menée précédemment, et prenant en compte les contraintes de biocompatibilité/biodisponibilité, nous pouvons appréhender les caractéristiques souhaitables pour un bon photosensibilisateur destiné à la thérapie et/ou au diagnostic en thérapie anticancéreuse :

- le photosensibilisateur doit tout d'abord être de structure chimique parfaitement définie ;
- il doit être non cytotoxique à l'obscurité ;
- posséder des propriétés photophysiques compatibles avec un bon rendement de formation en oxygène singulet (Φ_{Δ}). Il ne doit pas s'agréger dans le milieu cellulaire, de surcroît être parfaitement hydrosoluble ;
- se concentrer préférentiellement dans les cellules tumorales et de façon importante. Le photosensibilisateur doit ainsi être associé à un vecteur idéal.

Un vecteur idéal présente les caractéristiques suivantes :

- il doit être composé de matériaux biocompatibles et biodégradables ; dont les métabolites issus de leur dégradation doivent pouvoir être pris en charge par le corps hôte ;
- avoir une taille nanométrique, typiquement inférieure ou égale à 100 nm, et une bonne stabilité physico-chimique afin de faciliter sa circulation dans les capillaires sanguins les plus fins évitant ainsi les embolies ;
- ces vecteurs particuliers doivent être stabilisés par des macromolécules hydrophiles comme le dextrane pour faciliter le passage des barrières biologiques (épithélium/ endothélium et la membrane plasmique) et limiter alors la reconnaissance par les macrophages (foie/rate) ;
- le vecteur ne doit pas être inerte c'est-à-dire posséder des propriétés intrinsèques comme le superparamagnétique afin d'engendrer un contraste en IRM et d'envisager une possible application en thérapie.

IV- Objectifs du travail

Au vu de ces différents points décrits précédemment et dans le prolongement des travaux effectués au sein de notre laboratoire sur la conception des nouveaux photosensibilisateurs applicables en PDT anticancéreuse, nous avons développé la synthèse de nanoparticules superparamagnétiques substitués par des motifs porphyriniques. De tels composés ainsi conçus devraient permettre de développer des plateformes médicamenteuses à double application.

La première application s'inscrit dans un contexte d'approche thérapeutique avec une double efficacité létale en combinant l'effet photocytotoxique de la drogue (porphyrines) avec les propriétés magnétiques du transporteur pouvant conduire à un traitement thermique des cancers (thermothérapie).

La deuxième application se situe dans le cadre d'une approche diagnostique qui utilise également deux procédés l'IRM (agents de contraste superparamagnétiques) et la fluorescence des porphyrines.

Avec cet objectif, nous avons élaboré trois types de porphyrines hydrosolubles (neutre, anionique et cationique) pour éviter les phénomènes d'agrégation observés en milieu physiologique. Ces derniers ont été par la suite greffés sur des nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées en milieu aqueux avec du dextrane modifié (réticulé avec l'épichlorhydrine puis azoturé).

Afin d'avoir un greffage durable et permanent en milieu physiologique, notre choix s'est porté sur un greffage chimique au moyen de la réaction de « Click Chemistry » (figure 57).

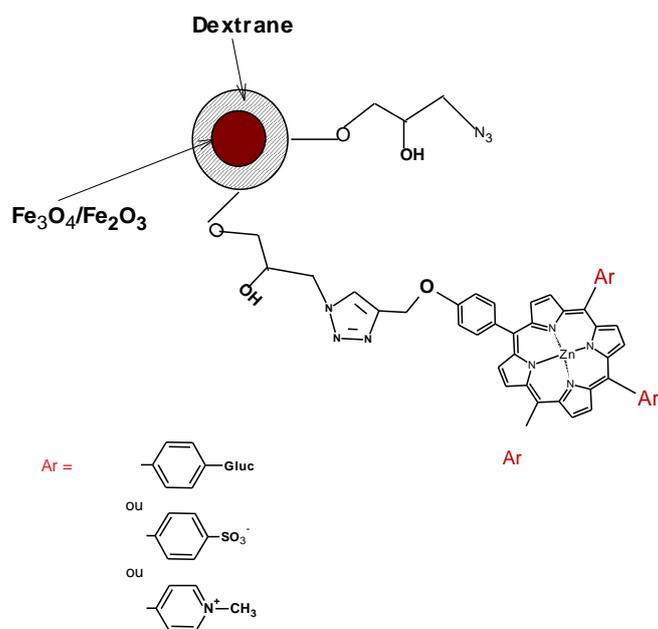


Figure 57 : Nanoparticules d'oxydes de fer recouvertes de dextran et substituées par des porphyrines

Compte tenu du rôle important des polyamines dans l'internalisation des molécules au niveau cellulaire, nous avons fixées dans un second temps une polyamine (la polyéthylèneimine) (figure 58).

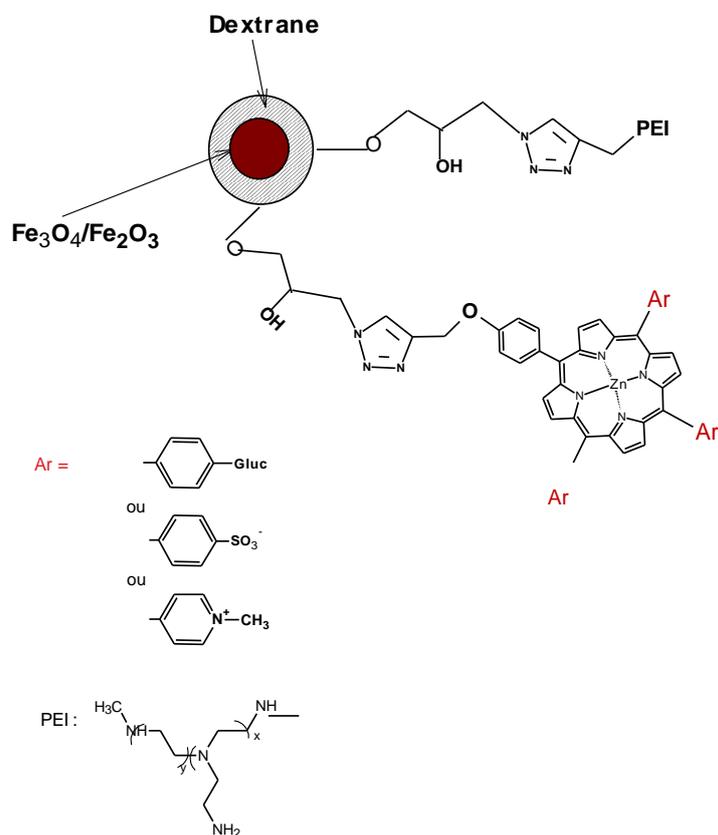


Figure 58 : Nanoparticules d'oxydes de fer recouvertes de dextran substituées par des porphyrines et la polyéthylèneimine

Enfin des tests biologiques *in vitro* ont été réalisés afin d'évaluer l'activité anticancéreuse de ces nouveaux photosensibilisateurs à double efficacité létale, à l'égard de la lignée cellulaire de kératinocytes humains (cellules Hacat).

Chapitre II Nanoparticules d'oxyde de fer
substituées par des porphyrines
Hydrosolubles

1- Introduction

Comme nous l'avons indiqué à la fin du chapitre précédent, la stratégie de la fixation des photosensibilisateurs sur les nanoparticules d'oxyde de fer a consisté à attacher le macrocycle porphyrinique sur le vecteur par l'intermédiaire d'un hétérocycle de type 1, 2, 3-triazole. Ce noyau triazole crée une liaison directe entre le vecteur et le photosensibilisateur qui est très stable en milieu biologique. Le schéma général de synthèse est présenté sur la figure 59.

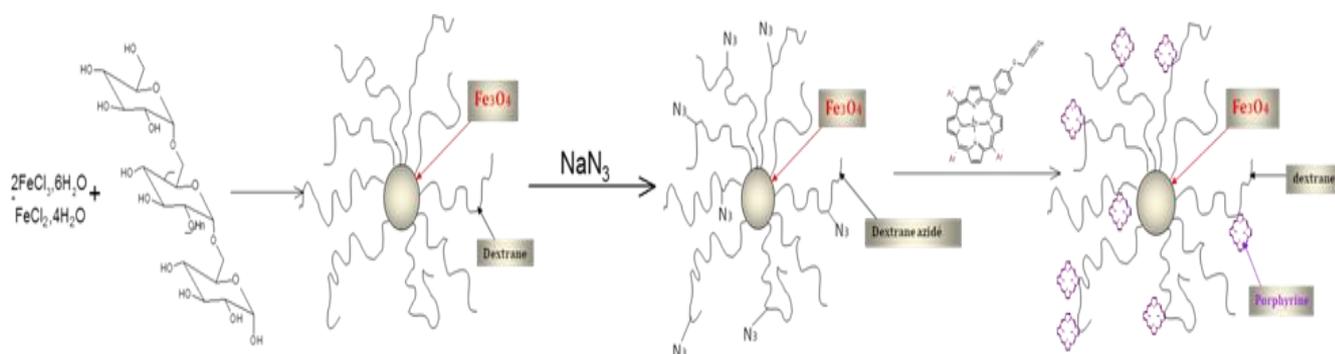


Figure 59 : Schéma général de l'élaboration des nanoparticules d'oxyde de fer porphyriniques

2- Stratégie de synthèse

En raison de la très forte réactivité entre la fonction azoture et alcyne en milieu aqueux (solvant polaire) et du fait que les porphyrines constituent la partie active de nos molécules, nous nous sommes attachés à synthétiser tout d'abord des porphyrines hydrosolubles (neutres, anioniques et cationiques) possédant un groupement propargyle. Trois types de *méso* arylporphyrines neutre **6**, anionique **10** et cationique **14** ont ainsi été synthétisés (figure 60). Leur synthèse est réalisée selon la méthode dite « des aldéhydes mixtes ». Nous avons ainsi condensé du pyrrole avec différents benzaldéhydes selon la porphyrine souhaitée. Après une propargylation, ces photosensibilisateurs sont rendus hydrosolubles respectivement par désacétylation des unités acétyl-glucoses (porphyrines neutres), par sulfonation des noyaux phényles (porphyrines anioniques) et par méthylation des noyaux pyridines (porphyrines cationiques). Afin d'éviter une éventuelle métallation des *méso*-arylporphyrines par le cuivre au cours de la réaction de « Click Chemistry », nous avons préalablement chélaté le zinc par tous les précurseurs porphyriniques (figure 60) et qui se décomplexe

facilement. ^[160] En effet, l'incorporation du cuivre dans la porphyrine l'empêche de produire de l'oxygène singulet.

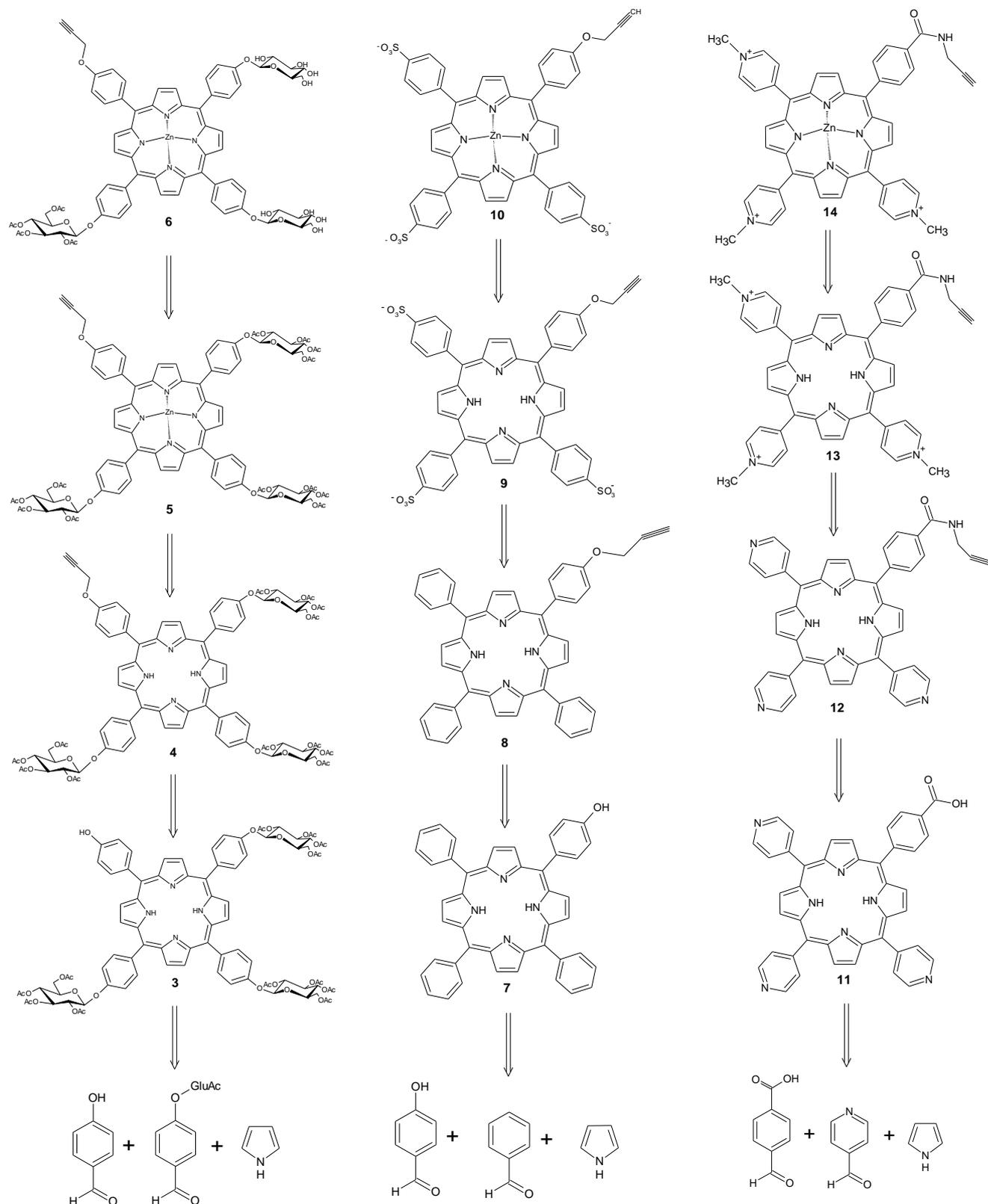


Figure 60 : Schéma rétrosynthétique des précurseurs porphyriniques hydrosolubles

Dans un second temps, nous avons réalisé la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer possédant des fonctions azotures en surface **17**. Ces derniers résultent de l'ouverture de l'époxyde, fixé sur les nanoparticules, par de l'azoture de sodium (NaN_3). Enfin, les nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques **18**, **19** et **20** ont été obtenues par le couplage des précurseurs acétyléniques **6**, **10** et **14** (porphyrines hydrosolubles) avec les nanoparticules d'oxyde de fer azoturées en utilisant la réaction de « Click Chemistry » (figure 61).

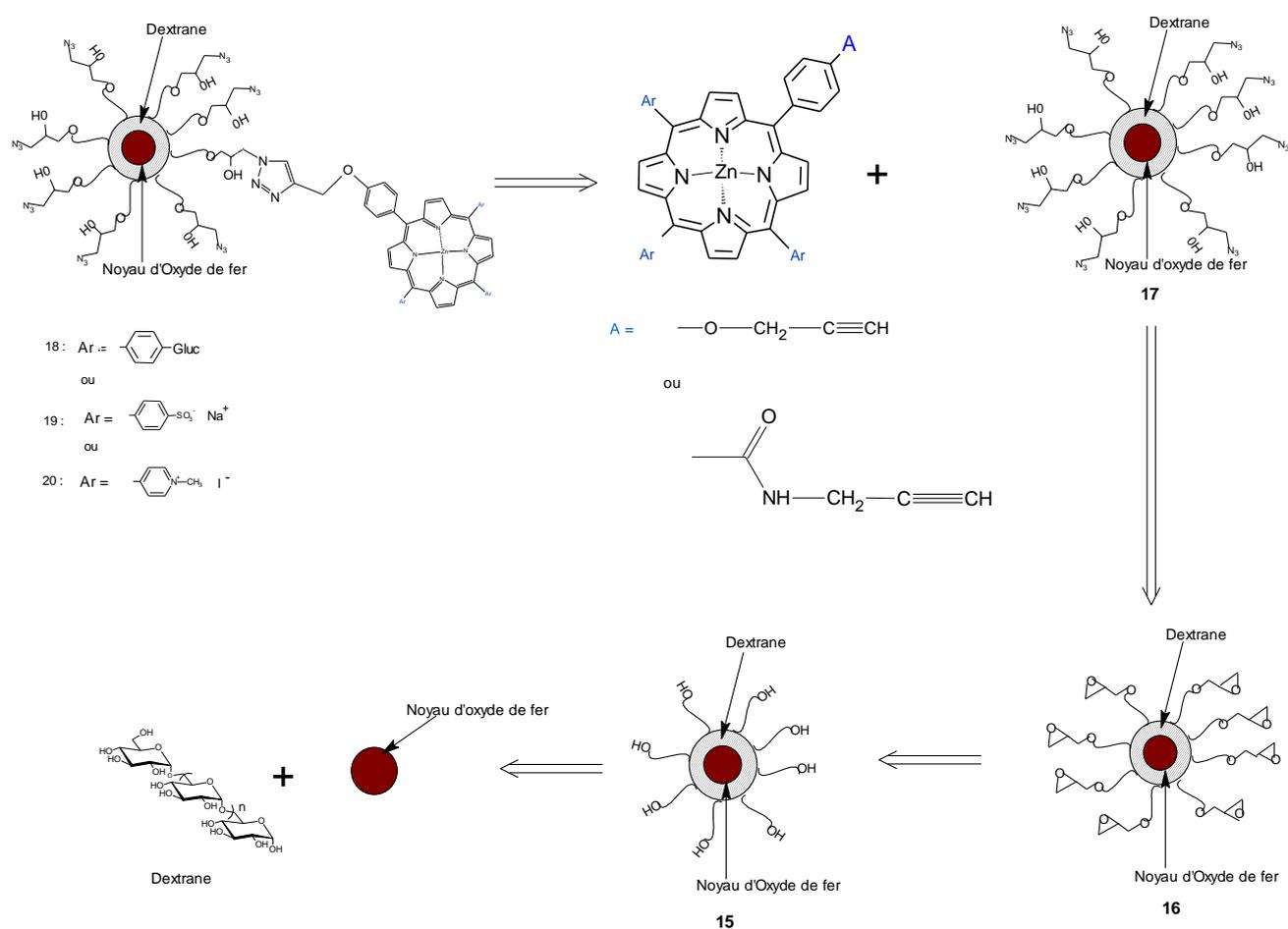


Figure 61 : Schéma de rétrosynthétique des nanoparticules d'oxyde de fer porphyriniques

3- Synthèse des photosensibilisateurs hydrosolubles propargylés

3-1- Synthèse de la porphyrine hydrosoluble propargylée neutre

La synthèse de la porphyrine triglucosylée **6** débute tout d'abord par la formation d'un précurseur aldéhydique glucosylé, le 4-(2', 3',4' ,6' - tétra - O - acétyl - β - D - glucopyranosyloxy)- benzaldéhyde.

3-1-1- Synthèse du benzaldéhyde glucoacétylé

Le benzaldéhyde glucoacétylé a été synthétisé suivant le protocole décrit par Toshima et Coll. ^[161] adapté de la méthode de Koenigs-Knorr ^[162] (figure 62). Bien que le rendement de 40 % soit moyen, la simplicité de la purification reste très intéressante. Pour cela, il faut lors d'une première étape substituer le carbone anomérique du glucose *peracétylé* par le brome. Le 1-bromo-2, 3, 4, 6 - tétra - O - acétyl- α -D- glycopyranose **1** est ainsi obtenue avec un rendement de 76 %. ^[163]

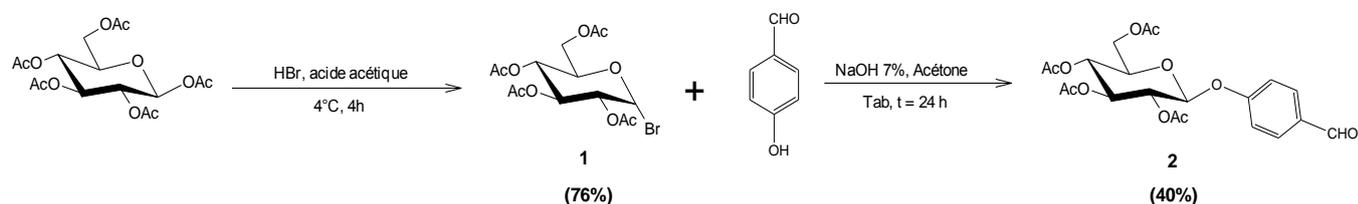


Figure 62 : Synthèse du précurseur aldéhyde glucosylé **2**

La réaction de glucosylation est ensuite réalisée avec un équivalent de 1-bromo-2, 3, 6 - tétra - O - acétyl- α -D-glycopyranose, deux équivalents de *para*-hydroxybenzaldéhyde, à température ambiante dans l'acétone en présence de soude. Après purification par recristallisation, le produit est obtenu avec un rendement de 40 %. Ce rendement certes moyen s'explique par la compétition entre la réaction de substitution et la saponification des fonctions acétyles (désacétylation), il est conforme à la littérature. ^[164] Le spectre RMN du proton et la spectrométrie de masse permet de confirmer la structure du produit attendu.

3-1-2- Synthèse de la mono *para*-hydroxyphényl triglucosylporphyrine

Nous avons utilisé la méthode classique des « aldéhydes mixtes » décrite au chapitre précédent.

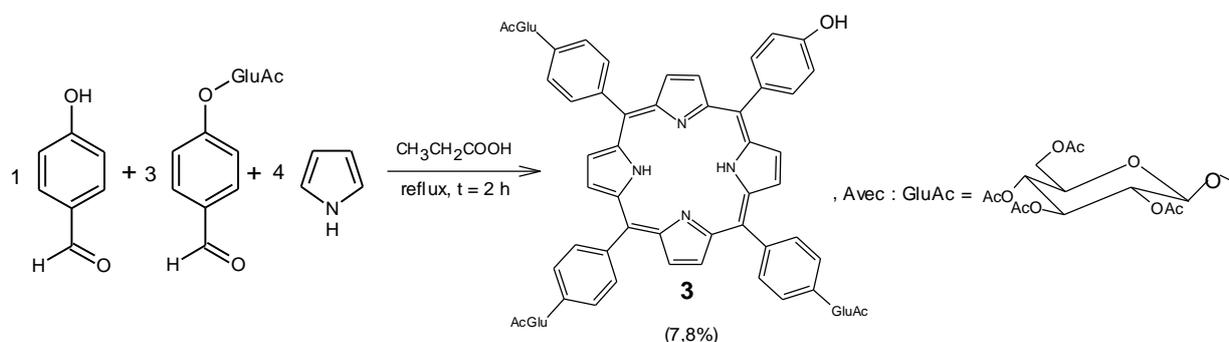


Figure 63 : Synthèse de la mono-hydroxylphényl triglucosylporphyrine **3**

Le composé **3** est obtenu par condensation du pyrrole fraîchement distillé sur un mélange d'aldéhyde glucosylé et de 4-hydroxybenzaldéhyde, en proportion stœchiométriques, dans l'acide propionique à reflux qui joue le rôle de solvant et de catalyseur. Après évaporation du solvant, le brut réactionnel est dans un premier temps partiellement purifié par chromatographie sur colonne de silice, mais la présence de nombreux goudrons issus de la polymérisation du pyrrole rend la purification particulièrement délicate. Une chromatographie sur plaques de gel de silice est donc nécessaire, le composé hydroxylé **3** est isolé avec un rendement de 7,8 %. Ce rendement, certes modeste, reste néanmoins conforme à celui attendu pour ce type de réaction et résulte de la polymérisation concomitante du pyrrole et de la formation d'autres porphyrines comme la di, tri et tétra hydroxylées.

3-1-3- Synthèse de la mono-(4-propargyloxyphényl)triglucosylporphyrine

Le composé **4** (figure 64) est obtenu par une réaction classique de Williamson sur la porphyrine **3**.

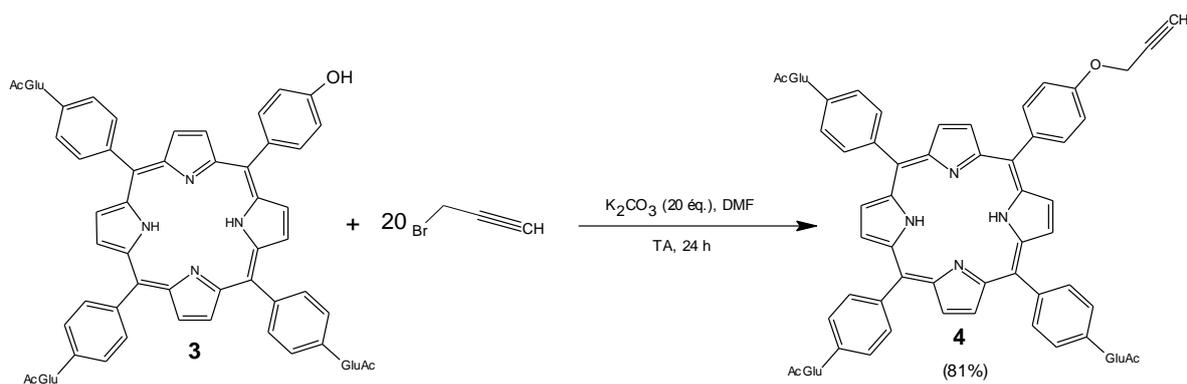


Figure 64 : Propargylation de la porphyrine triglucosylée **3**

La porphyrine **3** est mise à réagir en présence du bromure de propargyle dans le diméthylformamide anhydre avec un large excès de carbonate de potassium. La réaction est suivie par CCM. Après 24 heures de réaction, la porphyrine glucosylée propargylée **4** purifiée sur plaques de gel de silice est obtenue avec un rendement de 81%.

3-1-4- Métallation au zinc de la porphyrine triglucosylée et propargylée

Afin d'éviter la métallation par le cuivre lors de la réaction de « Click Chemistry », nous nous sommes attachés à métaller le composé **4** par le zinc (figure 65) qui est un métal facile à décomplexer. La réaction a lieu en présence d'acétate de zinc dans le THF et à reflux. Le composé **5**, après purification sur plaque de gel de silice, est obtenu avec un rendement de 95%. Le spectre UV-Visible confirme sans équivoque la métallation de la porphyrine.

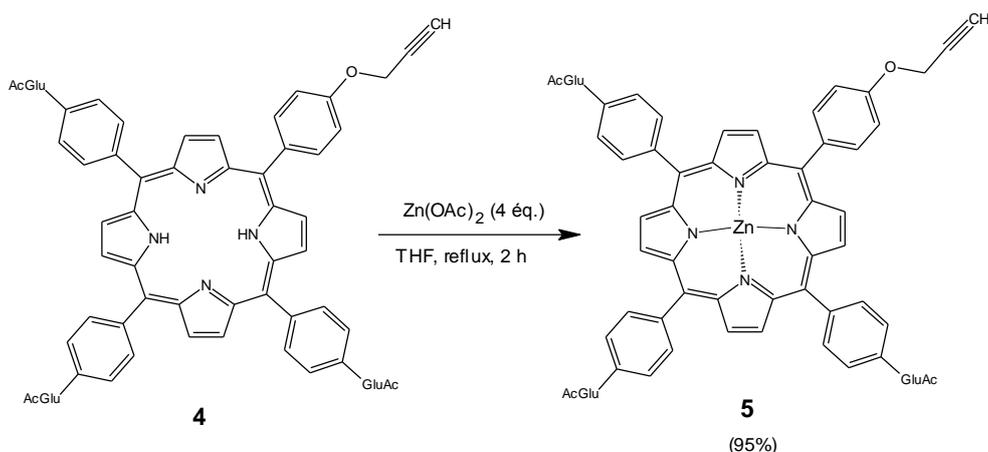


Figure 65 : Métallation de la porphyrine triglucosylée **4**

3-1-5- Synthèse de la porphyrine hydrosoluble neutre

La porphyrine triglucosylée **6** est obtenue par déprotection des groupements acétyle des unités osidiques en présence d'une solution méthanolique de méthylate de sodium (figure 66).

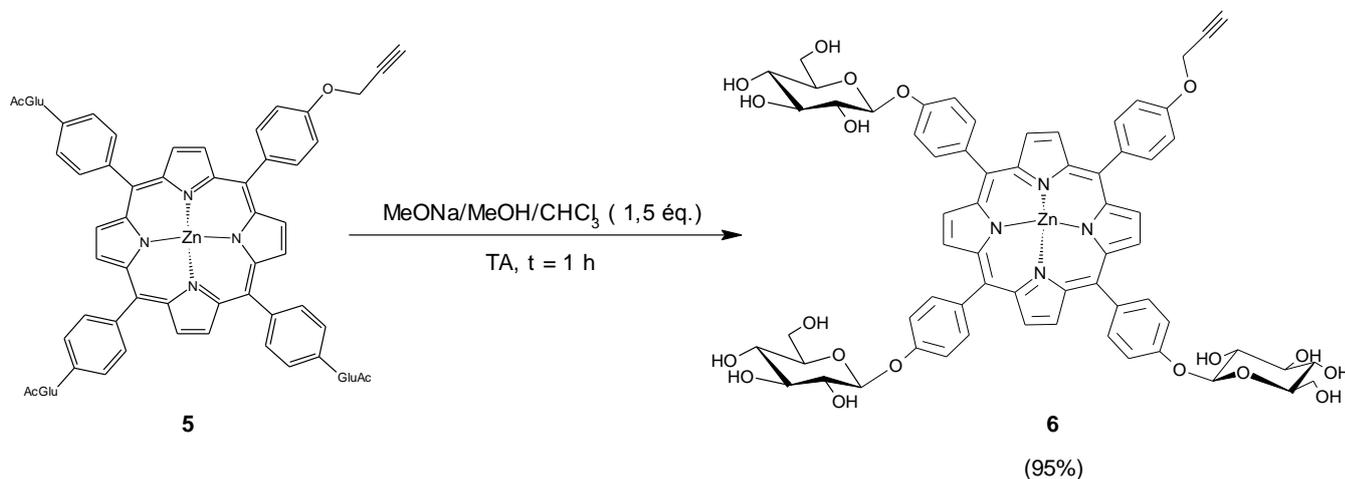


Figure 66 : Désacétylation de la porphyrine **5**

La réaction, compte tenu de la faible solubilité du composé acétylé **5** dans le méthanol est réalisée dans le solvant mixte $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ en présence de méthylate de sodium (1,5 éq. / groupement acétylé). La réaction suivie par CCM ne donne lieu à aucune dégradation. Après précipitation dans le CHCl_3 puis une dialyse (seuil de coupure est de 1000 Da), le composé **6** est obtenu avec un rendement de 95%.

3-2- Synthèse de la porphyrine hydrosoluble propargylée anionique

3-2-1 Synthèse de la mono-hydroxyl triphénylporphyrine (TPP-OH)

Nous avons utilisé la méthode des « aldéhydes mixtes » décrites par Little présenté au paragraphe précédent (figure 67).

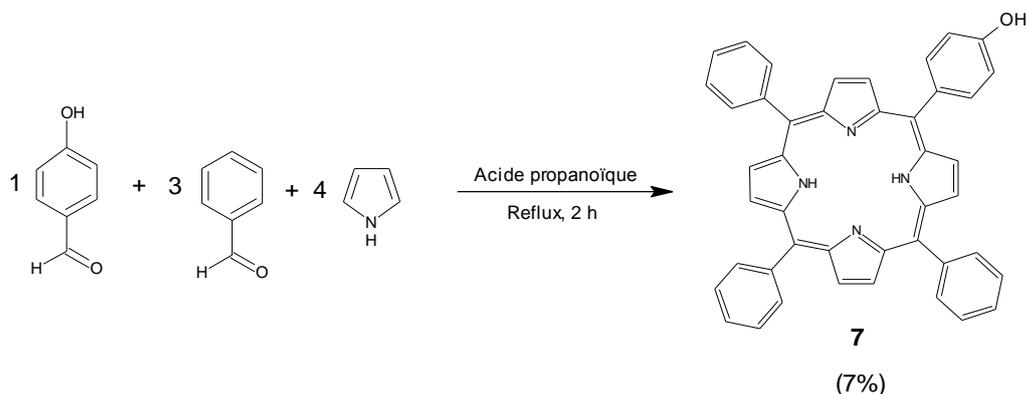


Figure 67 : Synthèse de la TPP-OH **7**

Le produit attendu est obtenu par condensation du pyrrole fraîchement distillé et du benzaldéhyde sur le 4-hydroxybenzaldéhyde, en proportions stochiométrique dans l'acide propionique à reflux qui joue le rôle de solvant et de catalyseur. Le composé monohydroxylé **7** est isolé avec un rendement de 7 %. Ce rendement est de même ordre de grandeur que celui observé pour le composé **3**.

3-2-2 Synthèse de la mono-(4-propargyloxyphényl) triphénylporphyrine

Comme précédemment la réaction Williamson (bromure de propargyle en milieu K_2CO_3 en large excès dans le DMF anhydre) sur la porphyrine hydroxylée **7** a permis d'obtenir en 24 heures la porphyrine propargylée **8** avec un rendement de 86 %.

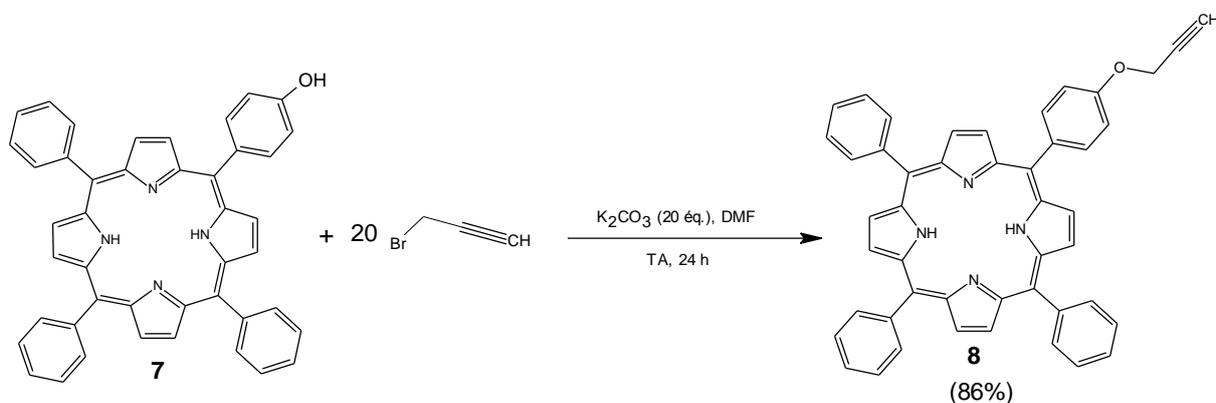


Figure 68 : Fixation d'un alcyne vrai par la méthode de Williamson.

3-2-3 Synthèse de la porphyrine hydrosoluble anionique

La porphyrine anionique **9** est obtenue par sulfonation en présence d'acide sulfurique, des groupements phényles de la porphyrine propargylée **8** au moyen d'une réaction de substitution électrophile aromatique (figure 69).

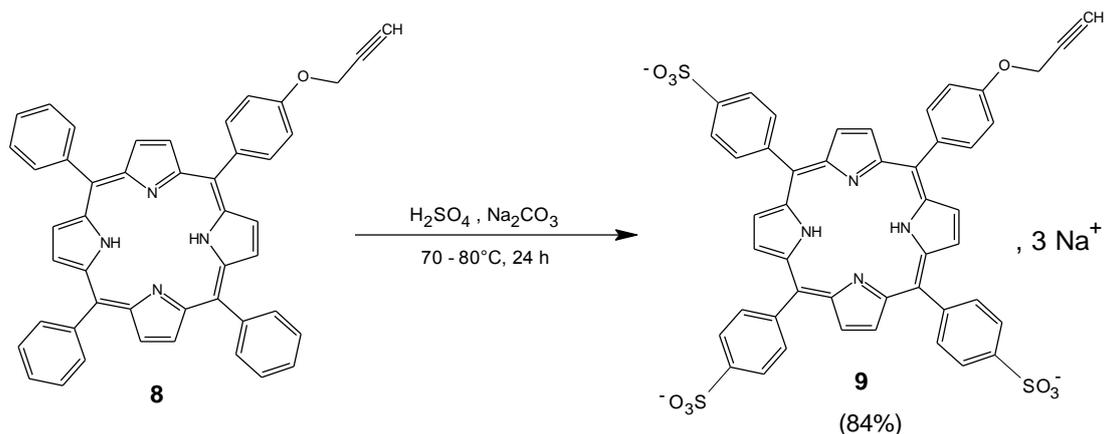


Figure 69 : Synthèse de la porphyrine anionique **9**.

Après neutralisation par le carbonate de sodium et précipitation dans le méthanol, le composé **9** est obtenu avec un rendement de 84%.

3-2-4 Métallation au zinc de la porphyrine hydrosoluble anionique

La métallation du macrocycle est réalisée en faisant réagir la porphyrine base libre **9** avec un excès d'acétate de zinc dans l'eau à reflux durant 2 h (figure 70).

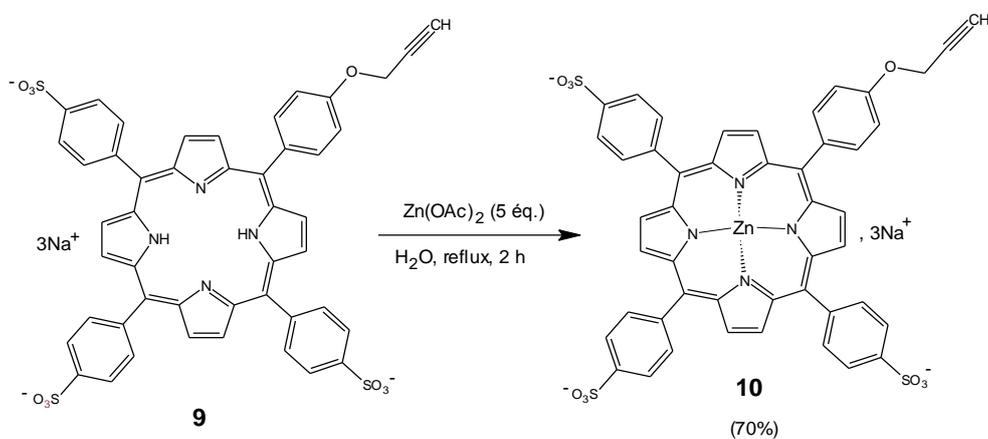


Figure 70 : Métallation de la porphyrine trisulfonée **10**

Le composé métallé **10** est obtenu, après dialyse (seuil de coupure de 1000 Da), avec un rendement de 70%. Le spectre UV-Visible appuie sans équivoque ce résultat.

3-3- Synthèse de la porphyrine hydrosoluble propargylée cationique

3-3-1 Synthèse de la mono carboxyphényltripyridylporphyrine

Nous avons poursuivi ce travail en synthétisant la *méso*-carboxyphenylporphyrine. Ce composé a été synthétisé selon la méthode des « aldéhydes mixtes ».

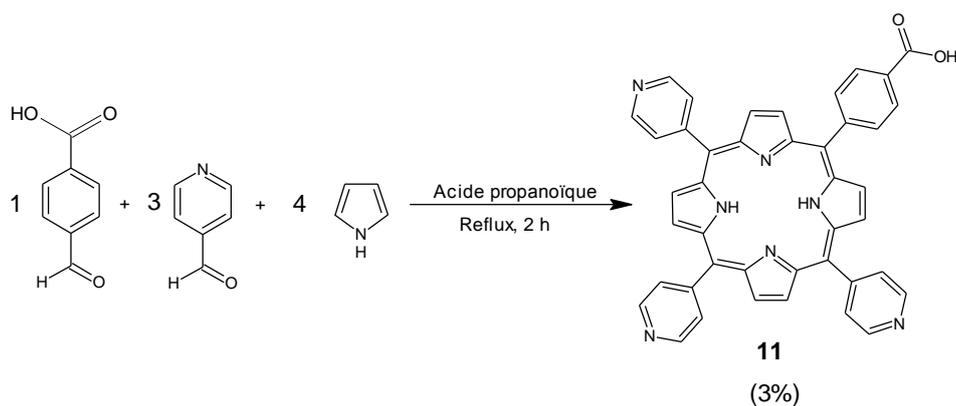


Figure 71 : Synthèse de la mono-carboxyphényl tripyridylporphyrine **11**

Le produit attendu est obtenu par condensation du pyrrole fraîchement distillé et du 4-pyridine carboxaldéhyde sur le 4-carboxybenzaldéhyde, en proportions stochiométriques dans l'acide propionique à reflux qui joue le rôle de solvant et de catalyseur. Le composé monocarboxylé **11** est isolé avec un rendement de 3 %. Ce faible rendement peut s'expliquer par la difficulté de purification sur colonne et plaque de silice.

3-3-2 Synthèse de la mono-(4-propargylamido phényltripyridyl) porphyrine

Le composé propargylé **12** est obtenu par formation d'une liaison amide entre la fonction acide carboxylique du composé **11** et l'amine primaire de la propargylamine (figure 72).

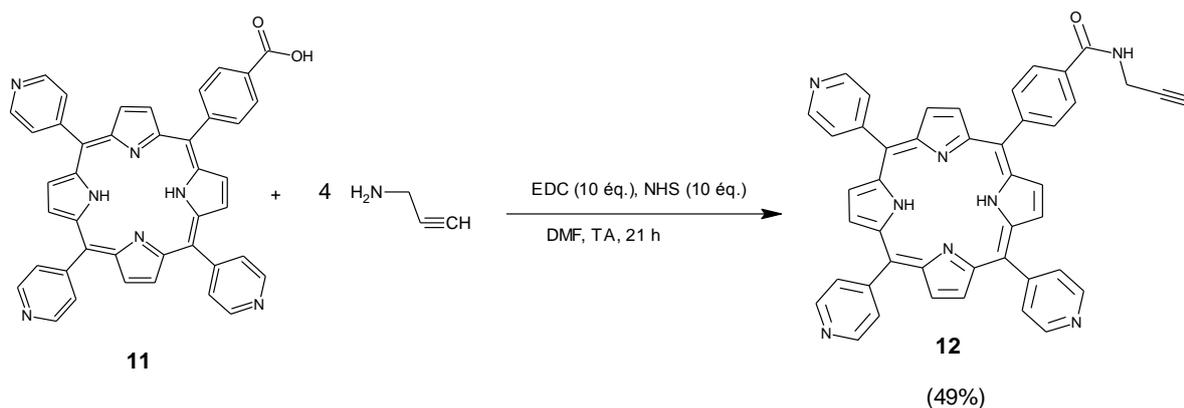


Figure 72 : Synthèse du composé **12** par couplage peptidique

La porphyrine **11** est mise à réagir avec un excès de propargylamine en présence de chlorhydrate de *N,N*-diméthyl-aminopropyl-éthyl-carbodiimide (EDC) et d'hydroxysuccinimide (NHS), également en excès. Ces catalyseurs, solubles dans l'eau s'éliminent facilement par simple lavage. De plus l'urée formée comme un sous produit au cours de la réaction est soluble dans l'eau (éliminée par lavage). Après 21 heures de réaction, suivie d'une purification le composé **11** est obtenu avec un rendement de 49%. Ce résultat acceptable s'explique surtout par la difficulté de purification sur plaques préparatives de silice des composés portant des groupements pyridyles en *méso*. Les analyses du produit obtenu par RMN du proton et spectroscopie IR ont confirmé sa structure. Le mécanisme proposé pour ce type de couplage est présenté sur la figure 73.

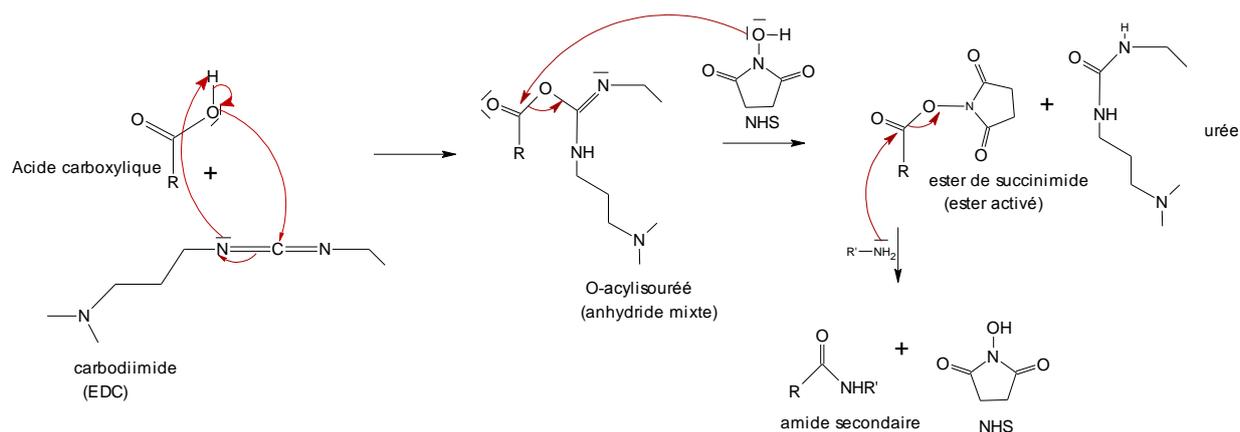


Figure 73 : Mécanisme réactionnel du couplage réalisé avec le système EDC/NHS

3-3-3 Synthèse de la porphyrine hydrosoluble cationique métallée

La première étape consiste en une *N*-alkylation des pyridines par un excès d'iodure de méthyle dans le DMF (figure 74). Après 24 h de réaction à température ambiante, la porphyrine cationique **13** est obtenue à l'issue d'une précipitation dans l'éthanol avec un rendement quantitatif. Le composé **13** soluble dans l'eau, est ensuite métallé en présence d'acétate de zinc. Après une dialyse (seuil de coupure de 1000 Da), la porphyrine **14** est obtenue avec un rendement de 66 %.

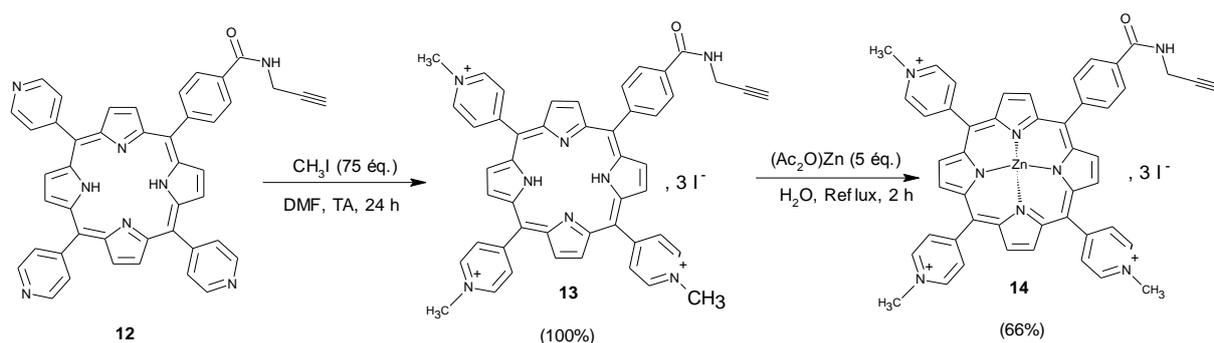


Figure 74 : Méthylation et metallation de la porphyrine tripyridyle **12**

4- Caractérisation des porphyrines

L'ensemble des précurseurs porphyriniques synthétisés ont été caractérisés par spectroscopie UV-Visible, fluorescence, RMN du proton et par spectrométrie de masse.

4-1- Spectroscopie UV-Visible

Les spectres des composés triglycosylporphyriniques **3–5**, des composés triphénylporphyriniques **7 – 8** et des composés tripyridylporphyriniques **11 – 12** ont été réalisés dans le chloroforme alors que ceux des composés hydrosolubles **6, 9, 10, 13** et **14** ont été effectués dans l'eau.

Toutes les porphyrines bases libres **3, 4, 7, 8, 9, 11, 12, 13** synthétisés ont des spectres de type *étio* (tableau 6). Ces spectres présentent une forte bande d'absorption (bande de Soret) vers 420 nm et quatre autres bandes d'intensité plus faible vers 516, 552, 590 et 648 nm, notées respectivement QIV,

QIII, QII et QI. Dans le cas des porphyrines métallées **5**, **6**, **10** et **14**, on note la disparition des bandes QIV et QI respectivement vers 516 et 648 nm.

Tableau 6 : bandes caractéristiques des spectres UV-Visible des porphyrines. λ_{\max} (nm) ; coefficient d'absorption molaire, ϵ ($\times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) à 25°C.

(a) CHCl_3 , (b) : H_2O .

Composés	Soret	QIV	QIII	QII	QI	$\epsilon_{\text{II}}/\epsilon_{\text{I}}$
3^a	420 (422,0)	516 (14,2)	552 (8,2)	592 (4,0)	650 (4,4)	0,90
4^a	421 (653,8)	517 (21,5)	554 (13,4)	592 (10,9)	648 (10,3)	1,06
5^a	422 (655,8)	-	554 (12,3)	592 (9,7)	-	-
6^b	416 (478,6) 441 (688,4)	-	564 (97,6)	604 (78,3)	-	-
7^a	419 (515,0)	516 (153,9)	552 (61,9)	591 (40,3)	647 (42,8)	0,94
8^a	419 (515,0)	516 (153,9)	552 (61,9)	591 (40,3)	647 (32,8)	1,23
9^b	415 (163,3)	519 (65,0)	558 (57,0)	599 (25,2)	645 (19,0)	1,33
10^b	423 (200,7)	-	559 (106,4)	600 (48,0)	-	-
11^a	418 (406,3)	513 (18,0)	543 (5,8)	588 (4,2)	643 (2,8)	1,50
12^a	420 (406,3)	513 (18,0)	543 (5,8)	588 (4,2)	641 (2,8)	1,31
13^b	435 (146,2)	510 (16,3)	563 (11,2)	607 (4,4)	647 (2,9)	1,51
14^b	435 (146,2)	-	563 (11,2)	607 (4,4)	-	-

Le spectre de type *étio* se caractérise par une diminution de l'intensité des quatre bandes Q des plus petites aux grandes longueurs d'onde (QIV > QIII > QII > QI). Cependant les spectres des porphyrines glycosylées **3** et **4** présentent de légères modifications dans l'intensité relative des bandes I et II conduisant à des spectres atypiques avec un coefficient ϵ_{I} légèrement supérieur à ϵ_{II} . Cette inversion du rapport $\epsilon_{\text{II}}/\epsilon_{\text{I}}$ a déjà été observée. ^[165]

D'une manière générale, les spectres des porphyrines en solution dans l'eau présentent un élargissement et/ ou un dédoublement de la bande de Soret (figure 75). On observe un déplacement de cette bande vers des plus fortes longueurs d'onde (effet bathochrome). Ces phénomènes déjà observés au sein de notre laboratoire ^[165], traduisant un phénomène d'agrégation (stacking) du photosensibilisateur de type J, « J-aggregate » ou « edge to edge ». ^[166]

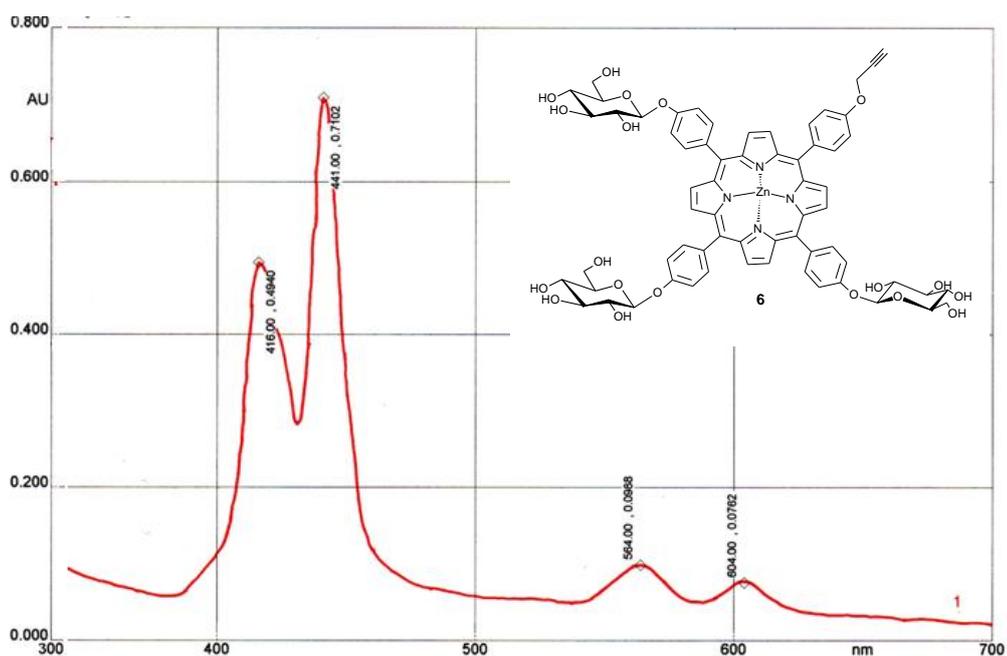


Figure 75 : Spectres UV de porphyrine métallée glucosylées **6** à 10^{-6} M dans l'eau

4-2- Spectroscopie de fluorescence

L'étude photophysique des porphyrines hydrosolubles **6**, **10** et **14** est poursuivie par l'évaluation des propriétés de fluorescence. En effet après excitation à la longueur d'onde d'absorption des bandes de Soret respectives (tableau 7) : toutes les porphyrines présentent un spectre d'émission à une plus forte longueur d'onde.

Tableau 7 : bandes caractéristiques d'excitation et d'émission en fluorescence des porphyrines hydrosolubles métallées.

	Bandes d'excitation (nm)	Bandes d'émission (nm)
Porphyrines neutres 6	441	605
Porphyrines anioniques 10	423	641
Porphyrines cationiques 14	435	625

Le spectre d'émission de fluorescence de la porphyrine glucosylée métallée **6** est présenté sur la figure 76. Après excitation à 441 nm, on observe une émission de fluorescence vers 600 nm. Ce résultat est conforme à ceux reportés dans la littérature.

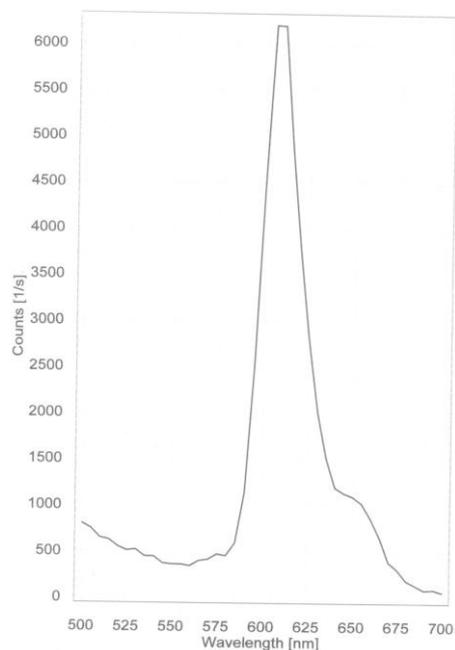


Figure 76 : Spectre de fluorescence de porphyrine métallée glucosylée **6** à 10^{-6} M dans l'eau

4-3- Spectrométrie de masse

L'analyse structurale des porphyrines a été poursuivie avec l'étude de leur spectre de masse. Pour les composés neutres **3-6** et anioniques **7-10**, les spectres de masse obtenus (tableau 8) montrent la présence des pics quasi-moléculaires $[M+H]^+$ attendus, tandis que pour les composés cationiques **13** et **14** on observe la présence de l'ion $[M-3I]^{3+}$. Deux exemples de spectre sont représentés sur les figure 77 et figure 78.

Tableau 8 : spectrométrie de masse des composés **3** à **14**.

(a) : MALDI, (b) : ESI

Composés	Masse moléculaire calculée (uma)	Masse de l'ion observé (uma)
3^a	1669,59	1671,30 [M+H] ⁺
4^a	1705,93	1707,65 [M+H] ⁺
5^a	1767,84	1769,56 [M+H] ⁺
6^a	1266,60	1203,41 [M-Zn] ⁺
7^a	630,73	631,52 [M+H] ⁺
8^a	668,78	669,23 [M+H] ⁺
9^a	905,95	906,40 [M+H] ⁺
10^a	969,34	906,40 [M-Zn] ⁺
11^b	661,71	662,19 [M+H] ⁺
12^b	698,77	699,26 [M+H] ⁺
13^b	1124,59	741,31 [M-3I] ³⁺
14^b	1187,98	805,24 [M-3I] ³⁺

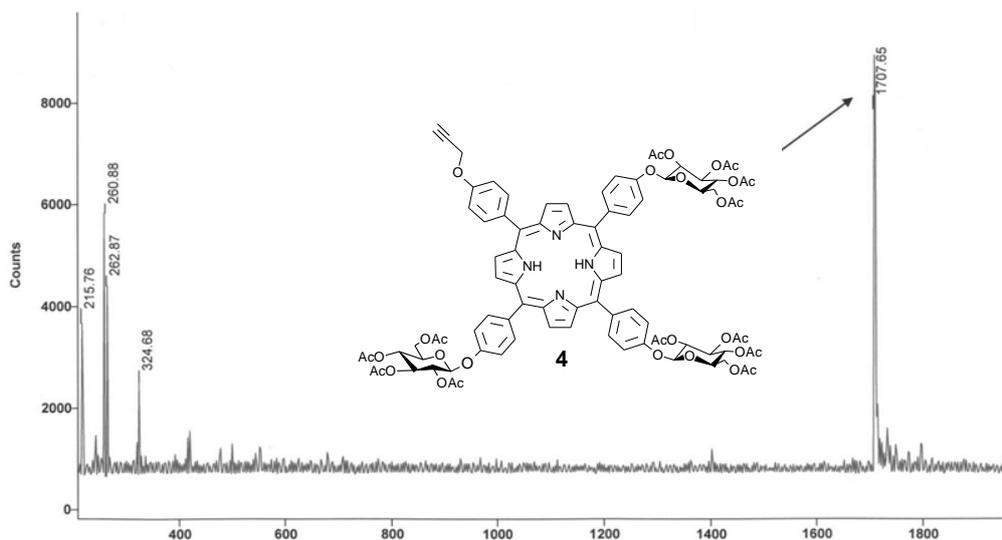


Figure 77 : Spectre de masse MALDI du composé **4**

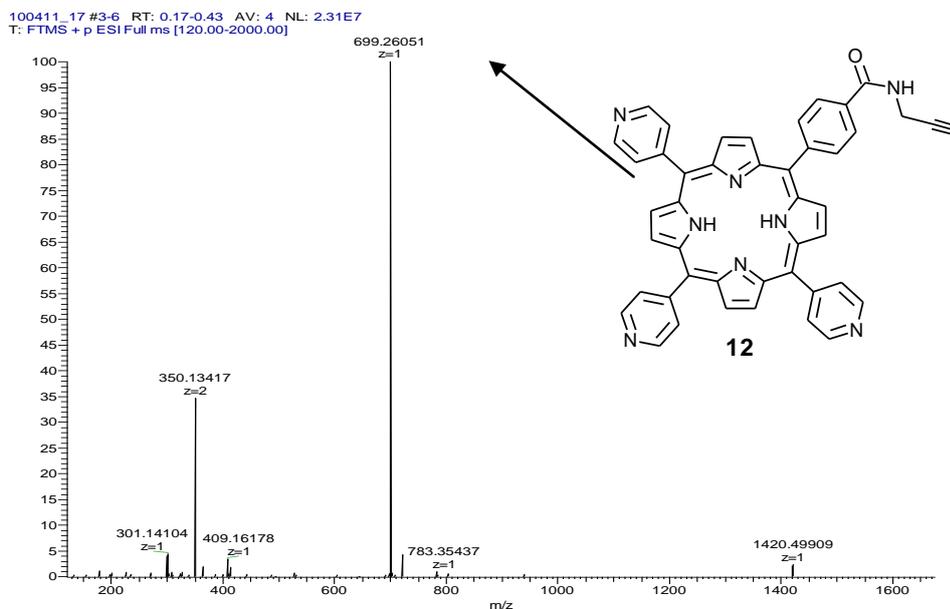


Figure 78 : Spectre de masse ESI du composé **12**

4-4- RMN proton

Les spectres RMN protons des porphyrines mono-triglycosylporphyrines **3-6** ont été enregistrés à la fréquence de 400,13 MHz, dans CDCl_3 pour les composés protégés **3-5** et dans le DMSO déteruré pour le composé hydrosoluble **6**. De façon générale, les spectres RMN ^1H se composent de six groupes de signaux (figure 79) ; les protons β -pyrroliques entre 8,86 et 9,98 ppm, les protons portés par les phényles et aryles-oses entre 7 et 8 ppm, les protons du groupement propargyle entre 2,60 et 5 ppm, les protons glucidiques entre 3,60 et 5,60 ppm, les protons des groupements

acétyles vers 2,2 ppm et les protons NH pyrroliques à -2,80 ppm. L'étude détaillée des spectres RMN ^1H des mono-triglycosylporphyrines est représentée au tableau 9.

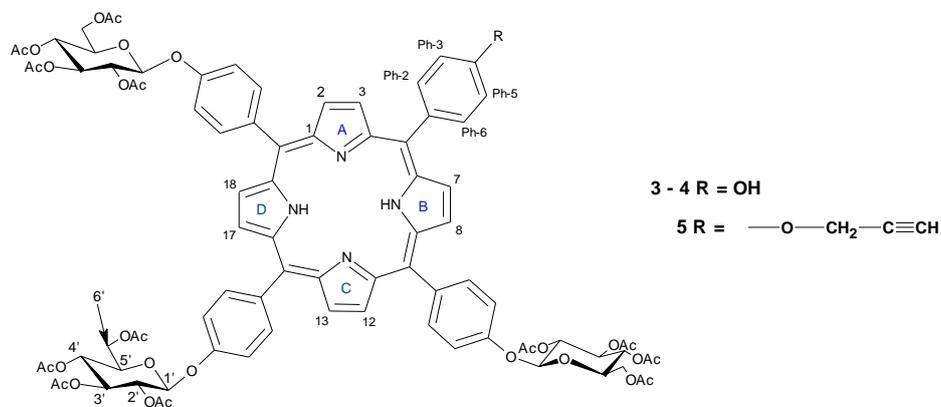


Figure 79 : Groupes des principaux signaux du spectre RMN ^1H (composés 3 – 5)

Les protons aromatiques du phényle qui porte soit la fonction hydroxyle ou le groupement propargyle en positions *para* résonnent sous la forme de deux doublets vers 7,29 ppm ($\text{H}_{3,5}$) et vers 8,10 ppm ($\text{H}_{2,6}$) avec une constante de couplage $^3J = 8,3$ Hz. Les protons aromatiques des trois groupements phényles portant les unités glucidiques résonnent également, compte tenu de la symétrie de la molécule, sous forme de deux doublets situés vers 7,36 ppm ($\text{H}_{3,5}$) et vers 8,11 ppm ($\text{H}_{2,6}$). Les protons β -pyrroliques résonnent quant à eux sous la forme de trois signaux : vers 8,82 ppm, on observe un singulet correspondant aux quatre protons des noyaux C et D ($\text{H}_{12}, \text{H}_{13}, \text{H}_{17}, \text{H}_{18}$). Les protons $\text{H}_{2,8}$ ainsi que les protons $\text{H}_{3,7}$ des noyaux A et B forment chacun un doublet situé respectivement vers 8,81 ppm et 8,87 ppm avec une constante de couplage $^3J = 4,8$ Hz. Le nombre et la multiplicité des signaux des protons β -pyrroliques est en accord avec la symétrie de la molécule. En ce qui concerne la partie osidique, les protons $\text{H}_{1'}$, $\text{H}_{2'}$ et $\text{H}_{3'}$ se présentent générale sous la forme de multiplets vers 5,48 ppm. On observe pour le proton $\text{H}_{4'}$ un triplet élargi vers 5,35 ppm. Le proton $\text{H}_{5'}$ quant à lui conduit à un double doublet vers 4,06 ppm ($J = 9,6$ et 5,1 Hz). Les protons $\text{H}_{6'a, b}$ sont observés sous la forme d'un double doublet vers 4,50 ppm ($J = 12$ et 5,1 Hz) et d'un doublet apparent vers 4,31 ppm ($J = 12$ Hz). Les protons des groupements acétyles donnent lieu à quatre singulets à 2,11 ppm, 2,12 ppm et 2,22 ppm. A noter que ces protons acétyles sont absents pour le composé hydrosoluble 6 du fait de la désacétylation des groupements glucosyles. La propargylation quant à elle s'observe par la présence, pour les composés 4-5-6, des protons propargyliques qui résonnent à 4,92 ppm sous la forme d'un doublet ($^3J = 2,3$ Hz) pour CH_2 et à 2,63 ppm sous la forme d'un triplet ($^4J = 2,3$ Hz) pour le proton acétylénique $\equiv\text{C-H}$. Enfin les protons NH pyrroliques, se trouvent dans le cône d'anisotropie et résonnent vers -2,82 ppm sous la forme de singulet. Ces derniers sont absents pour les composés 5 et 6 en raison de la chélation par l'atome de zinc.

Tableau 9 : RMN ¹H des porphyrines 3- 6.(a) : CDCl₃, (b) : d₆-DMSO; δ en ppm, figure, (J en Hz).

H	3 ^a	4 ^a	5 ^a	6 ^b
<u>Pyrroles</u>				
H _β : 2,8	8,86 d (4,8)	8,85 d (4,8)	8,98 d (4,8)	8,81 d (5,1)
3,7	8,81d (4,8)	8,81 d (4,8)	8,81 d (4,8)	8,78 d (4,9)
12	8,82 s	8,82 s	8,82 s	8,80 s
13	8,82 s	8,82 s	8,82 s	8,80 s
17	8,82 s	8,82 s	8,82 s	8,80 s
18	8,82 s	8,82 s	8,82 s	8,80 s
NHint	-2,82 s	-2,82 s	-	-
<u>Phényle</u>				
2,6	8,03 d (8,3)	8,10 d (8,3)	8,10 d (8,3)	8,07 d (8,4)
3,5	7,17 d (8,3)	7,29 d (8,3)	7,29 d (8,3)	7,44 d (8,5)
<u>Aryles – Oses</u>				
2,6	8,11 d (8,4)	8,11 d (8,4)	8,11 d (8,4)	8,10 d (8,7)
3,5	7,36 d (8,4)	7,36 d (8,4)	7,36 d (8,4)	7,40 d (8,5)
<u>Propargyle</u>				
CH ₂	-	4,92 d (2,3)	4,92 d (2,3)	5,09 d (2,2)
≡CH	-	2,63 t (2,3)	2,63 t (2,3)	3,76 t (4,4)
<u>O-Glucosyles</u>				
1'	5,48 m	5,48 m	5,48 m	5,52 s él.
2'	5,48 m	5,48 m	5,48 m	5,28 s él.
3'	5,48 m	5,48 m	5,48 m	5,22 t (12,9)
4'	5,35 t él. (9,5)	5, 35 t él. (9,5)	5,35 t él. (9,5)	5,22 t (12,9)
5'	4,06dd (9,6-5,1)	4,06dd (9,6-5,1)	4,06dd (9,6-5,1)	4,75 s él.
6'a	4,44dd (12 - 5,1)	5,35 t él	4,44 dd (12-5,1)	3,81 d él. (10, 9)
6'b	4,31d él. (12)	4, 31 d él. (12)	4,31 d él. (12)	3,60 d él. (10,9)
<u>Acétyles</u>				
	2,22 s	2,22 s	2,22 s	-
	2,12 s	2,12 s	2,12 s	-
	2,11 s	2,11 s	2,11 s	-

Les spectres RMN ^1H des *méso*-triphénylporphyrines **7-10** ont été enregistrés dans le chloroforme deutéré pour les composés **7, 8** et dans le diméthylsulfoxyde pour ceux hydrosolubles **9** et **10**. D'une manière générale, les spectres RMN ^1H de ces *méso*-aryltriphénylporphyrines se composent de trois principaux groupes de signaux (figure 80) ; les protons β -pyrroliques vers 8,80 ppm, les protons portés par les aryles entre 8,60 ppm et 7 ppm ainsi que les protons NH pyrroliques vers -2,80 ppm.

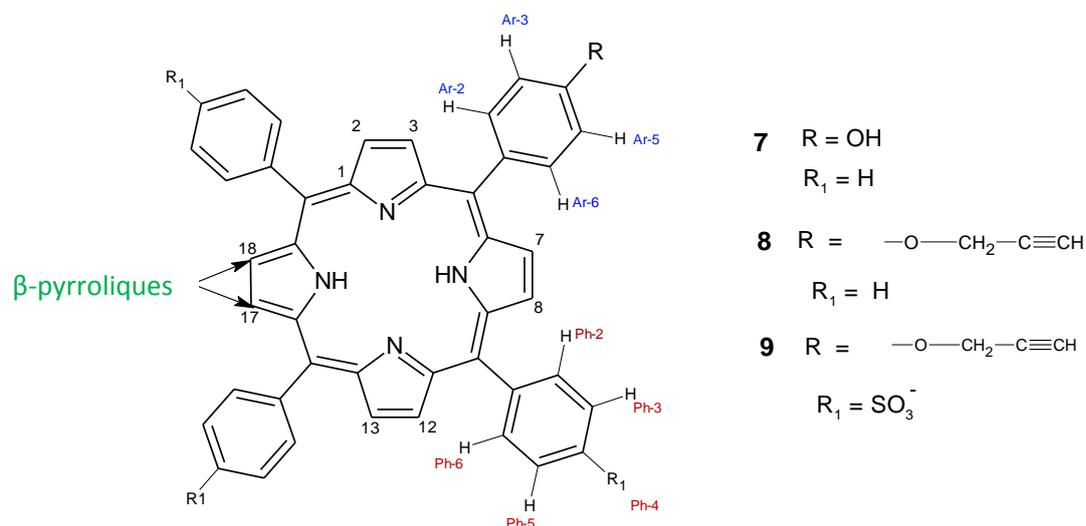


Figure 80 : Groupes des principaux signaux du spectre RMN ^1H (composés **7 – 9**)

L'étude détaillée des spectres RMN ^1H est présentée dans le tableau 10. Ainsi, les protons β -pyrroliques résonnent vers 8,95 ppm sous la forme de doublet ou de singulet. ^[167] Les protons portés par le noyau aryle, résonnent vers 8,03 ppm et vers 7,15 ppm pour les couples H_{2,6} et H_{3,5} avec des constantes de couplage $^3J = 8,2$ Hz ; ceci concerne les composés **7** et **8**. Cependant pour les composés sulfonés **9** et **10**, ils (H_{2,6} et H_{3,5}) résonnent vers 7,92 ppm et 7,02 ppm avec la même constante de couplage que précédemment. Pour les composés **7** et **8**, les protons phényliques H_{2,6} résonnent à 8,21 ppm sous la forme d'un doublet (3J de l'ordre de 7,4 – 8,0 Hz) alors que les protons H_{3,4,5} vers 7,74 ppm ($^3J = 7,3$ Hz). Pour les composés hydrosolubles **9** et **10**, les protons phényliques H_{3,5} résonnent à 8,20 ppm avec une constante de couplage $^3J = 8,0$ Hz. Ces deux protons (H_{3,5}) sont déblindés par rapport aux protons H_{2,6} qui résonnent quant à eux vers 8,12 ppm ($^3J = 8,0$ Hz). Ce déblindage est dû à la substitution électrophile des protons phényliques en position 4 par des groupements sulfonyles qui exercent un effet mésomère attracteur plus important sur les positions ortho (H_{3,5}). Les protons des NH pyrroliques internes comme dans le cas précédent se trouvant fortement blindés (- 2,86 ppm) dans le cône d'anisotropie sont absents après la métallation de la porphyrine base libre. La propargylation des porphyrines est mise en évidence par la résonance des protons propargyliques à 4,21 ppm sous la

forme d'un doublet ($^4J = 2,3$ Hz) pour les CH₂ et à 2,62 ppm sous la forme d'un triplet ($^4J = 2,3$ Hz) pour le proton acétylénique $\equiv\text{C-H}$.

Tableau 10 : RMN 1H des porphyrines **7 - 10**.

(a) : CDCl₃, (b) : *d*₆-DMSO; δ en ppm, figure, (*J* en Hz).

H	7 ^a	8 ^a	9 ^b	10 ^b
<u>Pyrroles</u>				
H _{β} : 2,8	8,94 d (4,7)	8,94 d (4,7)	8,97 d (4,5)	8,98 d (4,5)
3,7	8,84d (4,7)	8,83 s	8,95 d (4,5)	8,96 d (4,5)
12	8, 82 s él.	8,83 s	8,83 s	8,83 s
13	8, 82 s él.	8,83 s	8,83 s	8,83 s
17	8, 82 s él.	8,83 s	8,83 s	8,83 s
18	8, 82 s él.	8,83 s	8,83 s	8,83 s
NHint	-2,75 s	-2,77 s	-2,86 s	-
<u>Aryle</u>				
2,6	8,03 d (8,2)	8,03 d (8,2)	7,92 d (8,2)	7,93 d (8,2)
3,5	7,15 d (8,2)	7,15 d (8,2)	7,02 d (8,2)	7,02 d (8,2)
<u>Phényles</u>				
2,6	8,21 d (7,6)	8,21 d (7,6)	8,11 d (8,0)	8,12 d (8,0)
4	7,74 d (7,4)	7,74 d (7,4)	-	-
3, 5	7,74 d (7,4)	7,74 d (7,4)	8,19 d (8,0)	8,20 d (8,0)
<u>Propargyle</u>				
CH₂	-	4,93 d (2,3)	4,91 d (2,3)	4,91 d (2,3)
$\equiv\text{CH}$	-	2,60 t (2,3)	2,62 t (2,3)	2,62 t (2,3)

D'une manière générale, le spectre RMN ¹H des *méso*-tripyridylporphyrines se compose des mêmes groupes de signaux (figure 81) que les composés triphénylporphyriniques. Les protons β -pyroliques résonnent vers 9 ppm, les protons portés par les aryles et les pyridyles entre 9,46 et 8,20 ppm ainsi que les protons NH pyrroliques vers - 2,69 ppm. Ces derniers sont absents pour le composé **14** en raison de la chélation par l'atome de zinc. Deux groupes supplémentaires sont observés, les protons du groupement propargyle entre 4,28 ppm et 3,17 ppm et les protons des CH₃ *N*-méthylpyridinium vers 4,72 ppm.

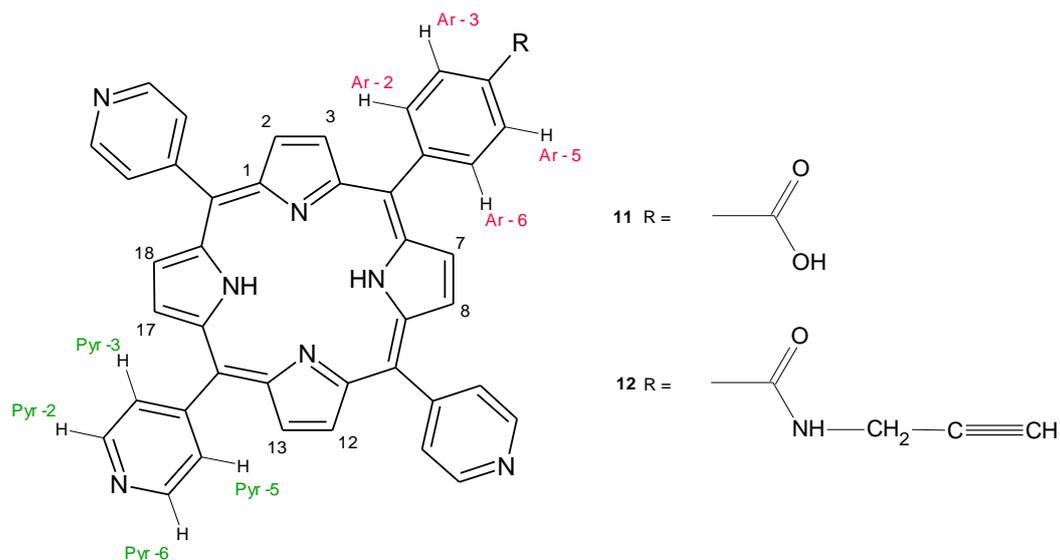


Figure 81 : Groupes des principaux signaux du spectre RMN ¹H (composé 11- 12)

L'étude détaillée des spectres RMN ¹H des *méso* – tripyridylporphyrines est représentée au tableau 11. Les protons β- pyrroliques résonnent entre 8,90 ppm et 9,07 ppm sous la forme de doublet ou de singulet. Les protons H_{2, 6} pyridyles résonnent entre 8,95 ppm et 8,98ppm ($J = 5,1$ Hz), plutôt déblindés (composé 11 et 12) du à l'effet inductif attracteur de l'hétéroatome en α tandis que ceux des composés 13 (9,48 ppm avec un $^3J = 6,2$ Hz) et 14 (9,46 ppm, $^3J = 6,2$ Hz) sont d'autant plus déblindés car l'azote du noyau pyridyle est chargé positivement, l'effet attracteur s'en trouve augmenté. Pour les protons pyridyles H_{3, 5}; on a les mêmes observations. Ces protons résonnent vers 8,20 ppm ($^3J = 5,1$ Hz) pour les composés 11 et 12 ; et vers 8,98 ppm ($J = 5,7$ Hz) pour les composés 13 et 14, valeurs élevés par la présence d'un hétéroatome (l'azote) au sein du cycle. Pour les protons aryles, le couple H_{3, 5} résonne vers 8,33 ppm et le couple H_{2, 6} vers 8,37 ppm avec une constante de couplage de $^3J = 8,4$ Hz. Ces résultats obtenus sont conformes aux produits carboxylés. A noter également que les protons CH₃ *N*-méthylpyridinium résonnent à 4,72 ppm sous la forme de singulet pour les composés 13 et 14. Enfin les protons propargyliques résonnent à 4,28 ppm sous la forme d'un doublet ($^3J = 5,2$ Hz et $^2J = 2,4$ Hz) pour CH_β et à 3,17 ppm sous la forme d'un triplet ($^4J = 3,2$ Hz) pour le proton acétylénique ≡C-H.

Tableau 11 : RMN 1H des porphyrines 11- 14.

(a) : CDCl₃, (b) : d₆-DMSO; δ en ppm, figure, (*J* en Hz).

H	11 ^a	12 ^a	13 ^b	14 ^b
<u>Pyrroles</u>				
H_β: 2,8	9,07 d (4,6)	9,02 d (4,7)	9,07 d (4,8)	9,07 d (4,8)
3,7	8,93 d (5,1)	8,90 d (5,0)	8,93 d (5,0)	8,96 d (5,1)
12	9, 11 s	9,11 s	9,14 s	9,16 s
13	9,11 s	9,11 s	9,14 s	9,16 s
17	9,11 s	9,11 s	9,14 s	9,16 s
18	9,11 s	9,11 s	9,14 s	9,16 s
NHint	-2,69 s	-2,73 s	-2,60 s	-
<u>Aryle</u>				
2,6	8,36 d (8,4)	8,62 d (8,4)	8,37 d (8,4)	8,37 d (8,4)
3,5	8,32 d (8,4)	8,40 d (8,4)	8,33 d (8,4)	8,33 d (8,4)
<u>Pyridyl</u>				
2,6 (×3)	8,98 d (5,1)	8,95 d (5,1)	9,48 d (6,2)	9,46 d (6,2)
3, 5 (×3)	8,20 d (5,1)	8,20 d (5,1)	8,97 (5,7)	8,99 d (5,7)
CH₃ (×3)	-	-	4,23 s ; 4,69 s	4,72 s ; 4,71 s
<u>Propargyle</u>				
CH_α	-	4,28 d (5,2)	4,28 d (5,2)	4,28 d (5,2)
CH_β	-	4,23 dd (5,6-2,4)	4,23 dd (5,6-2,4)	4,25 dd (5,6-2,4)
≡CH	-	3,17 d (3,2)	3,17 d (3,2)	3,17 t (3,2)

A titre d'exemple le spectre RMN¹H du composé **12** est représenté sur la figure 82.

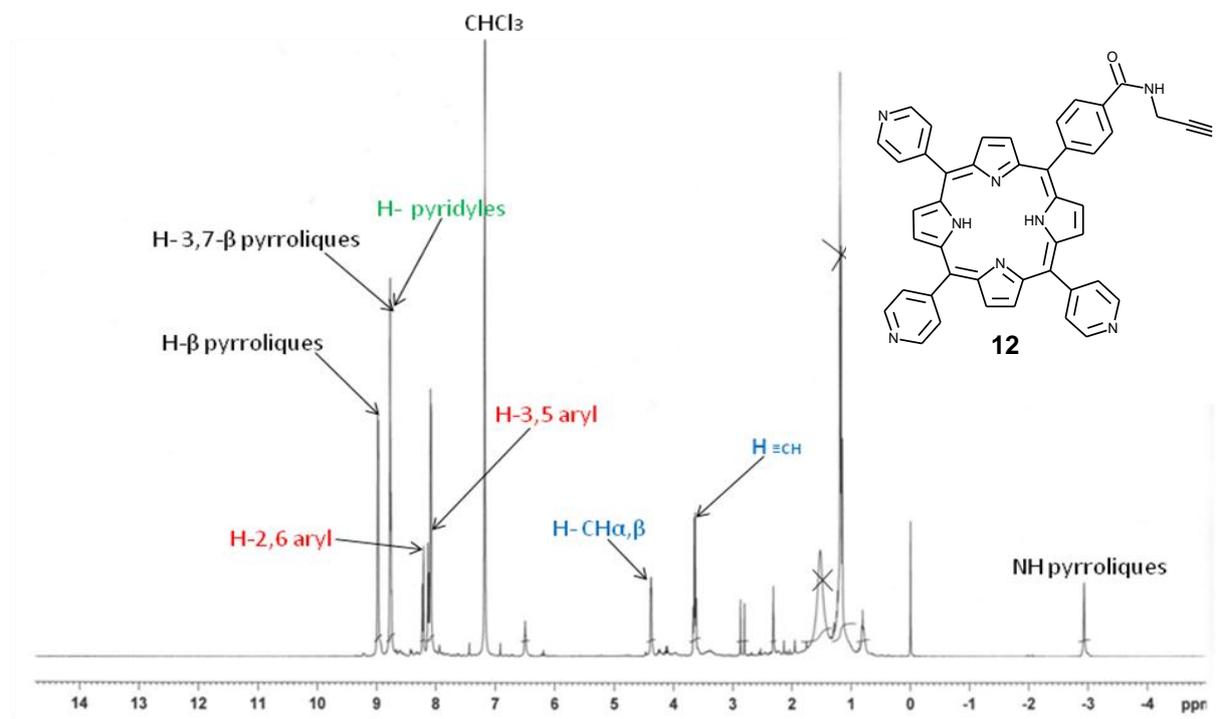


Figure 82 : Spectre RMN ¹H du composé **12** dans CDCl₃

Les intermédiaires porphyriniques propargylés de chaque précurseur hydrosoluble vont pouvoir être engagés dans la réaction de greffage avec les nanoparticules d'oxyde de fer.

5- Synthèse des Nanoparticules d'oxyde de fer Azidées

Avant d'élaborer les nanoparticules à motifs porphyriniques, nous avons tout d'abord synthétisé les nanoparticules d'oxyde de fer. Ces dernières sont en effet le plus souvent utilisées en biologie, du fait de leur aimantation élevée (IRM), mais aussi par leur caractère biodégradable et non toxique. Ces nanoparticules peuvent être fabriquées suivant deux approches bien différentes, soit par attrition mécanique ou par synthèse chimique. La voie chimique nous a semblé la mieux adaptée afin de produire des nanoparticules avec une composition et une taille uniforme. ^[168]

Ainsi afin de mieux contrôler les phénomènes d'agrégations et de renforcer les interactions entre les macromolécules et les particules, nous avons utilisé une méthode de préparation en trois étapes. La première consiste à préparer les nanoparticules et à les stabiliser par répulsion stérique avec des macromolécules. Ces dernières peuvent être d'origine naturelle ou synthétique. Les polymères synthétiques, comme le polyéthylène glycol (PEG), sont largement employés. Cependant, notre attention s'est portée sur le dextrane qui est un polysaccharide d'origine naturelle et biodégradable. La seconde étape consiste d'une part à créer des liens alkyl éthers entre les chaînes du polysaccharide pour éviter sa désorption progressive du noyau d'oxyde de fer. D'autre part la présence des fonctions époxydes restantes en surface de la nanoparticule permettra l'azidation du dextrane. Enfin nous avons procédé à l'azidation de la surface des nanoparticules afin de fixer par la suite les photosensibilisateurs préalablement décrits par la réaction de « Click Chemistry ».

Avant de présenter la synthèse et la caractérisation des nanoparticules **15**, **16** et **17**, nous nous proposons de présenter brièvement quelques généralités sur l'application du dextrane comme revêtement des nanoparticules dans le domaine médical.

5-1- Le dextrane

Le dextrane est un polysaccharide bactérien ramifié composé d'unités glucose avec des masses molaires allant de 10 à 150 KDa. Cet exopolysaccharide (polysaccharide excrété à l'extérieur de la paroi cellulaire de la bactérie) est majoritairement commercialisé sous la forme linéaire où les unités glucosidiques sont reliées par des liaisons osidiques en α -(1 \rightarrow 6). En effet ce polysaccharide est composé à plus de 95% de liaisons α -(1 \rightarrow 6) dans la chaîne principale, et moins de 5% de ramification en α -(1 \rightarrow 3) (figure 83).

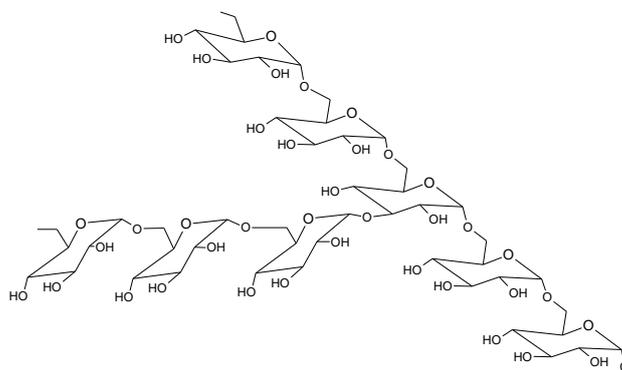


Figure 83 : Représentation schématique de la structure générale du dextrane synthétisé à l'aide de la bactérie *Leuconostoc*

Il existe également d'autres ramifications et branchement existent également qui sont fonction de la souche bactérienne utilisée. Les espèces issus de bactérie « gram positif » sont les plus utilisées pour former du dextrane et sont généralement du genre *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*.^[169] Cependant c'est la bactérie *Leuconostoc Mésentéroïdes* (souche B512-F) qui est la plus fréquemment employée dans la production commerciale des dextrans, notamment dans les secteurs pharmaceutiques, cosmétique et alimentaire.^[170] Les dextrans peuvent également être produites industriellement par fermentation du sucrose catalysée par la dextranase-sucrase.^[171]

5-1-1- Propriétés physicochimiques du dextrane

La forte teneur en liaisons α -(1 \rightarrow 6) confère au dextrane une grande hydrosolubilité par rapport aux autres glucanes, aussi bien dans l'eau que dans des solvants organiques tels que l'urée (6M), la glycine (2M), le formamide ou le glycérol. En dehors des conditions extrêmes de pH (2 < pH < 11), la chaîne macromoléculaire du dextrane est peu sensible à l'hydrolyse.

5-1-2- Applications cliniques et biomédicales du dextrane

Les dextrans de masse molaire inférieure à 7000 g/mol sont éliminés facilement de l'organisme par le système de filtration rénale.^[172] Il est par ailleurs totalement biocompatible, faiblement antigénique, biodégradable et bioéliminable. Toutes ces qualités permettent d'utiliser le dextrane pour des applications *in vivo*.^[173] En effet c'est dans le secteur pharmaceutique que le dextrane trouve le plus d'applications. Par exemple le dextrane de *Ln. Mesenteroides* NRRLB-512F est utilisé depuis plus d'une quarantaine d'année pour répondre à des besoins de substitution du plasma sanguin.^[174] La taille optimale des dextrans pour ce type d'application varie entre 40 et 100 KDa. Ce polysaccharide, dans ces conditions, possède l'avantage de rester suffisamment longtemps dans la circulation sanguine, comparé à d'autres molécules qui pénètrent rapidement les membranes vasculaires.

Une autre application, plus récente du dextrane concerne la stabilisation stérique des nanoparticules. Pour ce genre d'application, la taille de dextrane requise est comprise entre 10 et 150 KDa. En raison de sa biocompatibilité et de ses interactions polaires (chélation et de liaison hydrogène), le dextrane possède une forte affinité pour des surfaces métalliques comme celles d'oxydes de fer.^[175] Cette application du dextrane en tant que stabilisant des nanoparticules (SPION) a été cliniquement approuvée.^[176 -177] Depuis lors, diverses formes de polymères de dextrane, le carboxydextrane et le carboxyméthyl-dextrane, ont été utilisées comme stabilisant stérique des nanoparticules SPIONs avec différentes tailles hydrodynamiques.^[178] Ce caractère stabilisant du dextrane, basé sur des liaisons

hydrogène, rend le polymère sensible à toute désorption progressive en présence d'autres composés. Pour éviter ce phénomène, les polymères, après attachement aux nanoparticules (SPIONs), sont réticulés en utilisant de l'épichlorhydrine et de l'ammoniac pour former ainsi des nanoparticules CLIO (« Crosslinked iron oxides »). Ces nanoparticules CLIO sont devenues une plate-forme polyvalente qui a démontré une importante demi-vie dans le sang sans aucune toxicité aiguë. [179]

5-2- Synthèse des Nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées par le dextrane T10

La synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer est réalisée selon le procédé de Molday et Mackenzie. [180] Les macromolécules de dextrane préalablement dissoutes en solution aqueuse, se retrouvent alors naturellement adsorbées à la surface des cœurs magnétiques (figure 84).

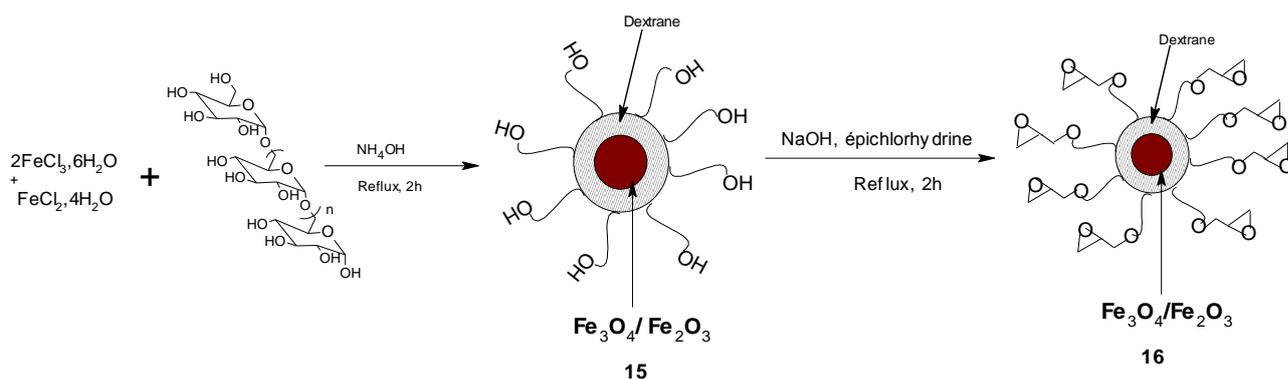


Figure 84 : Schéma de la synthèse de nanoparticules de maghémite stabilisées par le dextrane réticulé

Les nanoparticules sont formées par addition de chlorure de fer (III) hexahydraté et de chlorure de fer (II) tétrahydraté à une solution de dextrane (10 000 Da). Les nanoparticules **15** sont obtenues après 2h de réaction à reflux, la solution est ensuite neutralisée par de l'hydroxyde d'ammonium (pH~ 6-7). Afin d'obtenir des nanoparticules de taille homogène, le composé **15** est placé sous chromatographie d'exclusion stérique sur colonne de séphadex LH20. Cependant la faible interaction entre les particules de fer et le dextrane, entraîne parfois sa désorption progressive. Il apparaît ainsi un équilibre thermodynamique. Pour remédier à ce phénomène, nous avons réticulé les macromolécules par l'épichlorhydrine en créant entre elles des ponts alkyl éthers en présence de NaOH, ce qui revient à piéger mécaniquement la particule au sein de la couronne. Cependant, les époxydes fixés aux extrémités des chaînes de dextrane ne pourront (du fait de l'éloignement) réagir sur les chaînes voisines et resteront libres pour une réaction ultérieure (l'azoturation). L'époxydation du

dextrane donne une suspension ainsi colloïdale jaune et fluide (figure 85). Compte tenu du caractère colloïdal de la suspension, celle-ci a été purifiée par dialyse afin d'éliminer les sels et tous les réactifs n'ayant pas réagi. Nous obtenons après lyophilisation le composé **16**. Ce dernier est caractérisé par MET, ATG, IR et magnétométrie.

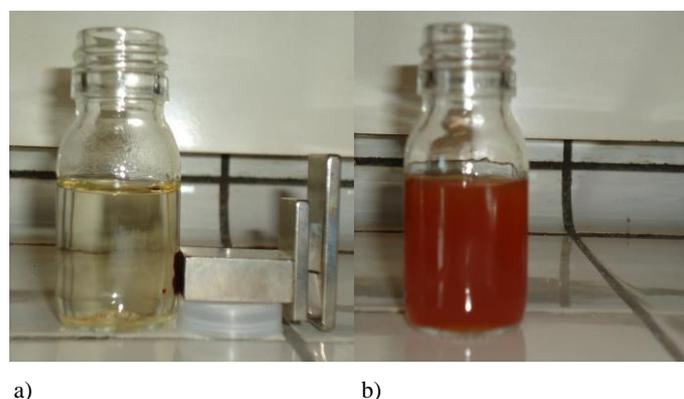


Figure 85 : Photographies de la suspension des nanoparticules **16** en présence (a) et en absence (b) d'un aimant

5-3- Azidation des Nanoparticules d'oxyde de fer

L'étape suivante consiste en une addition nucléophile de l'azoture de sodium sur l'époxyde présent à la surface des nanoparticules (figure 86). Cette fonction azide en surface des nanoparticules est destinée à être utilisée dans la réaction de « Click Chemistry ».

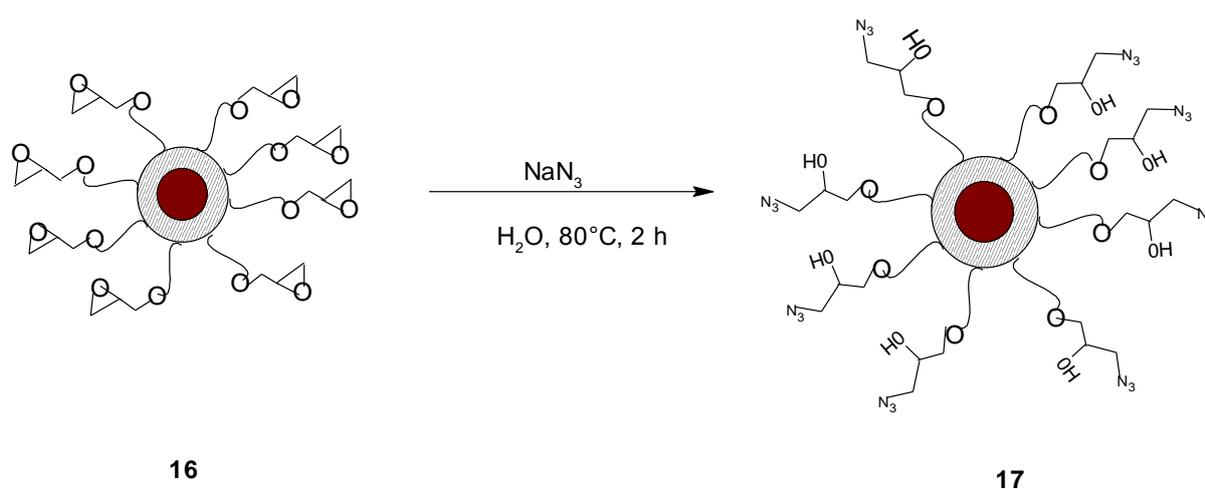


Figure 86 : Azidation des nanoparticules via le dextrane

Après 24 h de réaction à 80°C, le composé **17** est obtenu après une purification sur dialyse (seuil de coupure : 6000-8000 Da).

6- Caractérisations des nanoparticules d'oxydes de fer

6-1- Détermination de la distribution en taille

Nous avons vu que la biodistribution des nanoparticules est dépendant de leur taille (voir chapitre I). La distribution en taille et l'état d'agrégation des nanoparticules ont été analysé. Une méthode granulométrique est ainsi été utilisée ; la microscopie électronique à transmission électronique (MET) qui donne accès à la taille et à la morphologie de ces nanoparticules.

Les clichés MET montrent des particules relativement sphériques et plus ou moins agglomérées (figure 87). Malgré les conditions de dilution, la densité de nanoparticules est élevée. Un histogramme en tailles est réalisé sur une population de 200 nanoparticules (figure 88). Les nanoparticules synthétisées présentent une distribution en taille qui est bien décrit par une loi log-normale :

$$P(d) = \frac{1}{\sigma d \sqrt{2\pi}} \text{Exp} \left[-\frac{\ln^2 \left(\frac{d}{d_0} \right)}{2\sigma^2} \right] \quad (1)$$

Où d_0 est diamètre médian (ou moyenne géométrique) et σ l'écart type des $\ln d$. L'écart type rend compte de la dispersion des valeurs des diamètres des nanoparticules autour de la valeur la plus probable d_p . Si l'écart type est faible, les valeurs des diamètres des nanoparticules sont regroupées autour de d_p ; s'il est important, elles sont en revanche très dispersées.

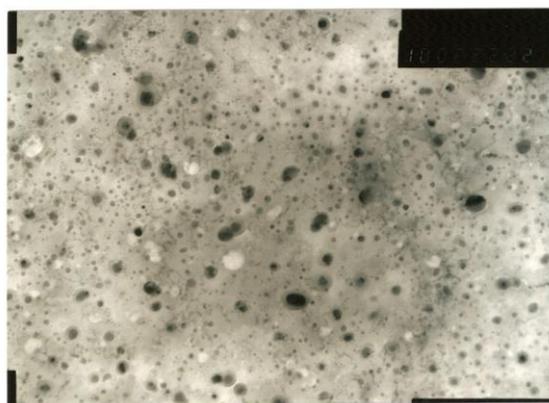


Figure 87 : Cliché de MET des nanoparticules d'oxyde de fer stabilisées par du dextrane T10 réticulée **17**

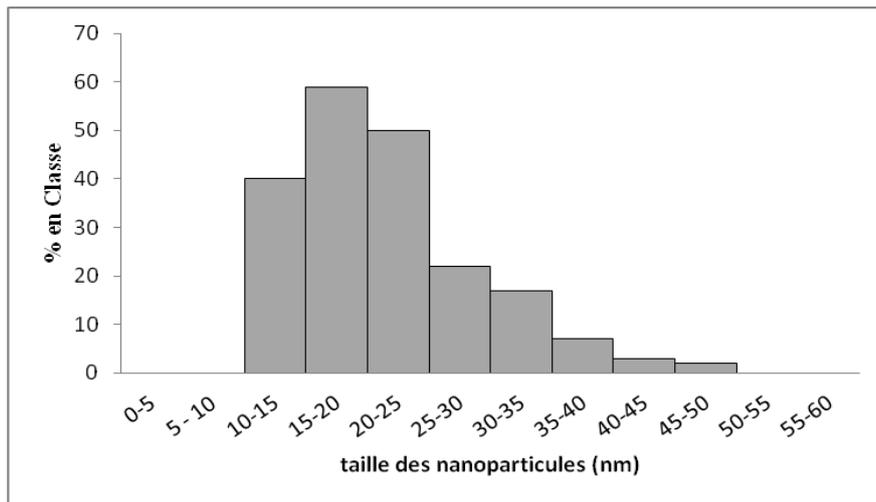


Figure 88 : Histogramme en taille des nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de dextrane

En effet cette distribution en taille (figure 88) est unimodale. Le diamètre le plus probable d_p est autour de 22,4 nm. L'histogramme présente une distribution en taille sous forme de courbe gaussienne. Cette courbe correspond à la densité $P(d)$ (équation 1) décrite plus haut. Nous constatons également que ces nanoparticules ont des diamètres très dispersés.

Ce dénombrement a été réalisé après chaque nouvelle synthèse des nanoparticules et les résultats obtenus sont similaires à ceux présentés ici, ce qui montre bien que la méthode de synthèse permet de contrôler la taille des nanoparticules. Enfin cette technique de MET est la plus appropriée pour mesurer le diamètre moyen car elle permet de s'affranchir des différents paramètres (couche d'agrégation) qui faussent les résultats comme c'est le cas de la spectroscopie de corrélation de photons (SCP).

6-2- Propriétés magnétiques

Une des caractéristiques des ferrofluides synthétisés est leur comportement superparamagnétique observé sur la courbe d'aimantation (figure 89) qui se distingue par l'absence du cycle d'hystérésis à 300 K. L'aimantation apparait ici comme un sigmoïde symétrique bien décrite par le formalisme de Langevin. Ces nanoparticules ainsi synthétisés ont un comportement global paramagnétique à 300 K. On parle alors de paramagnétisme géant, car l'énergie magnétique E_m ($E_m = \mu_0 \mu H$) de ces composés est environ 10^4 plus élevée que celle d'une substance paramagnétique.

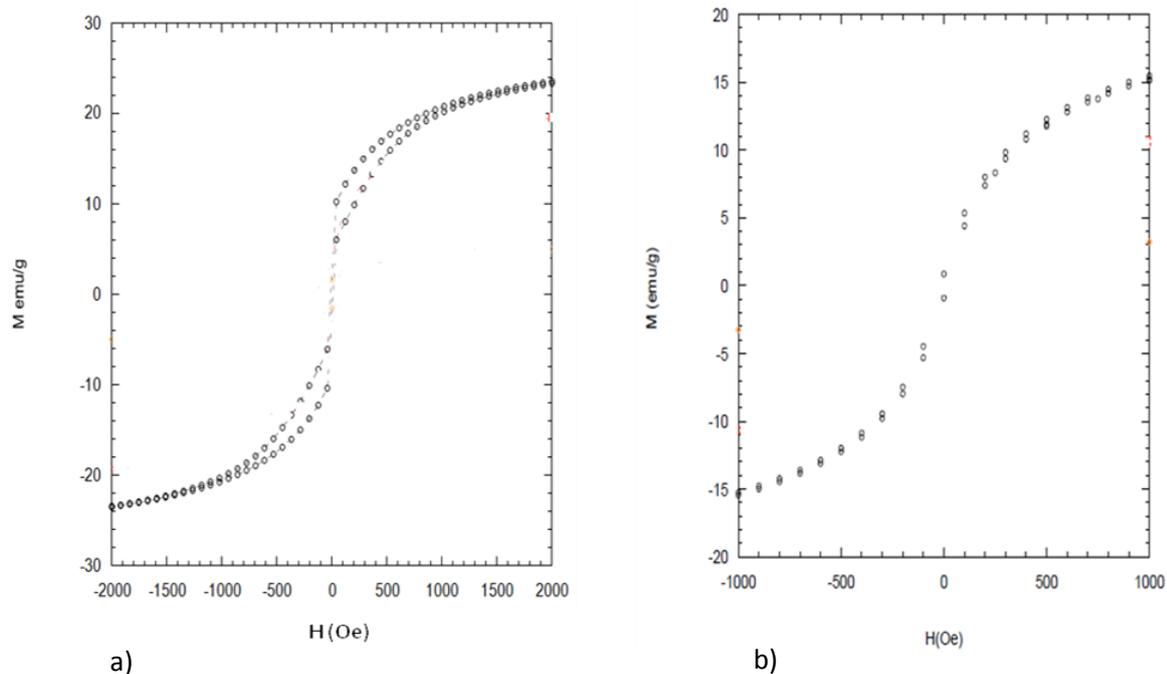


Figure 89 : Hystérésis des nanoparticules synthétisées 17 à 5K (a) et 300K (b)

D'après la littérature ^[181], l'aimantation à saturation à 0 K des oxydes de fer est égale à 85 uem.g⁻¹. Dans notre cas, la valeur maximale de l'aimantation, à 5 K est 24 uem.g⁻¹ ce qui montre que le système n'est pas saturé. Ce résultat est certainement dû à l'aimantation des particules de petites taille et à l'existence de la couche du dextrane sur la surface des particules. ^[182] Il faudrait appliquer, en fait, un champ magnétique beaucoup plus élevé (de l'ordre de > 800.000 Oe) pour saturer le système. Ceci s'explique du fait que la maghémite possède de façon générale une constante d'anisotropie magnétique élevée ($K_1 = - 4,64. 10^4 \text{ erg. Cm}^{-3}$) et qu'il faut donc apporter davantage d'énergie magnétique au système pour pouvoir orienter tous les moments dans la direction de facile aimantation. Nous observons aussi que le système sature moins vite à 300K (15 uem.g⁻¹), car dans ces conditions (température élevée) il faut en plus « surpasser » l'énergie d'activation thermique (kT).

En outre, à basse température (5K), le champ coercitif, bien que très faible, est non nul, ce qui implique que l'énergie d'anisotropie magnétocristalline (KV) devient supérieure à kT, le système adopte un comportement ferromagnétique caractérisé par l'ouverture légère du cycle d'hystérésis. Ce phénomène est attribué à la présence de quelques particules plus grandes qui se sont magnétisées, comme le montre bien le cliché MET.

Nous avons ensuite déterminé la limite entre ces deux états d'aimantation ($kV \gg kT$ et $kV \ll kT$) en mesurant la variation de l'aimantation non pas en fonction du champ appliqué mais cette fois-ci en fonction de la température (figure 90). La transition entre la phase superparamagnétique ($kV \ll kT$) et ferromagnétique ($kV \gg kT$) s'effectue à une température dite de blocage de $T_b = 140\text{K}$. Ce qui

confirme bien les résultats obtenus précédemment, à une $T < T_b$ ($T = 5\text{K}$) nous avons un phénomène ferromagnétique des nanoparticules et à une $T > T_b$ ($T = 300\text{K}$) un phénomène superparamagnétique.

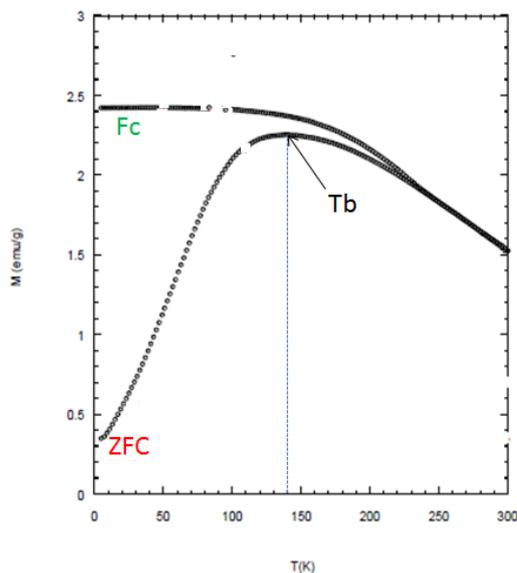


Figure 90 : Aimantation des nanoparticules synthétisées **17** en fonction de T (ZFC – FC)

Les nanoparticules d'oxyde de fer synthétisées sont ferromagnétiques à 5 K avec un faible champ coercitif H_c , se traduisant par une faible ouverture du cycle d'hystérésis. Ces dernières sont, du point de vue magnétique de bonne qualité (matériaux doux) et ne nécessitent pas un champ magnétique externe élevé pour les aimanter. Elles sont donc propices pour une application médicale.

6-3- Mise en évidence du dextrane par spectroscopie IR

La spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier en mode réflexion diffuse (DRIFT) a permis de caractériser la surface des nanoparticules synthétisées. La mise en évidence des différentes fonctions du dextrane, recouvrant la surface des nanoparticules, est particulièrement utile pour la suite du travail, afin de mettre en évidence la fonctionnalisation de ces composés.

Ainsi le spectre IR du composé **17** (figure 91) met en évidence la présence des fonctions caractérisant le dextrane comme la bande à 3359 cm^{-1} qui correspond aux vibrations de valence ν_{OH} et celle à 1646 cm^{-1} aux vibrations de déformation des OH de l'eau encore liée au dextrane.

La bande à 2086 cm^{-1} est caractéristique des vibrations d'élongation des fonctions azides (N_3). Ce résultat confirme la présence des fonctions N_3 sur la surface des nanoparticules et ainsi l'efficacité de la réaction d'azidation.

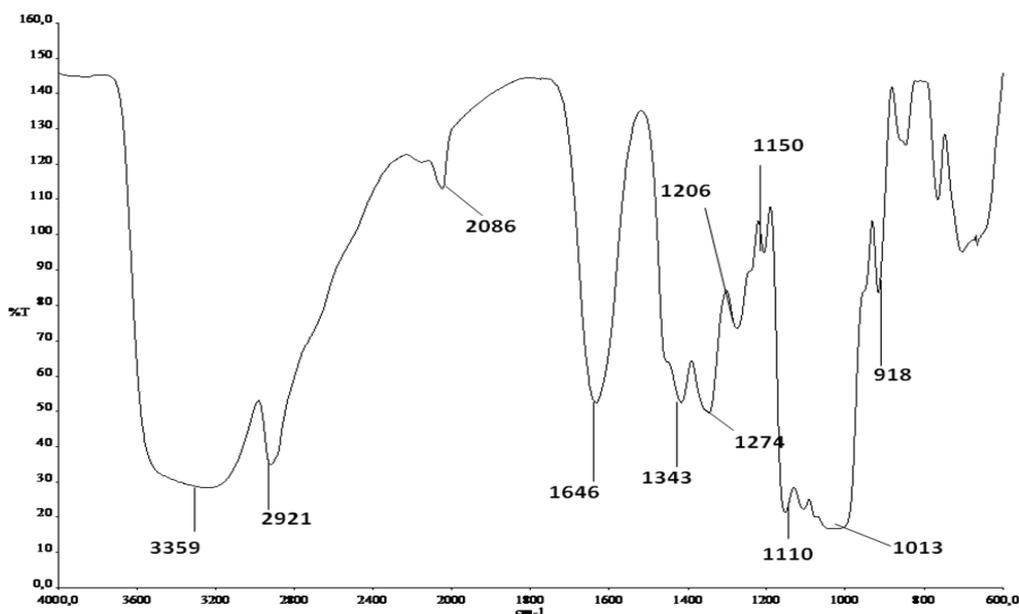


Figure 91 : Spectre IR des nanoparticules azidées 17

6-4- Analyse thermogravimétrique(ATG) des nanoparticules

Afin de déterminer le pourcentage de dextrane chimisorbé à la surface des nanoparticules, nous avons entrepris une analyse ATG sur les nanoparticules synthétisées **15**. Ainsi, nous avons enregistré l'évolution de la masse des nanoparticules au cours d'une remontée en température sous un gaz inerte (Argon). Les pertes de masse observées en ATG correspondent uniquement à la dégradation de la matière organique (le dextrane) (figure 92).

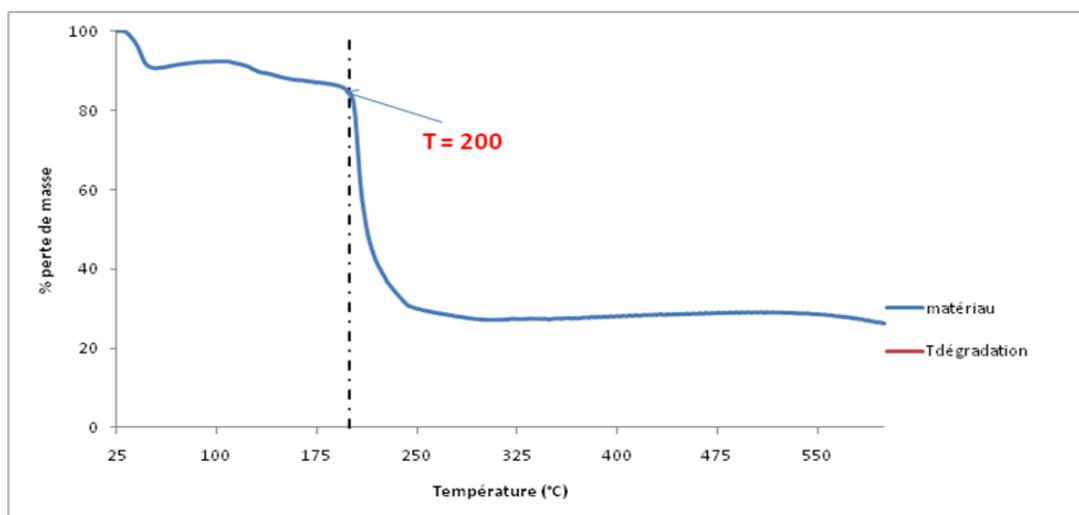


Figure 92 : Courbe d'ATG des nanoparticules stabilisées par du dextrane **15**

La courbe d'ATG présente en effet un premier saut à 40 °C qui correspond à la désorption des molécules d'eau restantes après lyophilisation de l'échantillon. La présence d'une couche organique à la surface des nanoparticules est confirmée par une perte de masse de l'ordre de 74 % entre 200 et 240 °C, et cette perte de masse est attribuée aux dextrans présents à la surface des nanoparticules. Ainsi la masse de dextrane fixée sur les nanoparticules représentent 74 % de la masse totale du composé **15**. Ce pourcentage assez élevée de dextrane explique la très bonne suspension des nanoparticules en solution aqueuse.

6-5- Analyse élémentaire des nanoparticules simples et azoturées

Les résultats de l'analyse élémentaire sur les nanoparticules d'oxyde de fer recouvert de dextrane confirment ceux de l'ATG (75,59 % de dextrane fixée sur les nanoparticules). L'analyse élémentaire nous a permis également de mettre en évidence la présence des fonctions azides sur les nanoparticules **17** (%C = 42,45 %, %H = 6,34 %, %O = 39,14 % et %N = 1,11 %). Nous en déduisons un DS d'environ 0,056 en fonction azoture. Le tableau 12 résume le pourcentage des éléments constituant la matière organique des composés **15** et **17**.

Tableau 12 : Résultats des analyses élémentaires des composés **15** et **17**.

Composés	%C	%H	%O	%N
Nano-dextrane 15	33,15	5,52	36,92	-
Nano-dextrane azidée 17	42,45	6,34	39,14	1,11

Les techniques de caractérisation employées nous ont permis de vérifier que la méthode de synthèse employée donne de manière reproductible des nanoparticules magnétiques avec une faible dispersion en taille et une très bonne stabilité colloïdale. Ces nanoparticules possèdent également des fonctions azides en surface qui permettra par la suite de la fonctionnaliser par la réaction de « Click Chemistry ».

7- Nanoparticules d'oxydes de fer triazolyl porphyriniques

Notre stratégie de fixation des photosensibilisateurs sur les nanoparticules consiste à attacher les précurseurs acétyléniques (porphyrines) avec le précurseur azoturé (nanoparticules) en utilisant la réaction dite de « Click Chemistry » (figure 93).

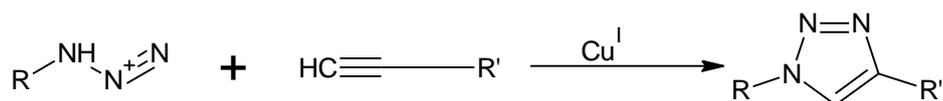


Figure 93 : Réaction générale de « Click Chemistry »

Les applications de la « Click Chemistry » recouvrent de vaste domaine. Elles concernent en outre les sciences de la matière, la chimie macrocyclique, la biochimie et la chimie thérapeutique. Cette dernière utilisation nous a particulièrement intéressée car elle s'applique à la synthèse peptidomimétique, d'oligonucléotides et la chimie des sucres... . En effet, il a été clairement montré que la liaison triazole présente une configuration électronique voisine de la liaison peptidique, par contre elle est beaucoup moins sensible aux hydrolyses enzymatiques qui peuvent se produire *in vivo*.^[183] Néanmoins, il y a des limites à son application médicale. En effet, le catalyseur à base de cuivre nécessaire pour réaliser la réaction peut conduire à des problèmes *in vivo*, tels que des hépatites, des troubles neurologiques, les maladies du rein, et la maladie d'Alzheimer.^[184] De nombreuses étapes de purification sont donc nécessaires afin d'éliminer le maximum du catalyseur présent en solution après conjugaison. Ainsi la concentration en cuivre dans les solutions finales a été mesurée par spectrophotométrie de flamme. Elle est évaluée à environ 17 ppm, ce qui est loin des valeurs maximales tolérées par l'organisme.^[185]

Avant de présenter l'élaboration et la caractérisation des nanoparticules triazolyl porphyriniques, nous proposons de faire une brève mise au point sur cette approche.

7-1- "Click-Chemistry"

La «Click – Chemistry » est un concept en synthèse organique, développé par Sharpless et coll. en 2001.^[186] Cette approche vise la construction des molécules rapidement et aisément à partir des unités organiques fonctionnalisées via des liaisons hétéroatomiques (C-X-C). Les applications de

la « Click-Chemistry », avec plus de 2000 publications parues à ce jour, recouvrent de vastes domaines. ^[187] En effet, elles concernent la chimie thérapeutique, les sciences de la matière, la biochimie, la chimie macrocyclique La notion de « Click-Chemistry » regroupe plusieurs types de transformations chimiques :

- ✓ les réactions d'addition sur les liaisons multiples carbone-carbone, en particulier les réactions d'oxydation telles que l'époxydation, la dihydroxylation, l'aziridination mais aussi certaines réactions d'addition de Michael ;
- ✓ les réactions faisant intervenir la fonction carbonyle (type non aldol) telle que la formation d'urée, de thiourée ou encore d'hétérocycles aromatiques ;
- ✓ les réactions nucléophiles d'ouverture de cycle, en particulier d'hétérocycles électrophiles tendus tels que les époxydes, les aziridines ou encore les ions épisulfoniums ;
- ✓ enfin les cycloadditions d'espèces insaturées (type Diels-Alder) mais surtout les réactions de cycloaddition 1,3-dipolaire.

Parmi toutes les réactions de « Click-Chemistry », la plus efficace est une cycloaddition 1,3-dipolaire de Huisgen, et plus précisément c'est une cycloaddition [3+2] entre un alcyne terminal et un azoture catalysée par le cuivre (I).

7-1-1- Cycloaddition 1,3-dipolaires : cas particuliers des azotures et alcynes

La cycloaddition 1,3 – dipolaire, décrite pour la première fois par Huisgen ^[188], est une méthode qui unit deux réactifs insaturés et conduit de surcroît à une grande variété d'hétérocycles à 5 ou 6 centres. Dans le cadre de notre travail, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à la cycloaddition de Huisgen entre un azoture et un alcyne terminal (figure 94).

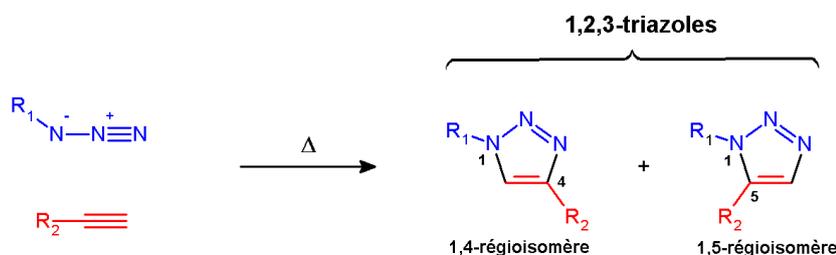


Figure 94 : Cycloaddition 1,3-dipolaire entre un alcyne vrai et un azoture.

Ainsi, par voie thermique et en absence de catalyseur, la cycloaddition [3+2] entre un azoture et un alcyne conduit à la formation d'un mélange de triazoles 1,4 et 1,5-disubstitués. En revanche, l'utilisation du cuivre au degré d'oxydation (I) comme catalyseur augmente la vitesse de la réaction. Dans ces conditions, nous obtenons la formation exclusive du composé 1, 2, 3-triazole 1,4-disubstitué à température ambiante et jusqu'à 10 millions de fois plus vite. Cette réaction est nommée CuAAC (« Copper(I)-catalyzed Azide – Alkyne Cycloaddition ») soit la cycloaddition entre un azoture et un alcyne catalysée par le cuivre (I). Cependant, la source de cuivre (I), permettant de catalyser la réaction de cycloaddition, peut avoir plusieurs origines. Un grand nombre de sels de cuivre au degré d'oxydation 0, I ou II peuvent être utilisés, associés à des solvants organiques ou non. ^[189]

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la réduction *in situ* des sels de cuivre (II), apportés sous forme d'acétate de cuivre. Cette méthode est la plus couramment rencontrée. L'ajout d'un agent réducteur comme l'ascorbate de sodium permet la réduction du cuivre (II) en cuivre (I) qui est l'espèce catalytiquement active. De plus, la tolérance vis-à-vis de la température, sur un large domaine de pH et dans une grande variété de solvants, rendent la réaction plus attrayante.

7-1-2- Point de vue mécanistique

Un premier mécanisme hypothétique a été proposé ^[190] à partir des calculs de chimie théorique (DFT ou *Density Functional Theory*). Ce mécanisme utilise l'eau ou l'acétonitrile comme solvant (figure 95).

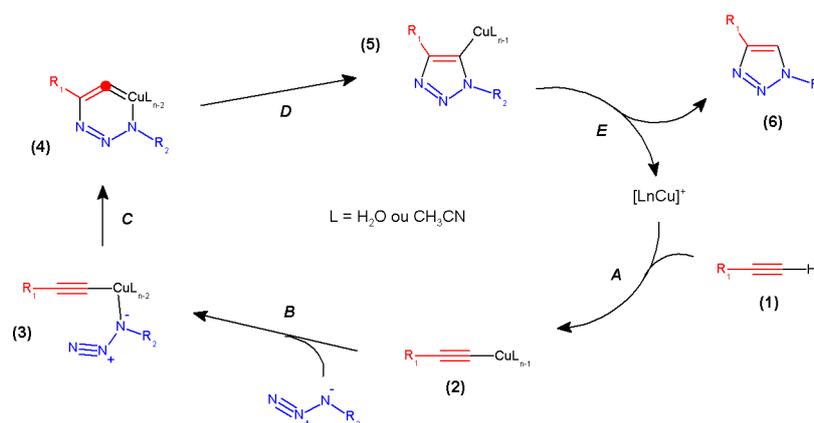


Figure 95 : Premier mécanisme hypothétique de la « Click-Chimie » catalysée par le cuivre ^[190]

Ce mécanisme se décompose en quatre étapes et nécessite des ligands labiles autour de l'atome de cuivre. Dans la première étape **A**, l'alcyne forme un complexe avec le cuivre nommé « Cu-anion

alcynyle (2) par échange de ligand, l'acétylure pouvant être déprotoné par une base. L'azoture remplace ensuite un autre ligand pour donner le complexe (3) dans l'étape **B**. L'azote terminal attaque le carbone C-2 de l'acétylide pour conduire au métallocycle (4) à six chaînons, avec le cuivre au degré d'oxydation (III). Par contraction du métallocycle, le dérivé triazole-cuivre (5) se forme. Enfin la protonation du dérivé triazole-cuivre permet de récupérer le composé triazole 1,4-disubstitué (6) en régénérant le catalyseur cuivreux.

Le profil réactionnel détaillé dans la figure 96, valable pour les solvants eau et acétonitrile, met en évidence les intermédiaires réactionnels et plusieurs états de transition (étapes **C** et **D**) du mécanisme précédent.

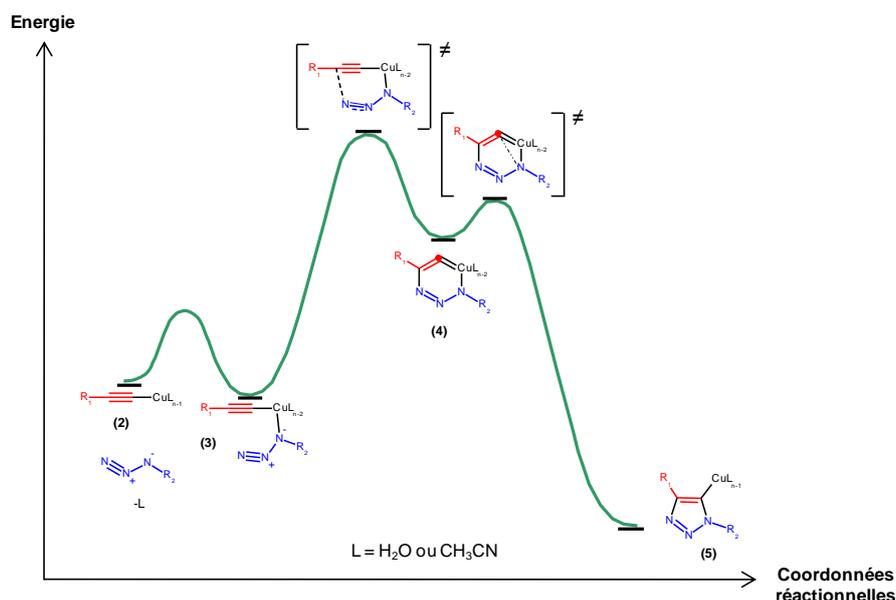


Figure 96 : Diagramme énergétique de la cycloaddition 1,3 catalysée par CuI ^[190]

D'autres mécanismes ont été proposés à partir d'études cinétiques. ^[191] Le plus récent suggère la formation d'un cluster de cuivre, chaque carbone métallique portant sélectivement une unité azoture dans l'état intermédiaire ^[192] (figure 97).

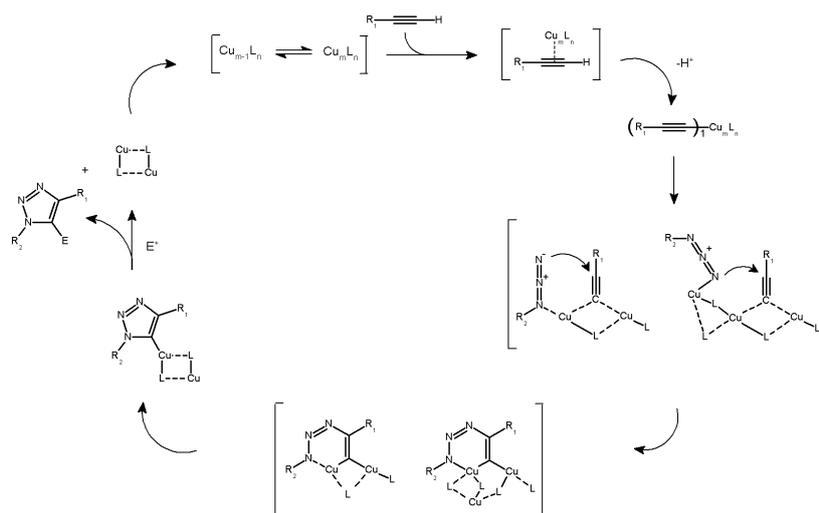


Figure 97 : Mécanisme proposé pour la CuAAC [192]

7-2- Elaboration des nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques

L'élaboration des nanoparticules à motifs porphyriniques à partir des précurseurs propargylés et azidés est présentée sur la figure 98. Le précurseur propargylé **6**, **10** ou **14** est mis en présence d'acétate de cuivre et d'ascorbate de sodium réduisant le cuivre (II) en cuivre (I). La réaction est réalisée dans l'eau en raison de la solubilité des deux substrats (porphyrine et dextrane) en milieux aqueux. Après 24 heures de réaction à température ambiante, le produit est dialysé (seuil de coupure : 6000-8000 Da) afin d'éliminer les sels mais surtout le catalyseur (Cu^I). Les nanoparticules triazolyl porphyriniques **18**, **19** et **20** obtenues après 72 heures de dialyse sont fonctionnalisées respectivement par la porphyrine neutre **6**, anionique **10** et cationique **14**.

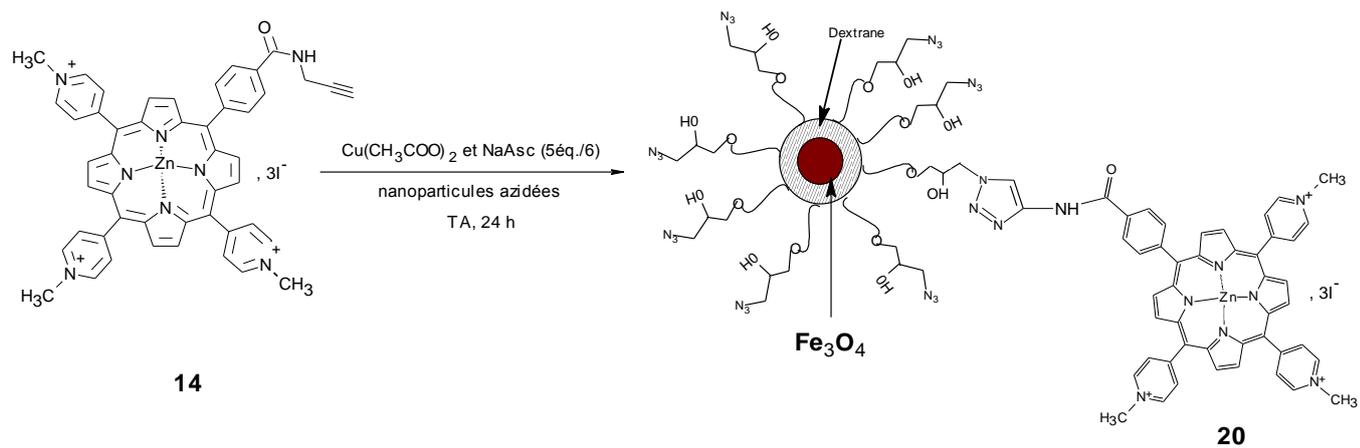
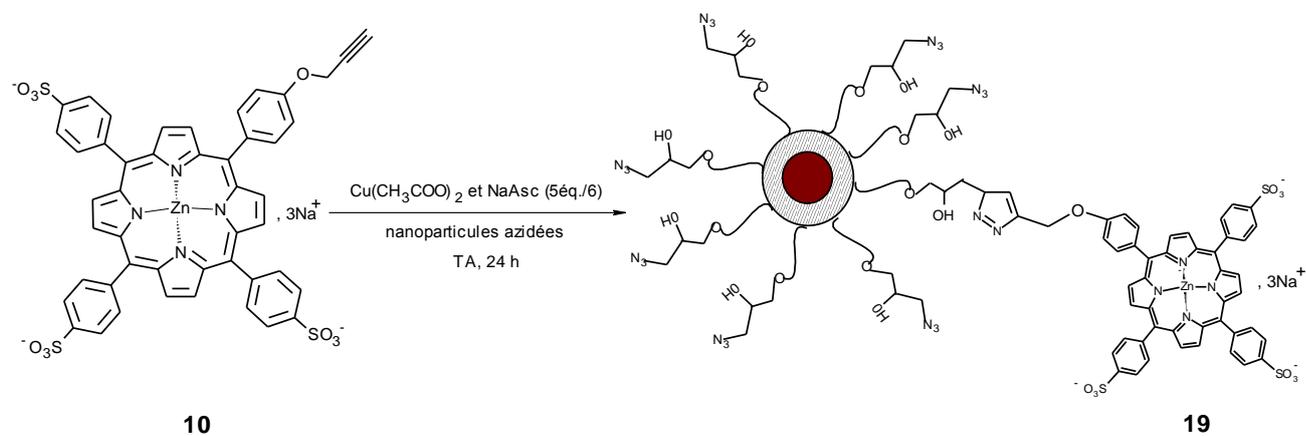
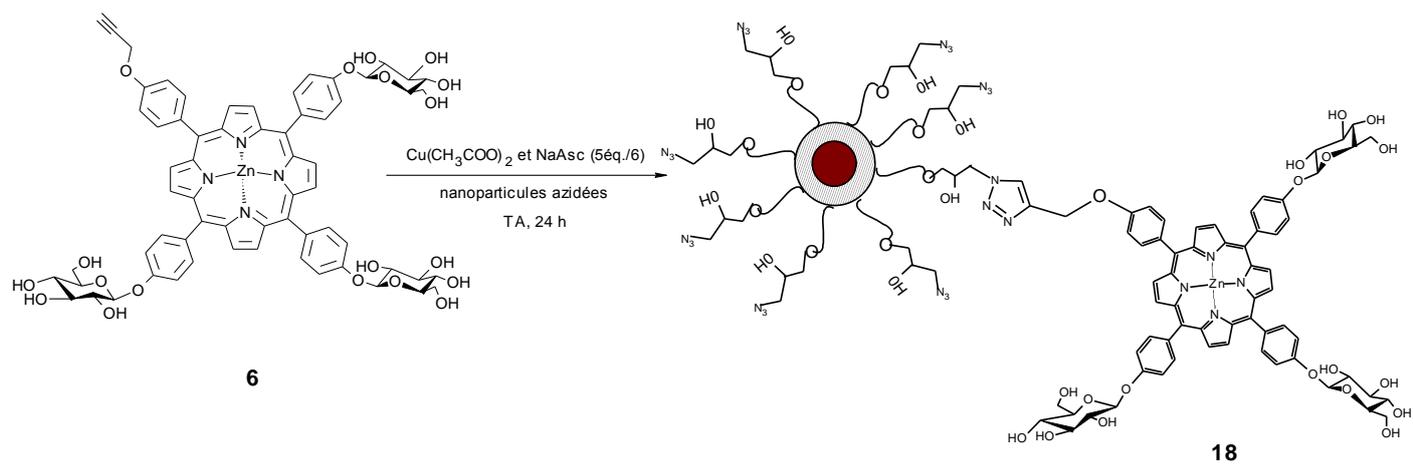


Figure 98 : Elaboration des nanoparticules triazolyl porphyriniques

Le rendement relatif de greffage des porphyrines sur les nanoparticules d'oxyde de fer a été déterminé par spectrophotométrie en mesurant l'absorbance de chaque porphyrine. Les résultats de la quantité d'actif par masse de nanoparticules et du taux de greffage obtenus sont présentés dans le tableau 13.

Tableau 13 : Dosage quantitatif des nanoparticules-porphyrines par UV-Visible

(a) masse des nano azidées : 40 mg (soit 10,45 μmol de N_3)

Porphyrine initiale	Nanoparticules porphyriniques	Bande de Soret (nm)	Quantité initiale en porphyrine	Quantité d'actif fixé (sur les nanoparticule ^a)	Rendements relatif de greffage (%)
6	18	441	8,7 μmol (1,2éc.)	2,09 μmol	24
10	19	423	8,7 μmol (1,2éc.)	4,26 μmol	49
14	20	435	8,7 μmol (1,2éc.)	3,74 μmol	43

Le rendement relatif de greffage des différentes porphyrines sur les nanoparticules d'oxyde de fer varie de 24 à 49 %. Ainsi la quantité d'actif greffé est dépendante de la nature de la porphyrine. Cette différence de rendement peut s'expliquer par la plus faible solubilité dans le milieu réactionnel de la porphyrine glucosylée **6** (24 %) par rapport aux composés anioniques **10** (49 %) et cationiques **14** (43 %).

8- Caractérisation des nanoparticules d'oxydes de fer triazolyl porphyriniques

Les nanoparticules obtenues ont dans un premier temps été caractérisées par spectroscopie IR, UV-Visible et fluorescence afin de mettre en évidence des porphyrines à la surface des nanoparticules et le lien covalent entre le polymère et le photosensibilisateur. Nous avons ensuite évalué les variations des propriétés magnétiques des nanoparticules à la suite des modifications chimiques réalisées à sa surface par MET et à l'aide d'un magnétomètre.

8-1- Spectroscopie IR

Afin de mettre en évidence le caractère covalent de la liaison porphyrine- nanoparticule *via* le dextrane, les spectres IR ont tout d'abord été réalisés (figure 99).

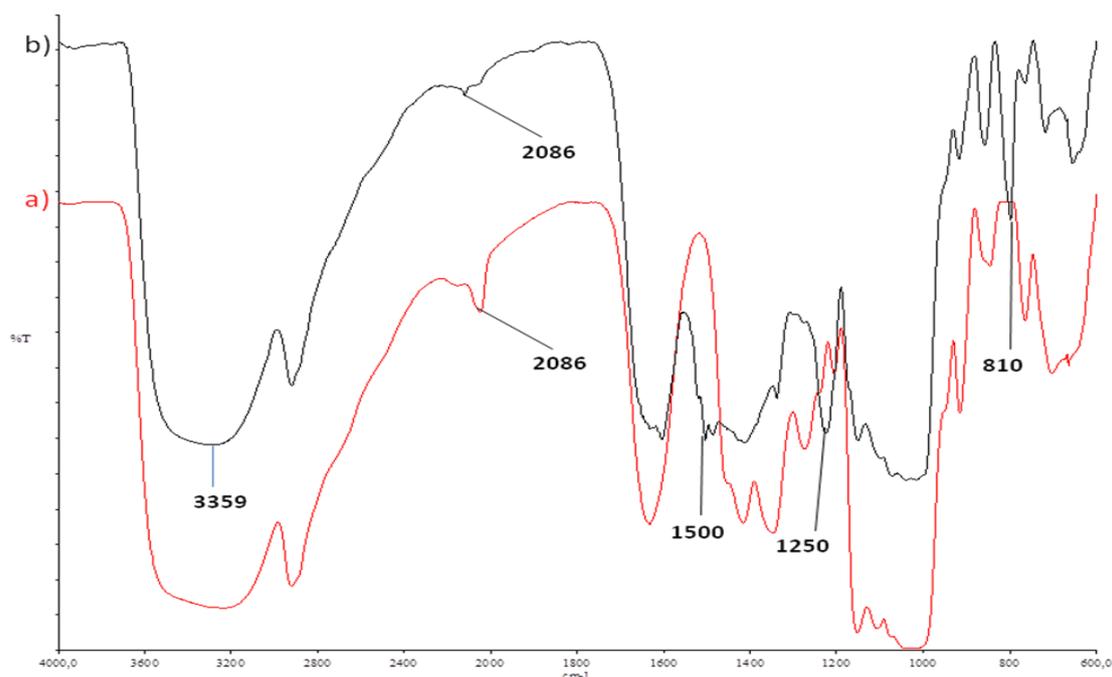


Figure 99 : Spectre IR des nanoparticules azidées **17** (a) et à motifs porphyriniques cationiques **20** (b)

Tous les spectres des nanoparticules « clickées » ont un profil similaire. Ces spectres comportent les bandes du dextrane (3350 cm^{-1} et 1646 cm^{-1}) et celles des porphyrines greffées (1500 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} et 810 cm^{-1}). On note surtout la diminution en intensité du signal à 2086 cm^{-1} (caractéristique des vibrations d'élongation des fonctions azides). Cette diminution permet d'affirmer que toutes les fonctions azides n'ont pas été engagées dans la formation du noyau 1, 2,3-triazole 1,4-disubstitué. Cependant le signal correspondant à la vibration N=N du noyau triazole est difficile à détecter car il est confondu avec les signaux des liaisons C=N porphyriniques ^[193] et des OH due à l'eau liée au dextrane (signal à 1646 cm^{-1}). ^[194]

8-2- Spectroscopie UV-Visible et de fluorescence

La mise en évidence des porphyrines à la surface des nanoparticules a d'abord été réalisée par spectroscopie UV-Visible. L'analyse montre des spectres similaires à ceux des composés **6**, **10** et **14** en solution (figure 100). En effet ces spectres présentent les principaux signaux correspondant aux bandes classiques d'absorption du photosensibilisateur métallé : la bande de Soret dans la zone 420 – 440 nm et les deux bandes Q entre 560 et 610 nm. Ces bandes mettent en évidence la présence du photosensibilisateur sur les nanoparticules. Cependant, nous observons quelques modifications du spectre, tels qu'un élargissement et/ou dédoublement des bandes ainsi que la diminution de leur intensité (figure 100). Cette modification traduit une interaction forte entre le polysaccharide (dextrane) et les photosensibilisateurs (composés **6**, **10** et **14**) en milieu aqueux. [195]

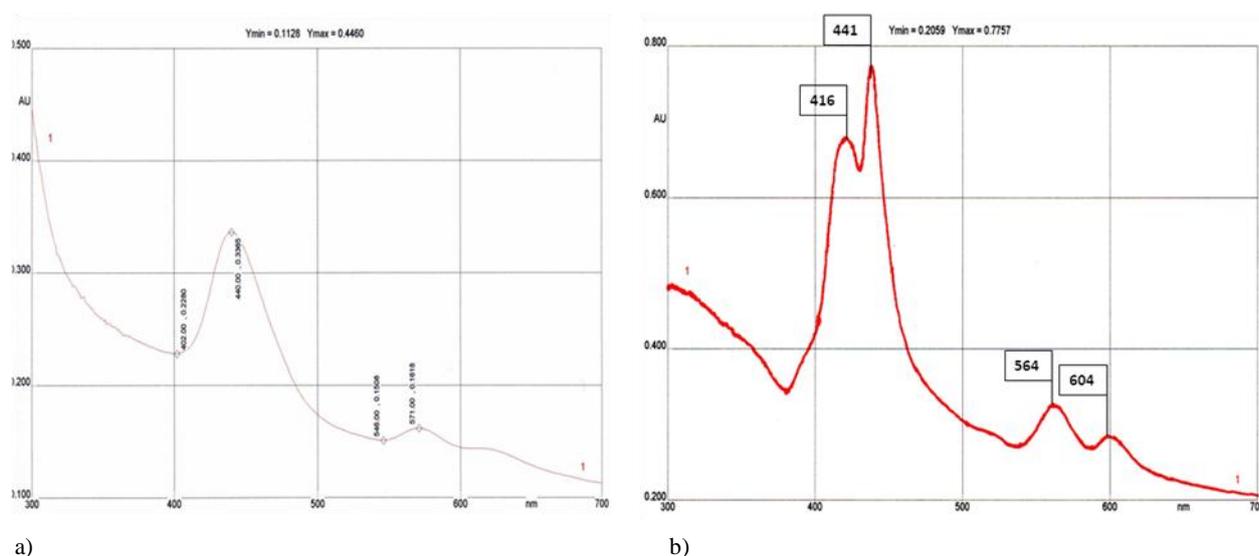


Figure 100 : Spectres UV des nanoparticules à motifs porphyriniques tricationiques **20** (a) et glucosylés **18** (b) concentrées à 10^{-6} M dans l'eau

Les résultats obtenus ont été confirmés par spectrométrie de fluorescence (figure 101). Les spectres d'émission de fluorescence des trois composés **18**, **19** et **20** sont également similaires à ceux des porphyrines de départ. Cependant nous observons une diminution de l'intensité de fluorescence due à la présence des nanoparticules d'oxyde de fer engendrant un phénomène de diffusion de lumière.

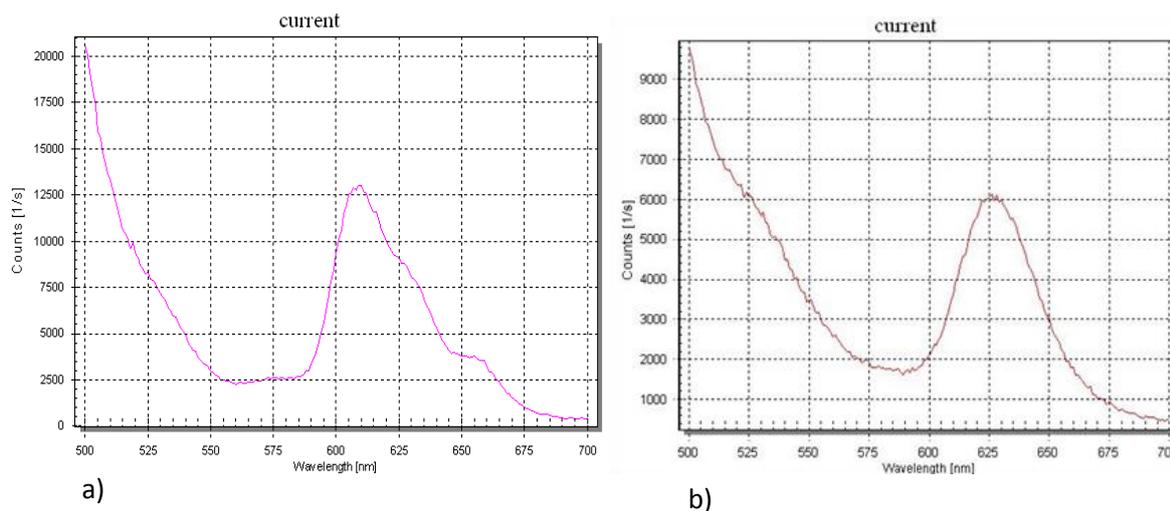


Figure 101 : Spectres de Fluorescence des nanoparticules à motifs porphyriniques glucosylées **18** (a) et cationiques **20** (b) concentrées à 10^{-6} M dans l'eau

Cette figure représente l'émission des composés glucosylés **18** et cationiques **20** respectivement à 605 et 625 nm après une excitation à 441 nm pour les composés glucosylés **18** et à 435 nm pour les cationiques **20**.

8-3- Distribution en taille et morphologie des nanoparticules à motifs porphyriniques

Nous avons observé à l'issue du couplage des porphyrines, la distribution et la morphologie des nanoparticules par MET. La figure 102 illustre, pour un réglage identique de l'appareil, les clichés de MET des trois produits **18,19** et **20** « clickés ». En comparant ces trois clichés à celui obtenu avec les nanoparticules de départ (simples), on n'observe aucune grande différence que ce soit au niveau de la taille ou de la morphologie des nanoparticules. Les particules (non agglomérées) conservent leur forme sphérique et ont un diamètre moyen d'environ 36 nm (figure 103). Le halo observé autour des particules manifeste la présence du dextrane. On peut cependant constater la formation des agrégats due à la présence des motifs porphyrines et dont la taille dépend de la nature du macrocycle. Ces agrégats sont généralement de faible taille (inférieure à 50 nm) pour ce qui concerne les porphyrines glucosylées, et de taille plus grande (de l'ordre de 50 à 100 nm) avec les porphyrines cationiques et anioniques (figure 103).

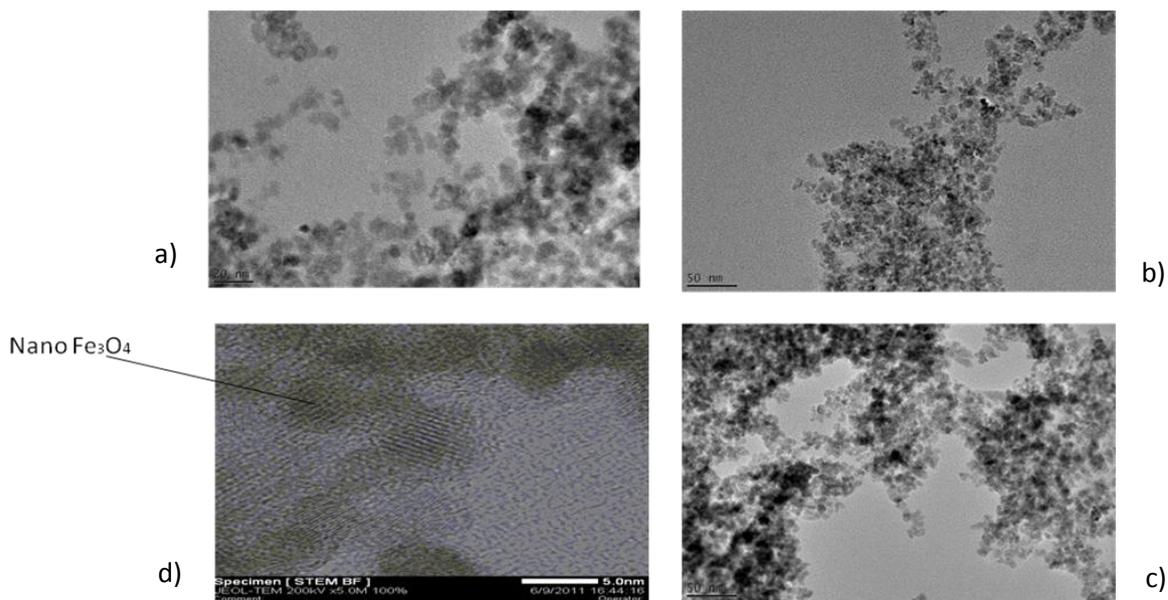


Figure 102 : Clichés MET des nanoparticules à motifs porphyriniques cationiques **20** (a), glucosylés **18** (b) et anioniques **19** (c), image en microscopie à champ large (détection caméra EMCCD) des nanoparticules à motifs cationiques **20** (d)

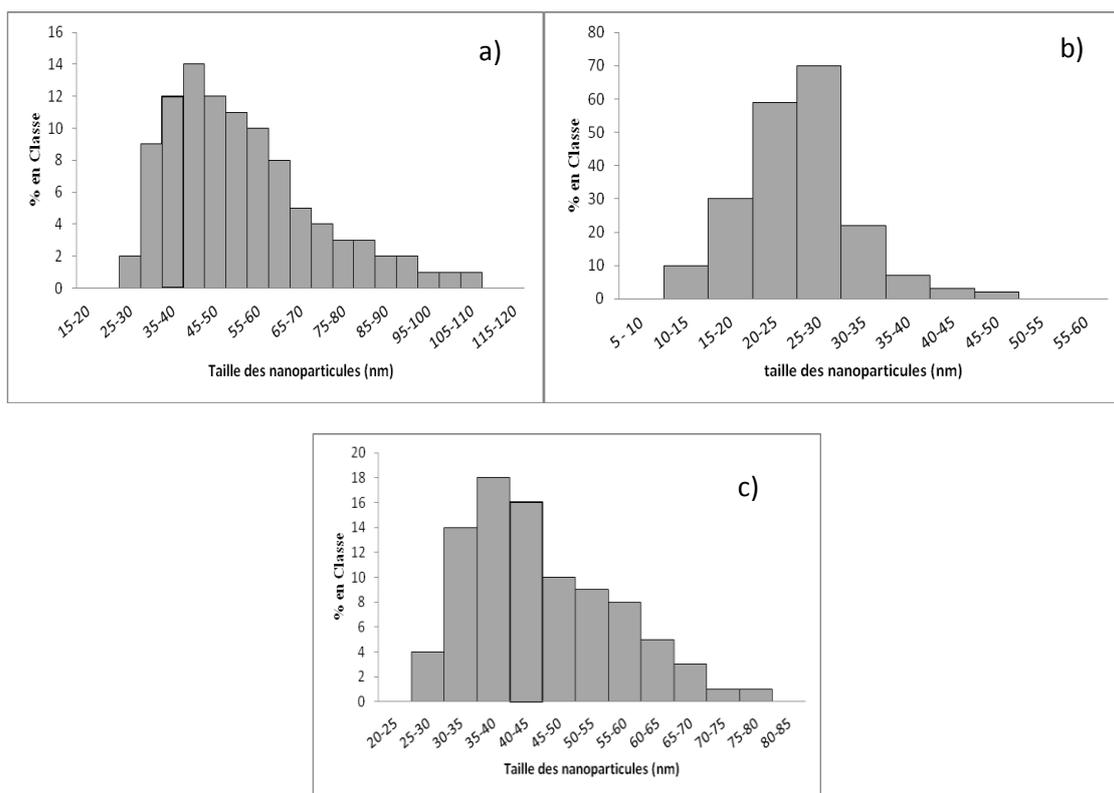


Figure 103: Histogramme en taille des nanoparticules à motifs porphyrines cationiques **20** (a), glucosylées **18** (b) et anioniques **19** (c)

8-4- Propriétés magnétiques des nanoparticules à motifs porphyriniques

Le comportement magnétique des trois composés **18** – **20** a d'abord été évalué en réalisant les courbes d'hystérésis à 5 K et 300 K. On observe ainsi une différence importante des propriétés magnétiques pour chaque composé.

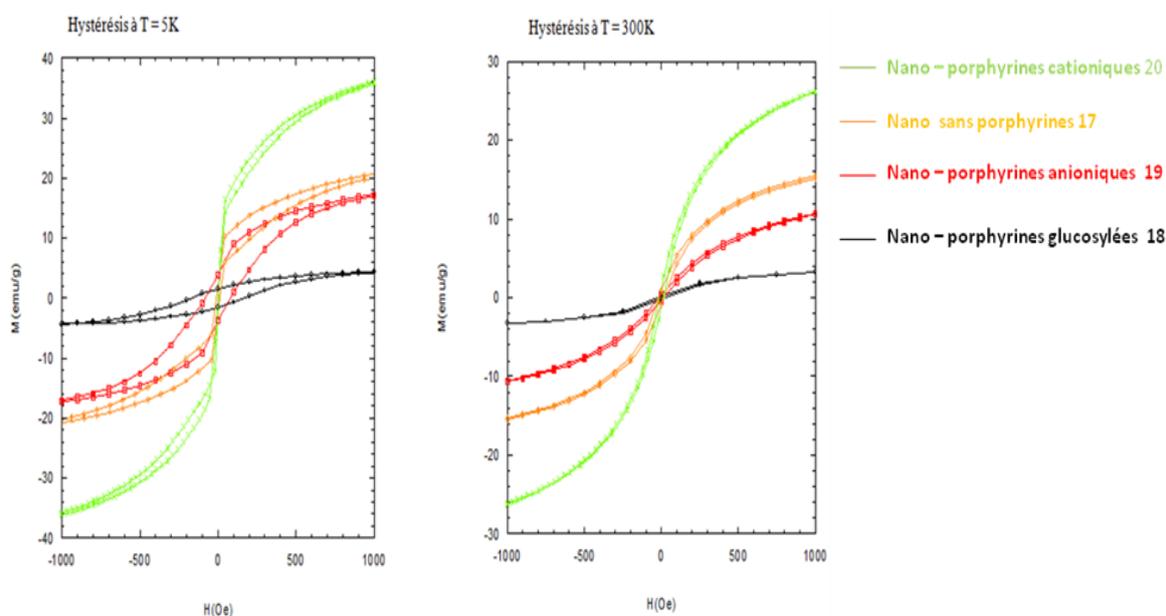


Figure 104 : Hystérésis des nanoparticules sans **17** et avec des motifs porphyriniques synthétisées **18** - **20**

Tous les composés « Clickés » présentent un comportement superparamagnétique à 300 K et un comportement ferromagnétique à 5 K (figure 104). Cependant, ces composés ont des aimantations différentes (tableau 14). Les nanoparticules avec des motifs porphyrines cationiques ont une aimantation plus importante ($M_s=36$ emu/g à 5 K) que les nanoparticules de départ (sans porphyrines). Les deux autres composés **18** et **19** ont quant à eux une aimantation inférieure aux nanoparticules simples. Ces résultats sont liés aux effets d'interactions magnétiques interparticulaires, plus élevées dans le cas de particules plus agrégées (de diamètre plus importante). Ce phénomène d'agrégation est plus observé avec les nanoparticules à motifs porphyrines cationiques (figure 102). Nous observons, comme dans le cas des nanoparticules simples, que les systèmes saturent moins vite à 300 K (26 emu/composé cationique **20**). En effet l'élévation de la température nécessite à contrecarrer en plus l'énergie d'activation thermique (kT).

Le magnétisme des composés **18** - **20** a ensuite été étudié par des mesures de « zero field cold » (ZFC) et « field cold » (FC). Ces courbes de ZFC et FC sont représentés sur la figure 105.

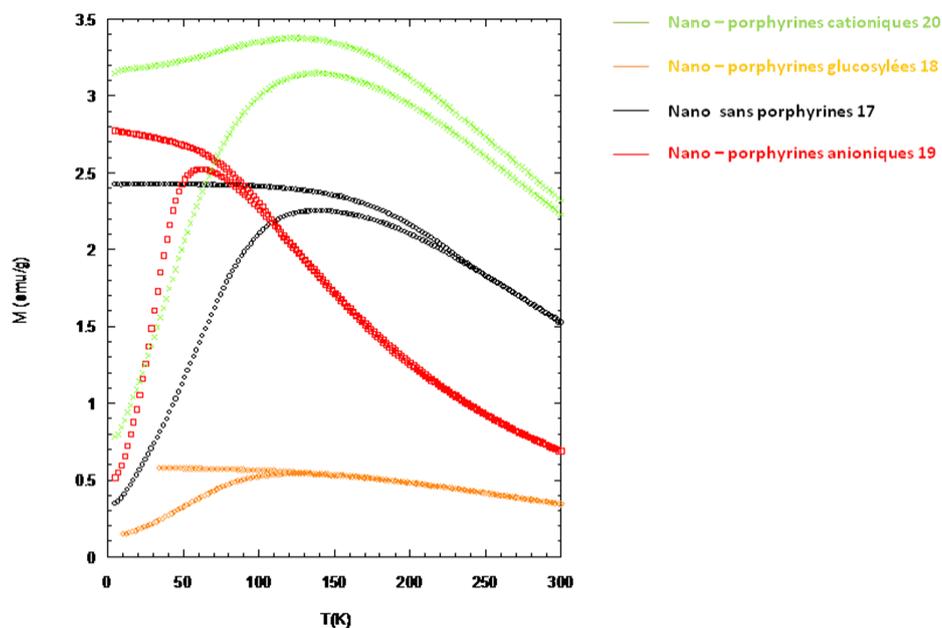


Figure 105: Aimantation des nanoparticules avec et sans motifs porphyriniques synthétisées en fonction de T (ZFC – FC)

L'analyse des courbes a permis de déterminer les températures de blocage des différents composés synthétisés. Les moments magnétiques des nanoparticules simples **17** et à motifs porphyrines cationiques **20** sont débloqués à la même température ($T_b = 140$ K). Cette valeur maximale (tableau 14) est en accord avec la distribution en tailles des nanoparticules observées par MET (figure 102). En effet l'élévation de la température de blocage est attribuée, comme précédemment aux interactions magnétiques plus importantes dans le cas des particules plus agrégées, à l'exception des nanoparticules-porphyrines trisulfonées qui ont une $T_b = 50$ K. Le tableau ci-dessous résume toutes les valeurs d'aimantation, de températures de blocage et de diamètres obtenues.

Tableau 14 : Valeurs des aimantations, des T_b et diamètres des composés synthétisés

Nanoparticules	M (emu/g) à 5K	T_b (K)	d (nm)
17	24	140	22,4
18	2	100	27,5
19	18	50	38
20	36	140	43

Toutes ces nanoparticules sont superparamagnétiques à 25°C. Compte tenu des résultats obtenus, ce sont les nanoparticules à motif porphyrines cationiques qui présentent des propriétés magnétiques plus intéressantes pour une application comme agent de contraste en IRM et de vectorisation des médicaments. En effet elles sont susceptibles de répondre rapidement au champ magnétique externe puis à se redisperser une fois le champ magnétique externe retiré. Ces nanoparticules ainsi synthétisées, dépassant 7 nm, peuvent également produire un échauffement important et être utilisées en hyperthermie des cancers.

Ces différents photosensibilisateurs greffés sur des nanoparticules d'oxyde de fer ont été élaborés dans le but de pouvoir mettre en évidence une relation structure activité lors de l'évaluation de l'activité anti cancéreuse de chaque produit afin de déterminer la structure du photosensibilisateur le plus efficace en PDT anti tumorale.

Chapitre III Nanoparticules

superparamagnétiques substituées par des
motifs porphyrines - Polyéthylèneimine

1- Introduction

Dans cette seconde partie, nous avons fixé sur les nanoparticules à motifs porphyriniques des polymères polycationiques afin d'améliorer l'internalisation cellulaire des nanoparticules. Ces composés sont connus pour interagir facilement avec la membrane externe des cellules (charge globale négative), aboutissant à un transfert actif des nanoparticules [196]. Notre choix s'est orienté vers la polyéthylèneimine (PEI) qui est un polymère fortement cationique et classiquement utilisé en transfection. [197] La stratégie a consisté à greffer d'abord la polyéthylèneimine en raison du faible DS obtenue (0,056/UAG), et ensuite les photosensibilisateurs sur les nanoparticules azidées en utilisant la méthode de « Click Chemistry ». Cette méthodologie a nécessité, lors d'une première étape, l'activation chimique de la PEI (propargylation). Le schéma général est présenté sur la figure 106.

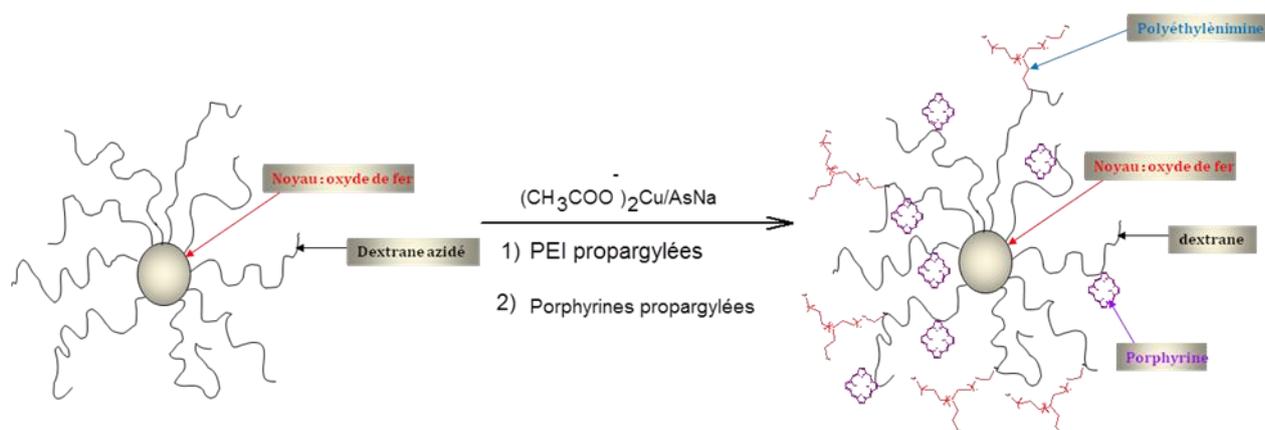


Figure 106 : Schéma général de l'élaboration des nanoparticules d'oxyde de fer à motifs porphyriniques et PEI

2- Stratégie de synthèse

Comme précédemment, nous avons utilisé la réaction de « Click-Chemistry » pour l'élaboration des nanoparticules d'oxyde de fer avec des motifs porphyrines et PEI. L'utilisation de la « Click Chemistry » a nécessité au préalable la préparation de la PEI acétyléniques **21**. Elle est ensuite fixée sur les nanoparticules azidées **17**. Enfin lors de la dernière étape les porphyrines **6**, **10** et **14** préalablement préparées au chapitre précédent sont fixées le complexe nanoparticules/PEI.

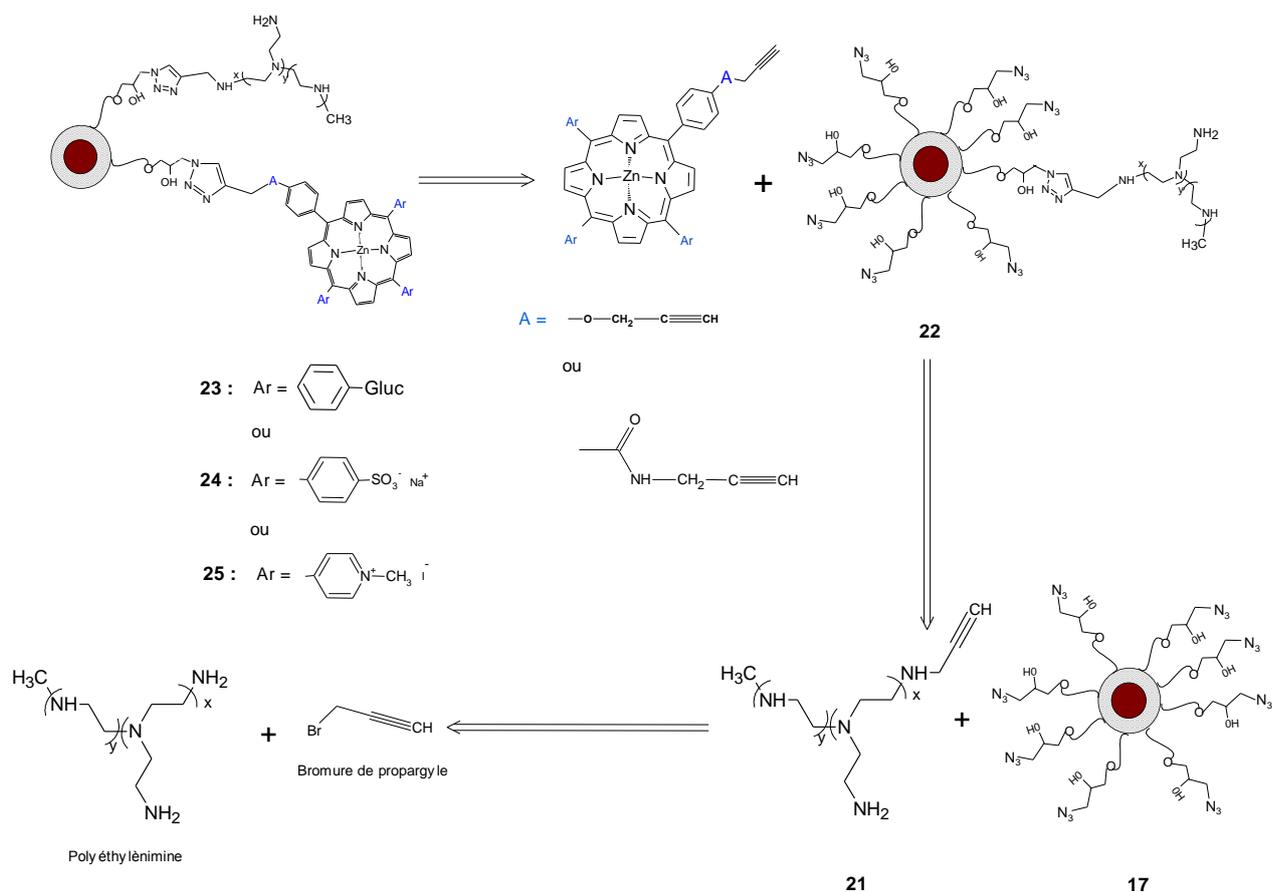


Figure 107 : Schéma de rétrosynthétique des nanoparticules d'oxyde de fer avec des motifs porphyrines et PEI

3- Nanoparticules d'oxyde de fer à motif polyéthylèneimine

Avant de présenter l'élaboration et la caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer à motif polyéthylèneimine, nous proposons une brève mise au point bibliographique de la PEI et ses applications.

3-1- Polyéthylèneimine

La polyéthylèneimine (PEI) est un homopolymère cationique qui existe sous forme linéaire ou branchée (figure 108). Ce polymère est une polyamine qui passe de 20 à 45% de protonation entre pH 7 et pH 5 respectivement. Il présente une forte densité de charge cationique. En effet un atome sur 3 est un atome d'azote qui peut être protoné. Comme la PEI ne contient pas d'amine quaternaire, les charges sont générées par protonation des groupements amine en milieu physiologique. Ainsi il peut

s'associer à l'ADN par des interactions électrostatiques multiples, ce qui génère des particules appelées polyplexes.

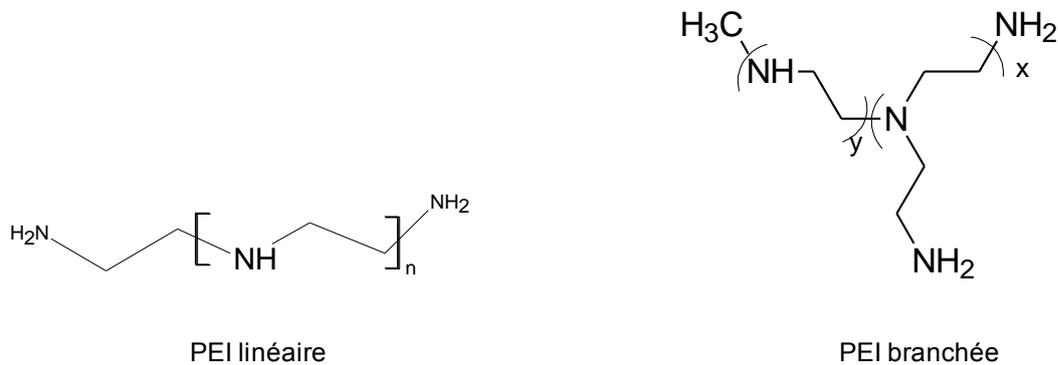


Figure 108 : Structures des PEI branchées et linéaires

La PEI est dotée d'un pouvoir endosomolytique grâce son effet « éponge à protons ». Cette propriété lui permet de libérer le polyplexe dans le cytoplasme sans que l'ADN soit dégradé par les enzymes lysosomales, et fait de lui un bon vecteur non viral pour le transfert des molécules. Les PEIs existent sous une grande diversité de poids moléculaire allant de 5 à $1,6 \cdot 10^3$ kDa. Cependant les PEIs utilisés dans le cadre de la transfection ont un poids moléculaire généralement compris entre 5 et 25 kDa. En effet les poids moléculaires plus importants présentent une plus forte cytotoxicité. ^[198] L'efficacité de transfert est variable d'une lignée cellulaire à une autre. Le rendement du vecteur dépend de plusieurs paramètres dont il faut tenir compte afin d'obtenir une efficacité optimale. Pour obtenir un transfert efficace, la charge globale entre la PEI et la molécule d'intérêt doit être positive pour favoriser l'interaction avec la membrane cellulaire chargée négativement. Un des paramètres à prendre en charge lors de l'utilisation de la PEI est le nombre de charges positives qui correspond au nombre de fonctions amines de la PEI.

Le problème majeur rencontré par la PEI en milieu physiologique est l'inhibition de la transfection par le sérum. ^[199] De ce fait, des modifications ont été réalisées à la surface de la PEI telle que la PEGylation. En effet le copolymère PEI-PEG crée à la surface une hydrophilie qui réduit les interactions avec des protéines plasmatiques. D'autres groupes ont également modifié la fonction amine de la PEI afin d'améliorer l'efficacité de transfection. Par exemple Wang et coll. ^[200] ont montré une diminution de la toxicité et une augmentation de l'efficacité de transfection avec le cholestérol conjugué à la PEI 1000 Da sur les cellules Jurkat-T.

Enfin la PEI peut être associée à d'autres molécules (glucose, protéines, lipides), afin d'augmenter sa spécificité cellulaire. Ainsi les meilleurs résultats de transfert ont été obtenus avec de la PEI linéaire tétraglucosylée sur une lignée de carcinome du pharynx. ^[201]

3-2- Propargylation de la Polyéthylèneimine

Cette réaction consiste à faire réagir selon un mécanisme de type SN2, de la PEI 600 en présence de bromure de propargyle dans le DMF (figure 109).

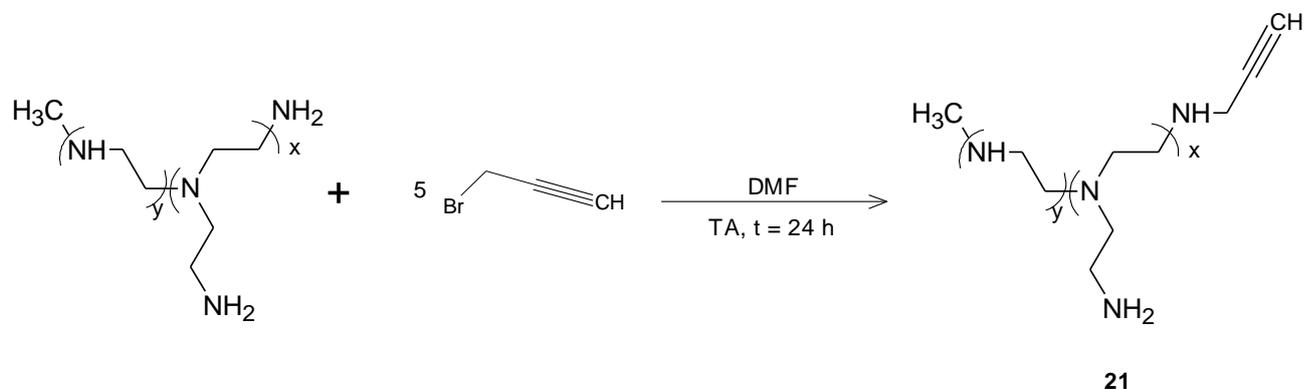


Figure 109 : Fixation d'un alcyne vrai sur la PEI 600 par une SN2

Ainsi nous avons mis de la PEI de 600 Da ramifiée (soit $n' = 0,02$ unités aminées) en présence du bromure de propargyle (soit $n = 5 \times n'$) dans une solution de DMF. Après 24 heures de réaction à température ambiante, le produit précipite dans l'éthanol. Le produit **21**, après filtration et recristallisation, est obtenu avec un rendement de 74%. Le produit obtenu a été ensuite caractérisé par spectroscopie IR et par RMN ^1H .

3-3- Elaboration des nanoparticules d'oxyde de fer à motif Polyéthylèneimine

Le résultat de la cycloaddition entre la PEI acétylénique **21** et la nanoparticule azidée **17** est représenté sur la figure ci-dessous (figure 110).

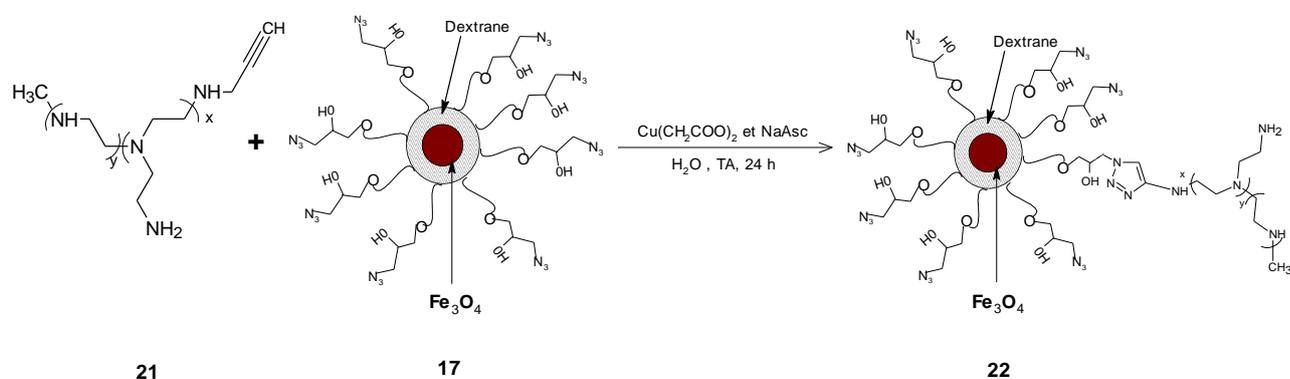


Figure 110: Cycloaddition 1,3-dipolaire entre la PEI 21 et les nanoparticules 17

A température ambiante les nanoparticules azidées **17**, l'acétate de cuivre et l'ascorbate de sodium (2 éq. /mol du composé **21**) sont ajoutés à une solution de PEI 600 acétylénique **21** dans l'eau. Après 24 heures de réaction, le milieu réaction est dialysé (seuil de coupure de 6000 – 8000 Da). Enfin le composé obtenu **22** est lyophilisé puis caractérisé par IR afin de mettre en évidence la formation du cycle triazole.

3-4- Caractérisation de la PEI propargylée et des nanoparticules d'oxyde de fer à motif PEI

Le caractère covalent de la liaison nanoparticules d'oxyde de fer – PEI par l'intermédiaire du noyau triazole, est mis en évidence par la spectroscopie IR (figure 111).

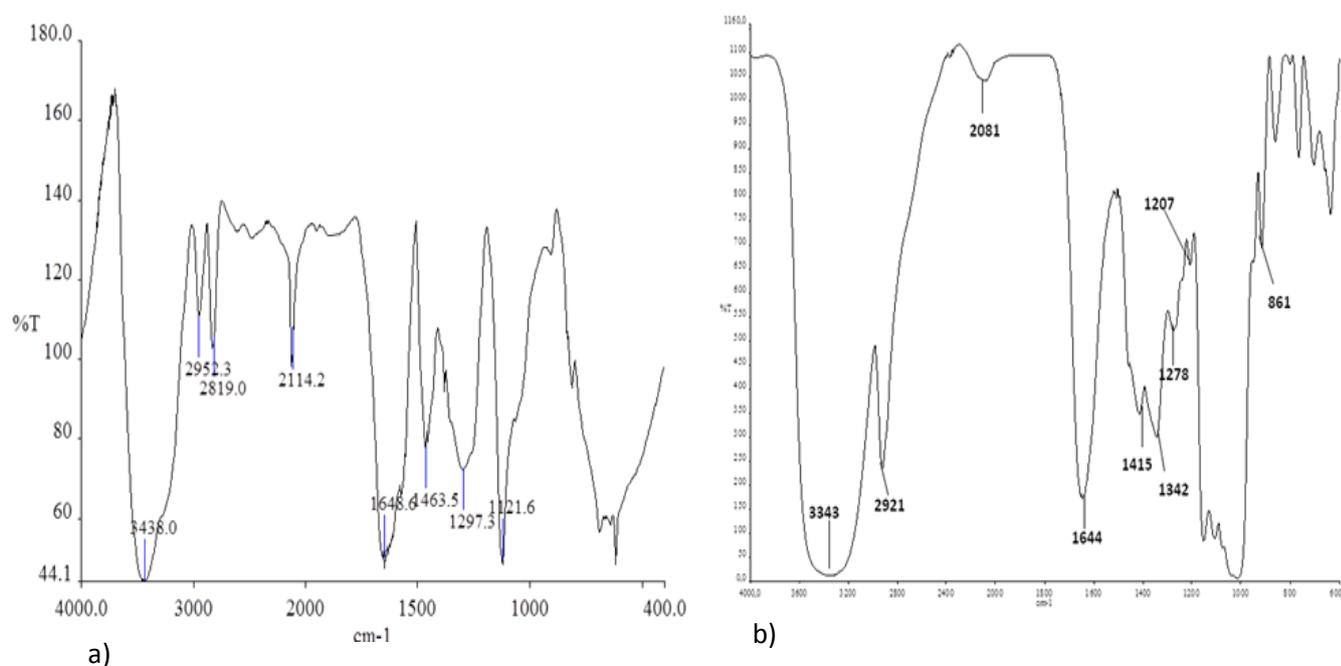


Figure 111 : Spectre IR de la PEI 600 propargylée (a) et des nano-PEI600 (b)

Le spectre de la PEI propargylée (a) fait apparaître les signaux classiques des polyamines ; 3438 cm⁻¹ (vibration d'élongation ν_{NH}), 2952 et 2819 cm⁻¹ (vibrations d'élongations ν_{CH_2} et ν_{CH}), 1648 cm⁻¹ (vibration de déformation ν_{NH}), 1463 cm⁻¹ (vibrations de déformation ν_{CH_2} et ν_{CH_3}), enfin les bandes 1297 et 1121 cm⁻¹ (vibration d'élongation $\nu_{\text{C-N}}$). Sur ce spectre, nous observons le signal à 2114 cm⁻¹ ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}}$) qui caractérise bien la fonction propargyle fixée sur la PEI. La présence de ce signal confirme la propargylation de la PEI par du bromure de propargyle. Le spectre RMN ¹H présente par contre un élargissement des pics qui est du à la présence de plusieurs produits et de la fixation de la

fonction propargyle aussi bien sur les amines I et II. Néanmoins nous observons la résonance des protons propargyliques à 5,2 ppm sous la forme d'un singulet pour le proton acétylénique $\equiv\text{C-H}$ et à 3, 26 ppm sous la forme d'un singulet pour les protons CH_2 . Cette fonction propargyle va nous permettre de fixer la PEI sur les nanoparticules par la réaction de « Click Chemistry ».

Le couplage covalent entre les nanoparticules d'oxyde de fer et la PEI 600 propargylée est caractérisé par la présence sur le spectre IR (b) des vibrations qui correspondent au dextrane. En effet nous observons le signal à 3343 cm^{-1} (vibration de valence ν_{OH}), 2921 cm^{-1} (vibration de valence ν_{CH}), 1342 cm^{-1} (vibration de déformation ν_{CH_2}), 1278 cm^{-1} et 1207 cm^{-1} (vibration d'élongation $\nu_{\text{C-O}}$). Le signal à 1415 cm^{-1} , absent sur le spectre du dextrane, correspond aux vibrations de déformation ν_{CH_2} et ν_{CH_3} de la PEI fixée. La disparition du signal à 2114 cm^{-1} permet d'affirmer que toutes les fonctions propargyles de la PEI ont été engagées dans la formation du noyau 1, 2, 3-triazole 1,4 – disubstitué. Le signal correspondant à la vibration N=N du noyau triazole est confondu dans le signal des OH de l'eau liée au dextrane. Néanmoins le signal à 2081 cm^{-1} confirme qu'il reste encore sur la surface du dextrane des fonctions azotures disponibles. Ces fonctions N_3 restantes pourront ainsi être utilisées pour fixer d'autres composés (porphyrines dans notre cas) à la surface des nanoparticules.

Ces résultats, disparition du signal à 2114 cm^{-1} et présence des bandes caractéristiques du dextrane, permettent d'affirmer l'existence du lien covalent entre les nanoparticules et la PEI 600.

4- Elaboration des nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques à motifs PEI 600

4-1- Synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques à motifs PEI 600

Les nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques à motifs PEI 600 ont été élaborées en utilisant la réaction de « Click Chemistry » (figure 112). La procédure est pratiquement identique que celle décrite précédemment. En effet, le précurseur propargylé **6**, **10** ou **14** est mis en présence d'acétate de cuivre et d'ascorbate de sodium dans une solution aqueuse. Les nanoparticules préalablement « clickées » à la PEI 600 sont, par la suite introduites dans le milieu réactionnel. Après 24 heures de réaction à température ambiante, le produit est dialysé (seuil de coupure : 6000-8000 Da) afin d'éliminer les catalyseurs (l'acétate de cuivre et l'ascorbate de sodium), mais aussi les porphyrines non greffées sur les nanoparticules. Nous obtenons les nanoparticules d'oxyde de fer à motifs PEI 600 fonctionnalisées par des porphyrines neutres **23**, anioniques **24**, cationiques **25** qui sont toutes solubles dans l'eau.

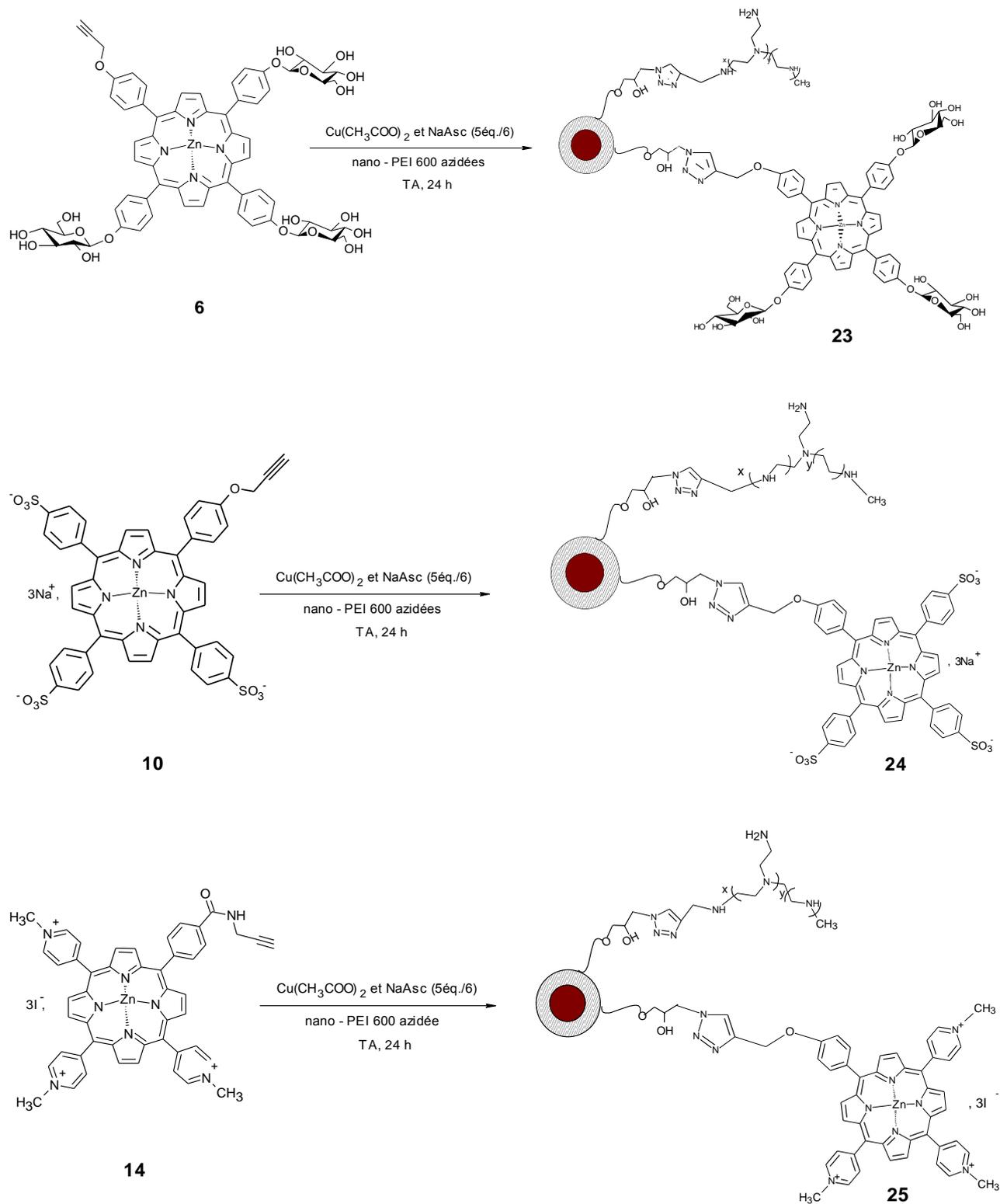


Figure 112 : Elaboration des nanoparticules triazolyl porphyriniques à motifs PEI 600

Nous avons ensuite déterminé le rendement relatif de greffage des porphyrines sur les nanoparticules-PEI 600 par spectroscopie UV-Visible (tableau 15). Pour cela, nous avons mesuré l'absorbance de la bande de Soret respective du photosensibilisateur comme précédemment.

Tableau 15 : Dosage quantitatif des nano-PEI porphyrines par UV-Visible

(a) masse des nano azidées : 40 mg (soit 10,45 μmol de N_3)

Porphyrine initiale	Nano-PEI 600 porphyriniques	Bande de Soret (nm)	Quantité initiale En porphyrine	Quantité d'actif (sur les nano ^a)	Rendements relatifs de greffage (%)
6	23	441	8,7 μmol (1,2 éq.)	1,57 μmol	18
10	24	423	8,7 μmol (1,2 éq.)	2,96 μmol	34
14	25	435	8,7 μmol (1,2 éq.)	2,78 μmol	32

Par rapport aux valeurs précédentes (Nano – porphyrines), les rendements de greffage sont légèrement inférieurs. Ceci peut s'expliquer par la fixation préalable de la PEI 600 sur les nanoparticules diminuant ainsi le nombre des fonctions azotures disponibles en surface. Néanmoins, comme précédemment les meilleurs rendements sont toujours obtenus avec les porphyrines anioniques (34%) et cationiques (32%) qui sont très solubles dans le milieu réactionnel.

4-2- Caractérisation des nanoparticules d'oxyde de fer triazolyl porphyriniques à motifs PEI 600

La mise en évidence des porphyrines sur les nanoparticules d'oxyde de fer à motifs PEI 600 a été réalisée dans un premier temps par spectroscopie IR. Cette méthode caractérise le lien covalent créé entre les porphyrines et les nano-PEI 600. Nous avons ensuite vérifié les propriétés photosensibilisatrices des produits synthétisés **23**, **24** et **25** par UV-Visible et fluorescence.

4-2-1- Spectroscopie IR

Les spectres IR des composés **23**, **24** et **25** sont dans l'ensemble similaires, elles présentent toute des bandes caractéristiques du dextrane (figure 113). En effet nous pouvons observer le signal à 3343 cm^{-1} (vibration de valence ν_{OH}), 2921 cm^{-1} (vibration de valence ν_{CH}) et 1644 cm^{-1} (vibration ν_{OH} des hydroxyles de l'eau liée au dextrane).

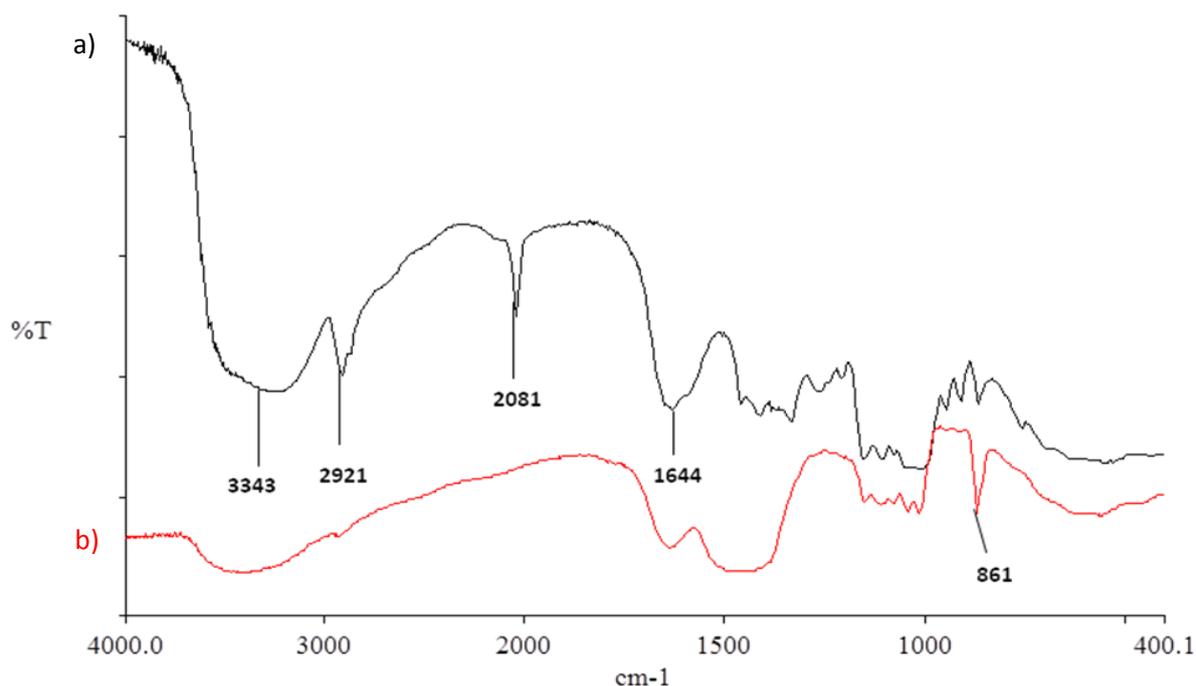


Figure 113 : Spectre IR des nano – PEI 600 (a), nano – PEI 600 porphyrines **23** (b)

Comme dans le cas des nano – PEI, la caractérisation du greffage covalent est mise en évidence par le signal à 2081 cm^{-1} des vibrations asymétriques des N_3 . Nous observons la disparition complète de ce signal à 2081 cm^{-1} après la réaction de « Click Chemistry ». Ceci permet d’affirmer que toutes les fonctions azides restantes ont été engagées dans la formation du noyau 1, 2, 3 – triazole 1,4 - disubstitué. Nous avons, à l’issue de la réaction de « Click-Chemistry », création du lien covalent entre les porphyrines et les nano-PEI 600. L’utilisation complète des fonctions azotures lors de la « Click Chemistry » et la détermination par UV des porphyrines greffées sur les nanoparticules ont permis de déduire la quantité de PEI 600 fixées (tableau 16).

Tableau 16 : Quantité des porphyrines et de PEI 600 greffées sur les nanoparticules

Nano-PEI 600 Porphyriniques	Quantité initiale en N_3	Quantité de porphyrines fixées	Quantité de PEI 600 fixées
23	10,45 μmol	1,57 μmol	8,88 μmol
24	10,45 μmol	2,96 μmol	7,49 μmol
25	10,45 μmol	2,78 μmol	7,67 μmol

C’est sur les nanoparticules à motifs porphyrines glucosylées que nous avons un grand nombre de PEI 600 fixées. Les nanoparticules à motifs porphyrines cationiques et anioniques ont sensiblement le

même nombre de PEI 600 fixées. D'une manière générale nous avons le même rapport porphyrines/PEI dans le cas des composés **24** et **25**, seule le composé **23** présente un rapport porphyrines/PEI plus faible. Cependant ce rapport porphyrines/PEI peut être modifié en fonction des résultats biologiques obtenus.

4-2-2- Spectroscopie UV-Visible et de fluorescence

Les spectres UV-Visibles des composés **23**, **24** et **25** sont conformes respectivement à ceux des porphyrines **6**, **11** et **14** en solution dans l'eau. Les principaux signaux correspondant à l'absorption du photosensibilisateur ont été obtenus ; la bande de Soret dans la zone 420 – 450 nm et les deux bandes Q (forme métallée) entre 510 et 650 nm. La figure 114 à titre d'exemple représente les résultats obtenus dans le cas du composé **23**.

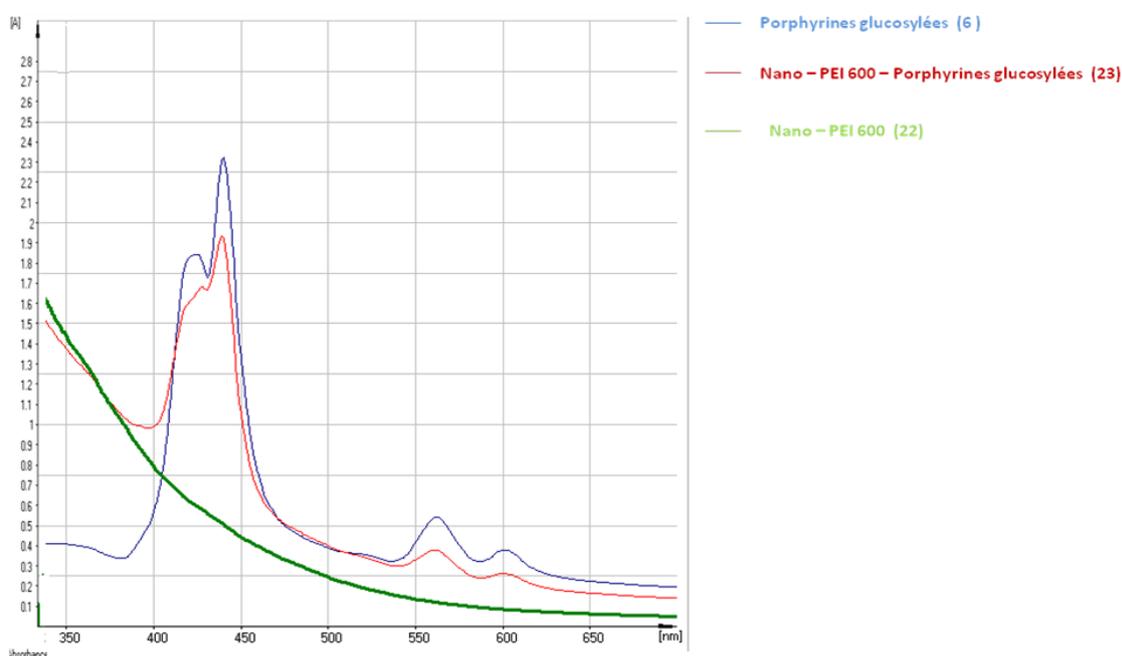


Figure 114 : Spectres UV –Visible des nano-PEI 600 (**22**), nano-PEI 600 porphyrines glucosylées (**23**) et porphyrines glucosylées (**6**)

Sur cette figure, nous pouvons observer le spectre des nanoparticules –PEI 600 - porphyrines glucosylées (spectre b) qui se superpose typiquement à celui de la porphyrine glucosylée de référence (spectre c). Le spectre des nano – PEI 600 présente une courbe régulière due à une absorbance plus importante dans la région UV des nanoparticules d'oxyde de fer. En effet, on observe également une légère déviation de la ligne de base sur le spectre (b) qui est liée à la présence des nanoparticules d'oxyde fer dans ce composé **23**. Ces résultats mettent en évidence la présence des porphyrines sur la surface des nanoparticules d'oxyde de fer à motifs PEI 600.

Nous avons ensuite étudié les propriétés fluorescentes des composés **23**, **24** et **25** synthétisés. Les propriétés fluorescentes de ces composés sont également similaires aux porphyrines simples. En effet ils émettent aux mêmes longueurs d'onde que les porphyrines hydrosolubles de départ. Néanmoins nous observons dans tous les cas une diminution de l'intensité de fluorescence. Ceci s'explique par l'absorption d'une partie de la lumière émise par les nanoparticules d'oxyde de fer. Cette absorption réduit ainsi l'intensité de la lumière émise aux photosensibilisateurs qui ne reçoivent plus qu'une partie de cette lumière.

La figure 115 représente le spectre de fluorescence obtenu dans le cas des nano-PEI 600 porphyrines glucosylées.

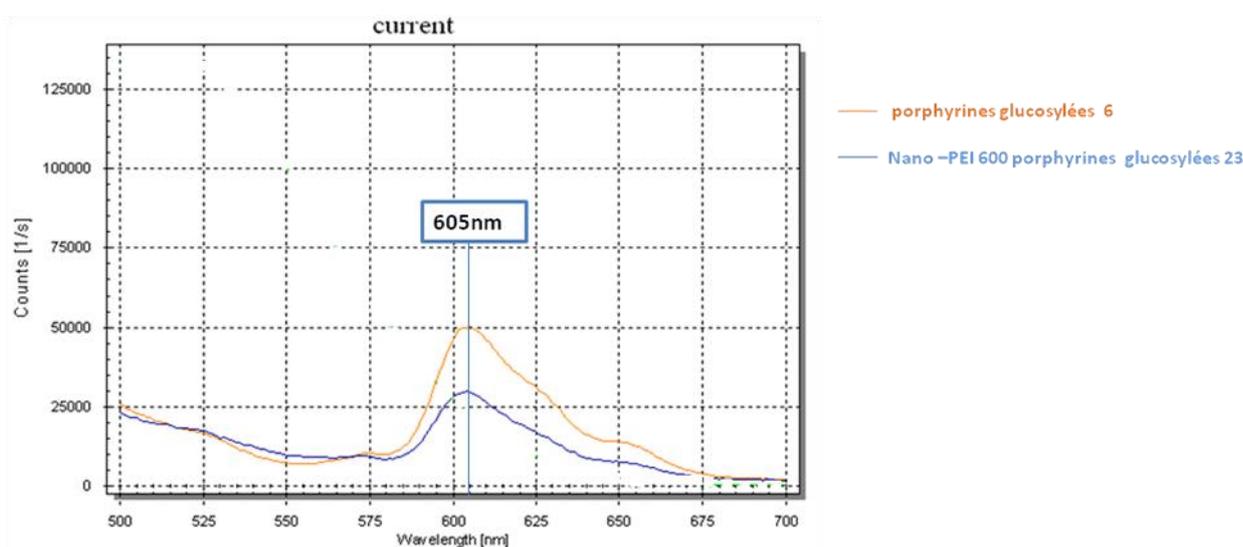


Figure 115 : Spectres de fluorescence des porphyrines glucosylées **6**, des nano-PEI avec porphyrines glucosylées **23**

Des nouveaux photosensibilisateurs magnétiques portant des agents internalisant (PEI 600) ont pu être élaborés par réaction de « Click-Chemistry ». Malgré le rendement de greffage en photosensibilisateurs relativement faible, l'efficacité d'une telle stratégie a pu être mise en évidence par les analyses IR, UV et fluorescence.

Ces nouveaux photosensibilisateurs magnétiques à motifs PEI 600 (composés **23**, **24** et **25**) ont été élaborés dans le but d'évaluer leurs activités anticancéreuses en PDT et de les comparer avec ceux obtenus précédemment (nanoparticules-porphyrines : composés **18**, **19** et **20**).

Chapitre IV Evaluation biologique des
photosensibilisateurs en PDT anti -
cancéreux

A la suite de la synthèse des nouveaux photosensibilisateurs, nous nous sommes attachés à mesurer la capacité de photosensibilisateurs à produire de l'oxygène singulet qui est l'agent toxique principal exploité en photothérapie dynamique (PDT). De ce fait, l'effet photocytotoxique des complexes nanoparticules/porphyrines a été évalué sur la lignée d'origine kératinocytaire humaine Hacat. La lignée Hacat représente un bon modèle *in vitro* d'un tissu accessible pour la PDT.

1- Production d'oxygène singulet

L'aptitude des composés **6**, **10**, **14**, **18**, **19** et **20** à produire de l'oxygène singulet a été réalisée par la mesure de son rendement quantique $\Phi (^1O_2)$, par le Docteur Céline Frochot (DCPR, UMR CNRS 7630 à Nancy). Après une excitation à 415 nm des photosensibilisateurs à l'aide d'une lampe Xénon à arc, la luminescence de l'oxygène singulet est mesurée à 1270 nm. Les rendements quantiques en oxygène singulet ont été déterminés dans l'éthanol, en utilisant le Rose de Bengale comme référence. ^[202] Les résultats du rendement quantique en oxygène singulet des porphyrines greffées ainsi que non greffées sur les nanoparticules sont représentés dans le tableau ci-dessous (tableau 17).

Tableau 17 : Rendement quantique en oxygène singulet.

<i>Composés</i>	$\Phi (^1O_2)$
6	0,84
10	0,53
14	0,73
18	0,20
19	0,56
20	0,73
Rose de Bengale	0,69

Tous les composés testés produisent de l'oxygène singulet. Les valeurs du rendement quantique en oxygène singulet obtenues avec les porphyrines non greffées (composés neutre **6** et cationique **14**) sont supérieures à la valeur de référence obtenue pour le Rose de Bengale, sauf pour le composé

anionique **10**. Dans les cas des porphyrines greffées sur les nanoparticules (**18** et **19**), les valeurs de rendement quantique en oxygène singulet sont similaires à ceux des porphyrines non greffées (**10** et **14**). La présence du polymère (dextrane) influence très peu les mesures de DO de ces produits. Par exemple les nanoparticules-porphyrines cationiques conservent une production en oxygène singulet supérieure au Rose Bengale (figure 116). Les nanoparticules- porphyrines glucosylées (**18**) ont par contre une très forte diminution de leur production en oxygène singulet comparé à ceux non greffés (**6**), qui peut être lié à la légère agrégation de ces nanoparticules lors des mesures.

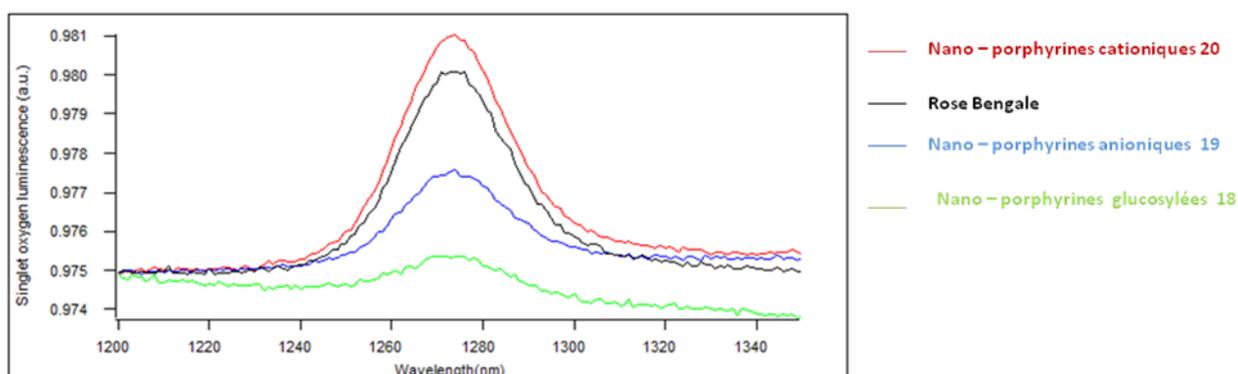


Figure 116 : Mesures de luminescence en $^1\text{O}_2$ des nano - porphyrines

2- Photocytotoxicité des molécules synthétisées

Nous avons réalisé une étude préliminaire de la photocytotoxicité des complexes porphyrines portant ou pas la PEI (polyéthylèneimine).

La liste des molécules est représentée ci-dessous (tableau 18).

Tableau 18 : Liste des molécules utilisées.

Porphyrines	Type de greffage	Nom de l'actif
cationiques	-	14
cationiques	Nanoparticules magnétiques	20
cationiques	Nanoparticules magnétiques + PEI600	25
anioniques	-	10
anioniques	Nanoparticules magnétiques	19
anioniques	Nanoparticules magnétiques + PEI600	24
neutres	-	6
neutres	Nanoparticules magnétiques	18
neutres	Nanoparticules magnétiques + PEI600	23

La toxicité des porphyrines a été évaluée selon le protocole décrit dans la partie expérimentale, puis comparée à celle obtenue avec le Photofrin®, utilisé comme référence positive dans notre étude. De ce fait, nous avons utilisé une lignée cellulaire de kératinocytes humains, les cellules Hacat. Ces cellules ont été irradiées en présence d'une lumière visible (à une fluence de 25 J/cm² fournie par une lampe de 18W).

Une dose-réponse nous a permis de déterminer graphiquement une valeur IC₅₀ relative pour chacun des actifs testés. Ces doses-réponse sont présentées par l'activité déshydrogénase résiduelle (DO moyenne des cellules traitées / DO moyenne des cellules contrôles x 100) en fonction de la concentration des actifs représentée en échelle logarithmique.

Les résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

2-1- Etude de la cytotoxicité intrinsèque des molécules

Pour évaluer la cytotoxicité intrinsèque des porphyrines testées, nous avons incubé les photosensibilisateurs à des concentrations de 0 à 1000 nM sans réaliser d'irradiation des cellules.

Dans la gamme de concentration testée, nous observons une légère cytotoxicité sans irradiation, hormis à 1000 nM (figure 117, figure 118, figure 119). Cependant, la viabilité cellulaire des cellules Hacat reste supérieure à 80%, quelque soient les photosensibilisateurs utilisés.

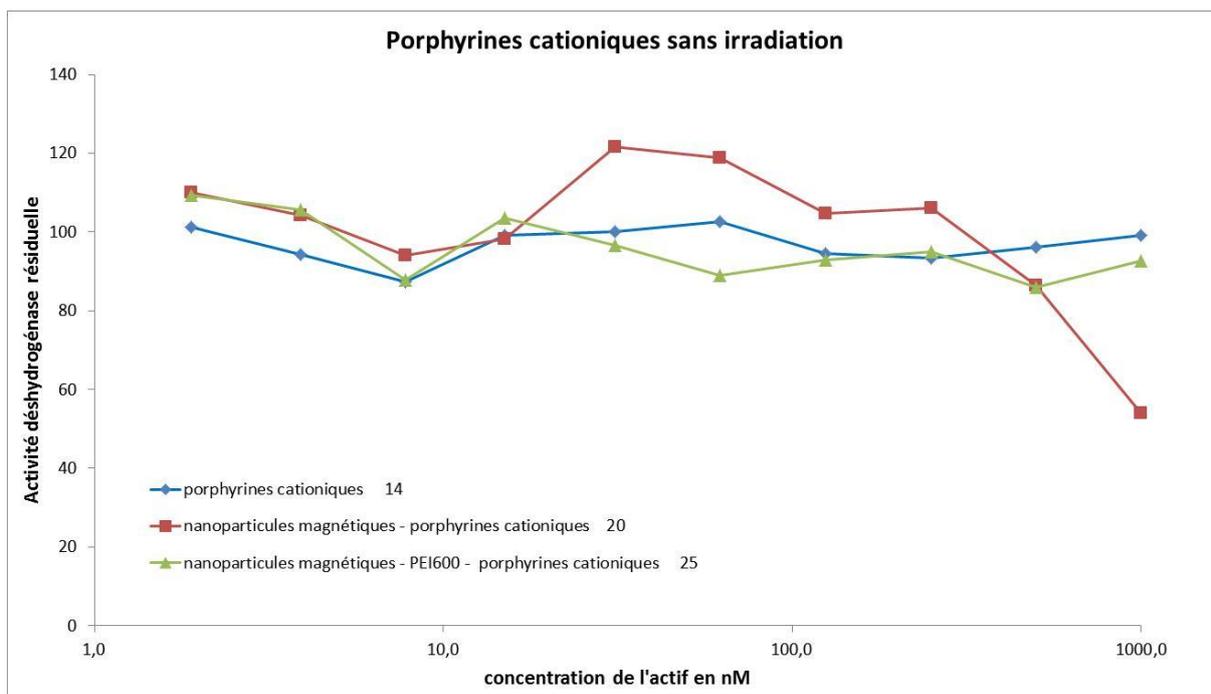


Figure 117 : Cytotoxicité intrinsèque des porphyrines cationiques sur la lignée Hacat

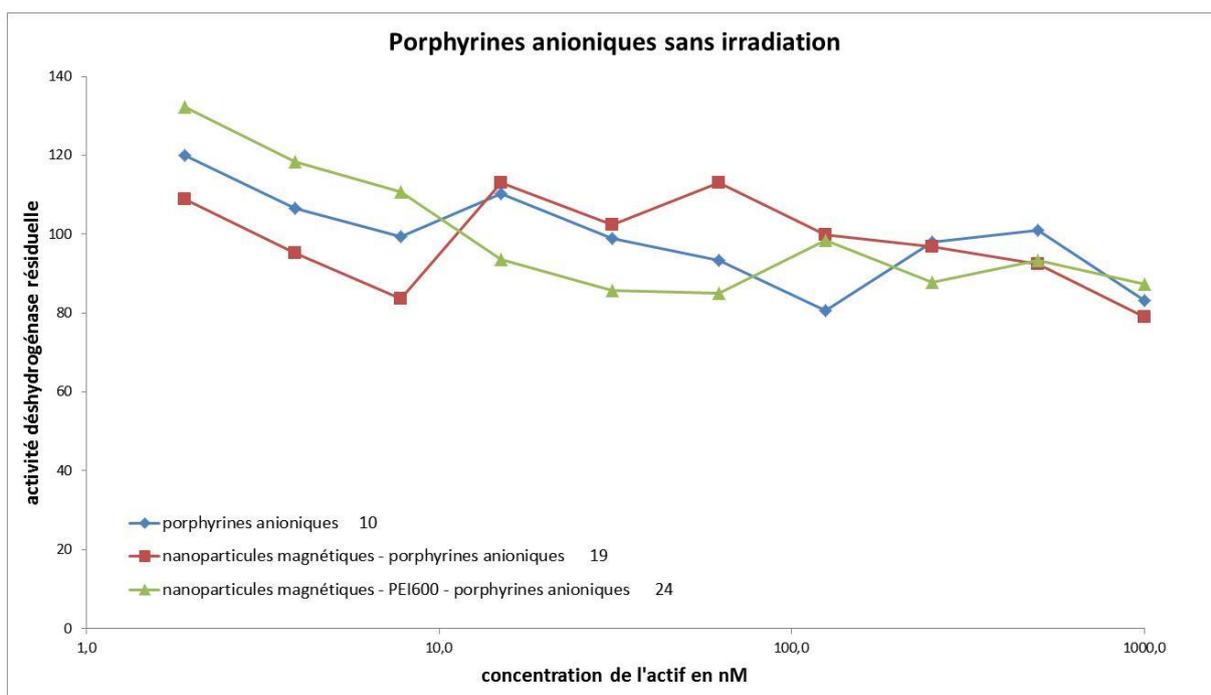


Figure 118: Cytotoxicité intrinsèque des porphyrines anioniques sur la lignée Hacat

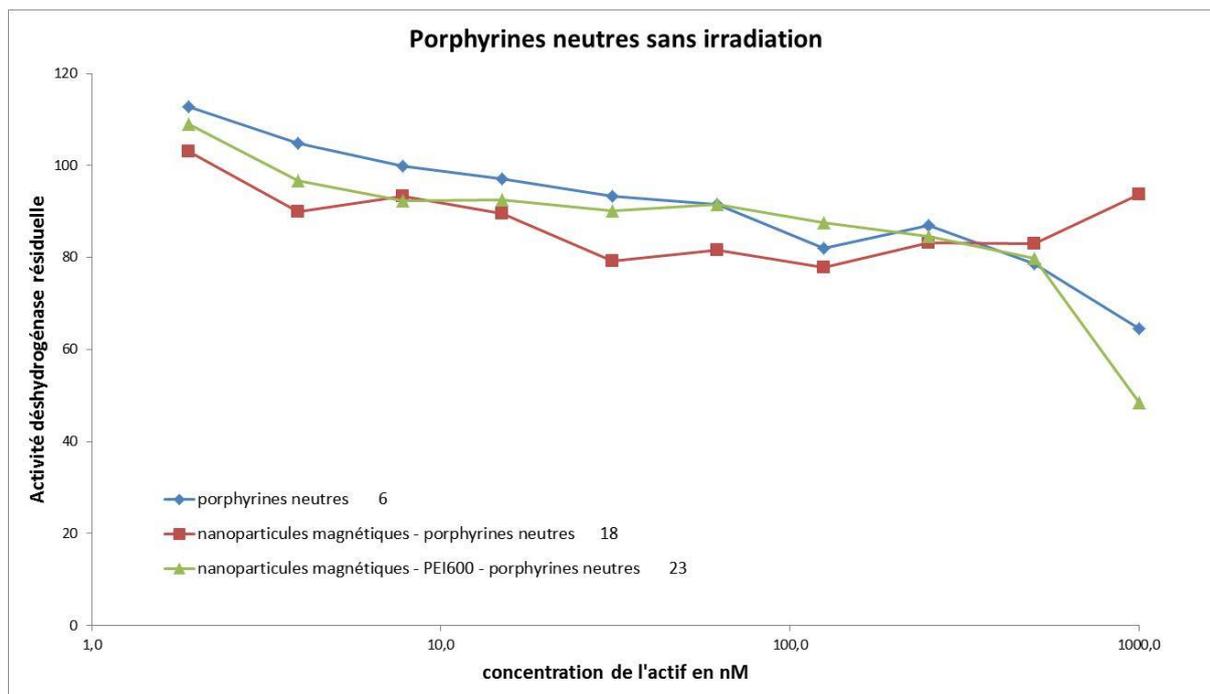


Figure 119 : Cytotoxicité intrinsèque des porphyrines neutres sur la lignée Haca

2-2- Le Photofrin®

Comme mentionné dans la partie expérimentale, le Photofrin® est utilisé comme référence dans l'évaluation biologique *in vitro* des photosensibilisateurs. Ce dernier induit une cytotoxicité sans irradiation avec un pourcentage de viabilité global supérieur à 70% (figure 120). Après irradiation à une fluence de 25J/cm² pendant 2h sous une lumière visible, nous constatons une diminution de l'activité déshydrogénase résultant d'une diminution de la viabilité cellulaire. Ce résultat confirme la photocytotoxicité du Photofrin® avec une valeur d'IC50 relative de 20,8nM.

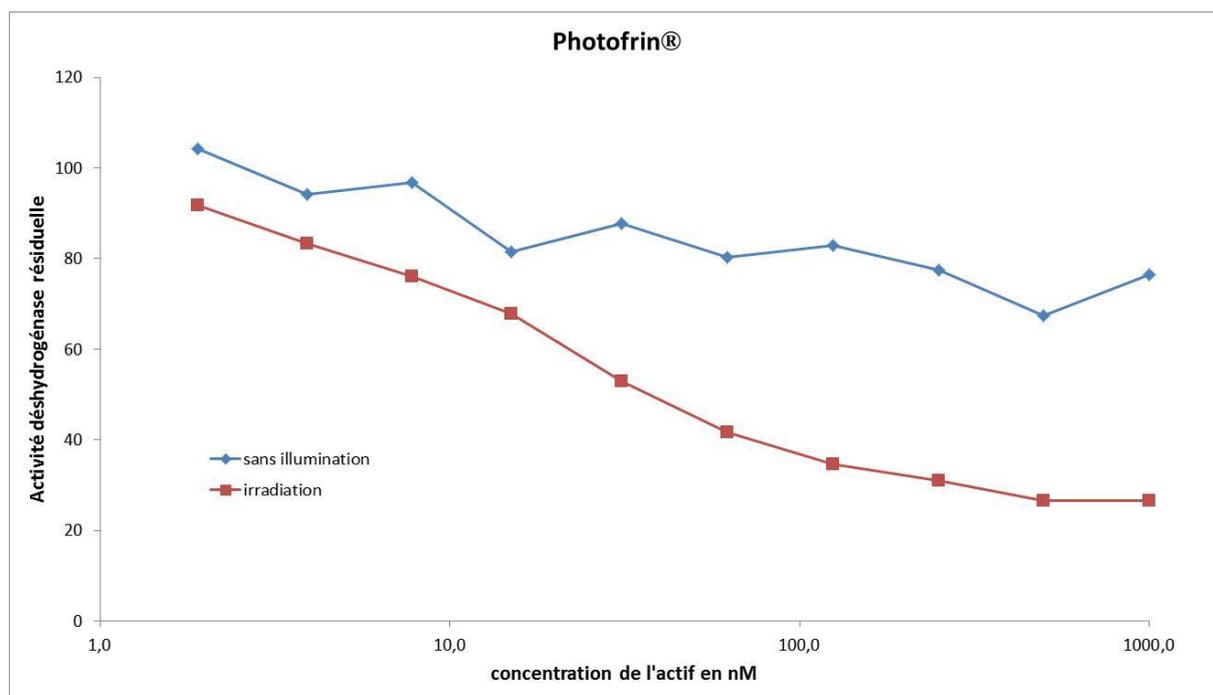


Figure 120 : Photocytotoxicité du Photofrin® neutres sur la lignée HacaT

3- Evaluation biologique des photosensibilisateurs synthétisés

Les figures ci-dessous (figure 121- figure 123) présentent la photocytotoxicité des photosensibilisateurs après irradiation en comparaison à celle induite par le Photofrin® utilisé comme référence. D'une manière générale le greffage des porphyrines sur les nanoparticules n'améliore pas sensiblement leur efficacité, car la valeur de l'IC50 se situe aux alentours de 100 nM. Ce qui est conforme à la valeur couramment rencontrée pour ce type de porphyrines [203-204]. Le greffage de la polyéthylèneimine améliore de façon significative l'activité des nanoparticules portant des porphyrines anioniques et cationiques. Cependant elle est plus importante avec les nanoparticules à motifs porphyrines cationiques, l'activité étant dans ce cas vingt fois supérieure à celle du Photofrin® (IC50 = 1,17 nM au lieu de 20,8 nM pour le Photofrin®). Ceci peut s'expliquer par une meilleure affinité pour les membranes cellulaires chargées négativement et une meilleure internalisation. Il existe néanmoins des zones chargées positivement sur des porteurs de la membrane cellulaire mais en beaucoup moins grand nombre que les zones chargées négativement. Ceci explique la meilleure activité des nanoparticules/porphyrines anioniques par rapport aux nanoparticules/porphyrines neutres. On retrouve ce classement concernant l'affinité des nanoparticules chargées dans la littérature (cationique > anionique > neutre). [205]

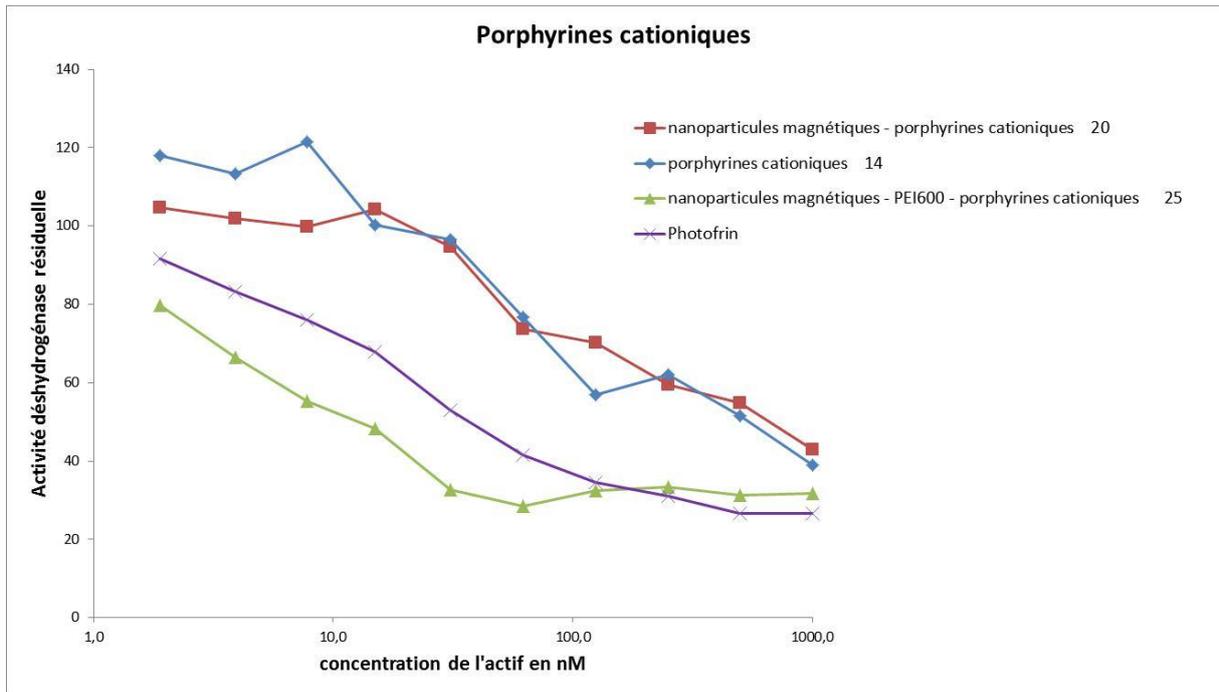


Figure 121 : Photocytotoxicité des porphyrines cationiques sur la lignée HacaT

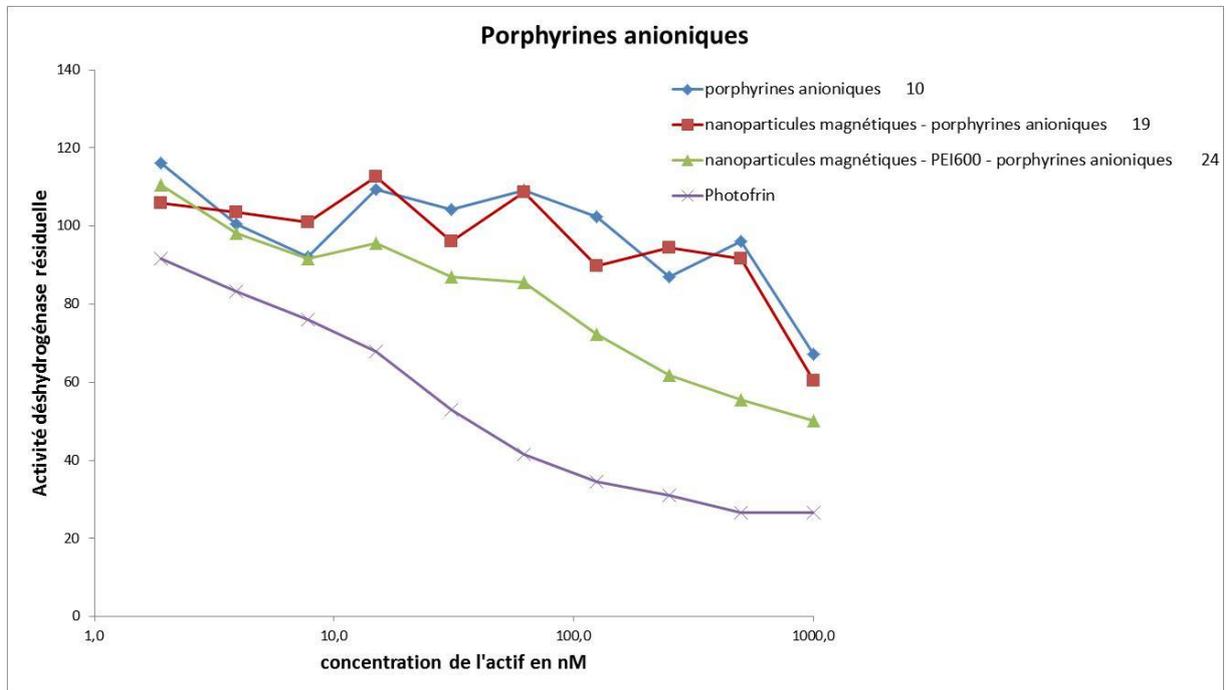


Figure 122 : Photocytotoxicité des porphyrines anioniques sur la lignée HacaT

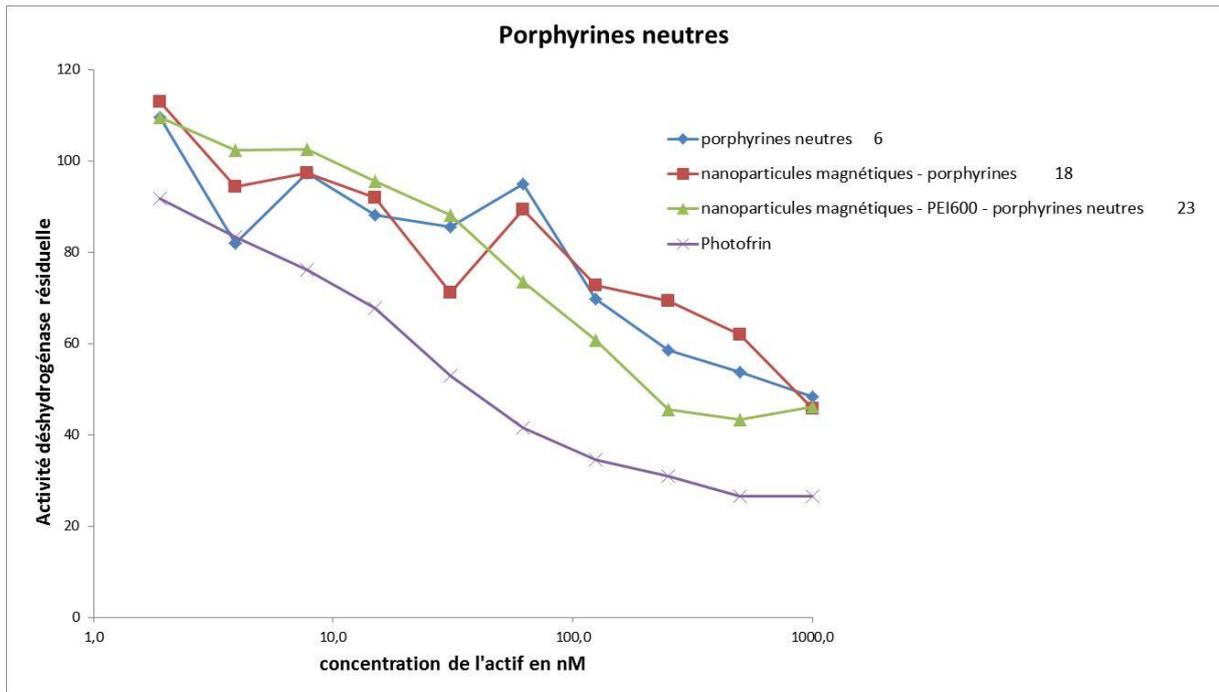


Figure 123 : Photocytotoxicité des porphyrines neutres sur la lignée Hacat

Sur la [figure 124](#) sont représentés graphiquement les IC50 relatifs des PS testés dans notre étude préliminaire.

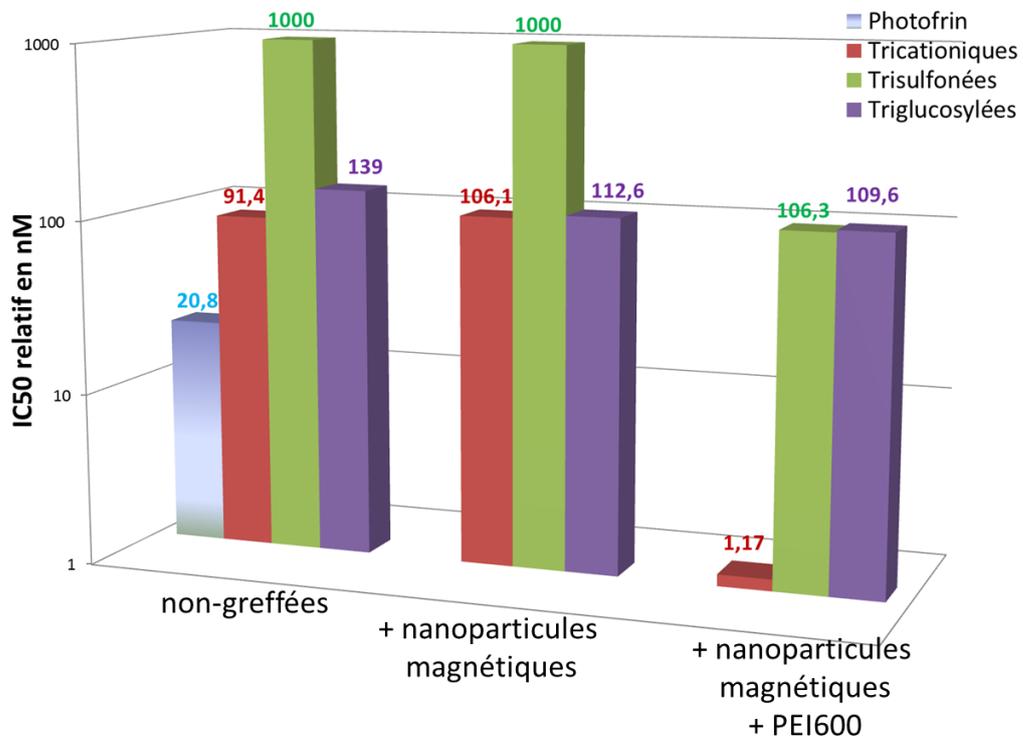


Figure 124 : Comparaison des IC50 relatifs des différents PS

(ND = IC50 relative non-déterminables dans la gamme de concentration testée)

Afin de déterminer l'espèce oxygénée réactive impliquée dans la photocytotoxicité des PS, nous avons réalisé une étude en choisissant deux scavengers d'espèces oxygénées à savoir : le D-mannitol ou inhibiteur des radicaux oxygénés et l'azoture de sodium qui inhibe l'oxygène singulet (figure 125).

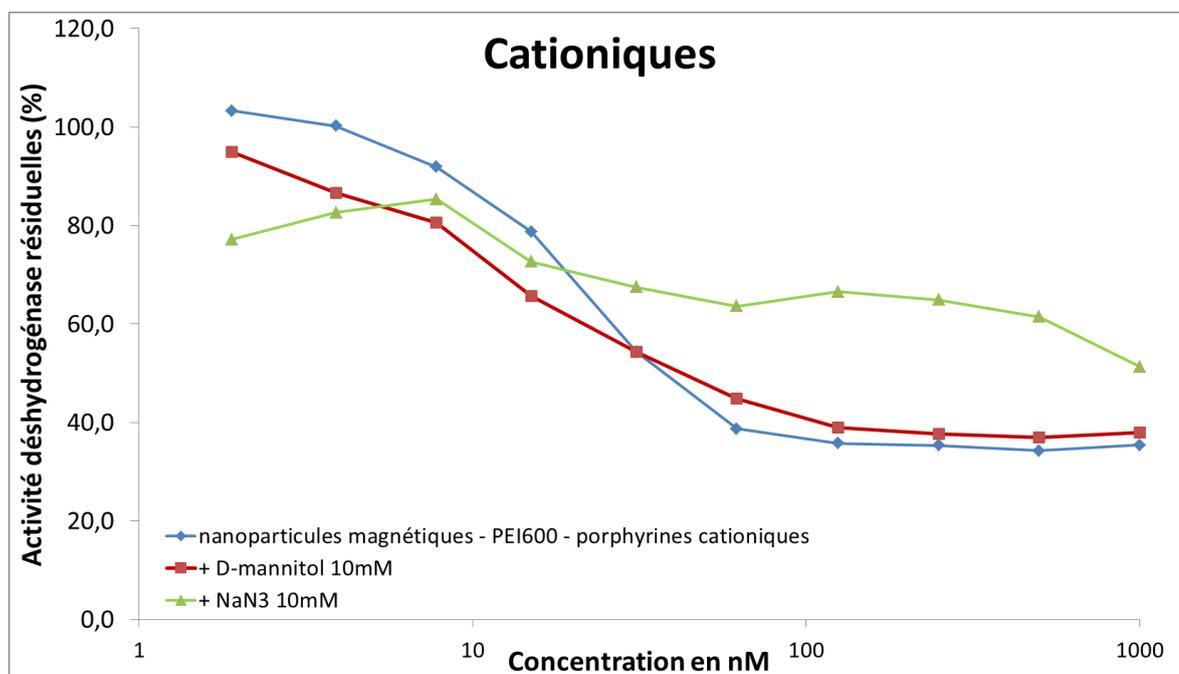


Figure 125: Photocytotoxicité des porphyrines cationiques en présence de D-mannitol et d'azoture de sodium

Les résultats présentés sur la figure 125 sont ceux obtenus avec les nanoparticules superparamagnétiques – PEI600 – porphyrines cationiques. Ces résultats montrent une absence d'inhibition en présence du D-mannitol. Par contre, malgré une faible toxicité, on observe une inhibition de la photocytotoxicité en présence d'azoture de sodium. Ceci nous amène à affirmer que c'est bien l'oxygène singulet qui est l'espèce réactive dans notre cas.

4- Etude de la pénétration cellulaire des PS

Un des facteurs importants dans la PDT est la capacité des photosensibilisateurs à pénétrer à l'intérieur des cellules. Nous avons ainsi évalué la pénétration cellulaire des porphyrines neutre,

anionique et cationique greffées sur les nanoparticules magnétiques par microscopie confocale. Nous avons incubé les cellules HACAT avec nos différents photosensibilisateurs selon le protocole présenté dans la partie expérimentale. Après 2h d'incubation, nous avons réalisé un marquage des mitochondries grâce un marqueur spécifique (le MitoTracker) (figure 126).

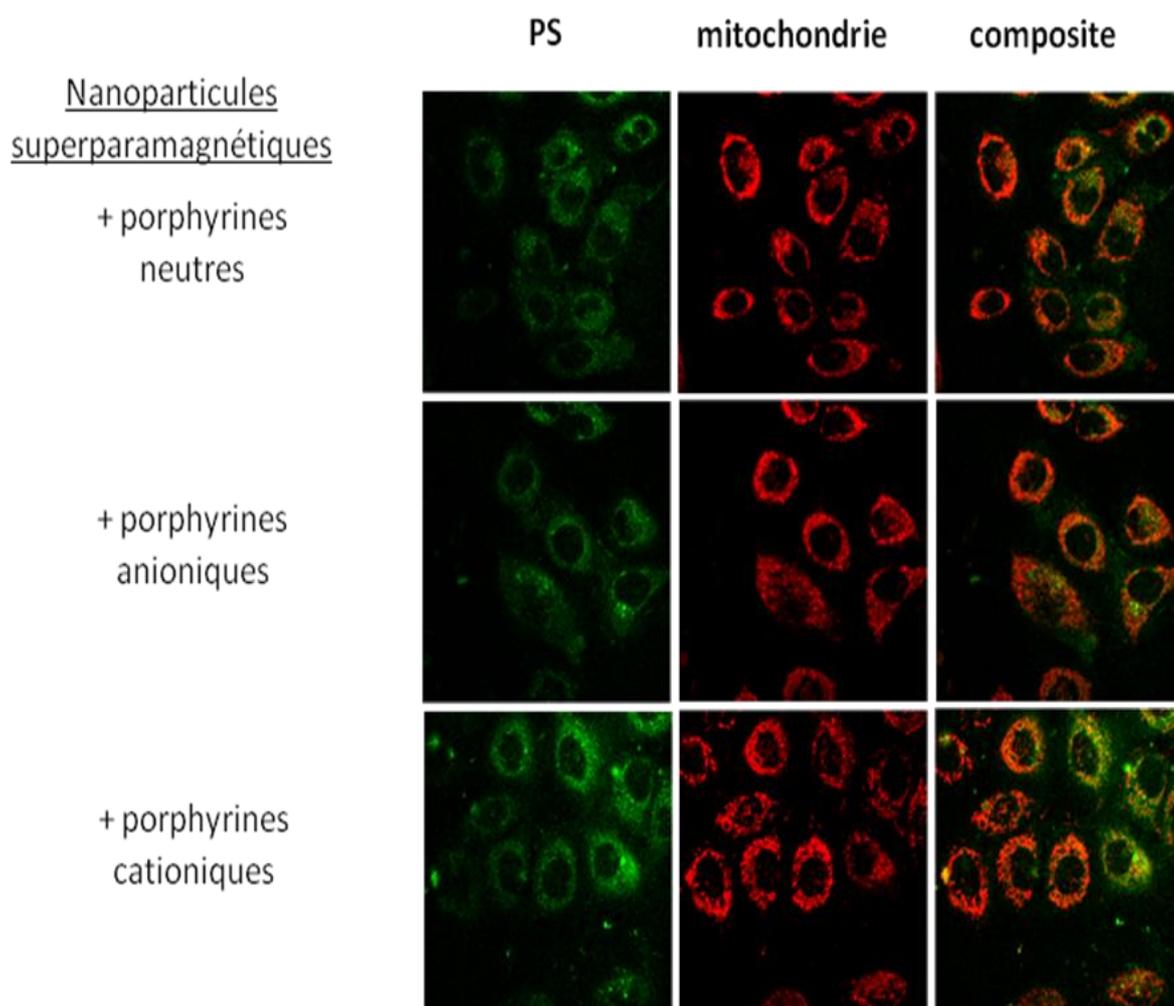


Figure 126 : Pénétration cellulaire des porphyrines neutre, anionique et cationique greffées aux nanoparticules magnétiques dans les cellules Hacat

On observe sur ces clichés une pénétration importante des tous les complexes nanoparticules magnétiques/porphyrines. Ces dernières ont une localisation cytoplasmique avec une très légère au niveau des mitochondries.

5- Conclusion

L'étude préliminaire *in vitro* a permis de montrer une différence d'activité photocytotoxique selon la nature des porphyrines (neutres, anioniques et cationiques). De plus, le greffage sur la nanoparticule d'un agent de pénétration cellulaire (PEI) augmente sensiblement le pouvoir cytotoxique des complexes nanoparticules-porphyrines cationiques et anioniques, excepté des porphyrines neutres. Des essais supplémentaires seront à réaliser pour confirmer ces résultats.

Lors d'une seconde étape, nous avons observé par microscopie confocale une localisation cytoplasmique des nanoparticules/porphyrines anioniques et cationiques avec une possible colocalisation avec des organites cellulaires tels que les mitochondries.

Conclusion générale et perspectives

Conclusion générale et perspectives

Au cours de ce travail, nous avons réalisé la synthèse des nanoparticules d'oxyde de fer fonctionnalisées par des photosensibilisateurs de type porphyrines hydrosolubles afin de créer des nanoparticules superparamagnétiques actives en PDT anticancéreuse. Les nanoparticules sont des véritables vecteurs moléculaires assurant la pénétration à l'intérieur des cellules cancéreuses par un phénomène d'endocytose passive. Ces nouveaux photosensibilisateurs hydrosolubles suscitent un grand intérêt en tant qu'agents photosensibilisateurs de troisième génération, pouvant être utilisés pour diagnostiquer (IRM) ou traiter les tumeurs cancéreuses (PDT). Ainsi, nous avons développé des nanoparticules triazolyl méso-arylporphyriniques par fixation des dérivés propargyloporphyriniques de nature neutre, anionique et cationique par la réaction de « Click-Chemistry ». Les précurseurs porphyriniques ont été caractérisés par les méthodes classiques (RMN 1H, UV-Visible, IR, fluorescence et Masse). Les nanoparticules d'oxyde de fer encapsulées de dextrane et substituées par les porphyrines ont quant à elles été caractérisées par différentes méthodes spectroscopiques et physico-chimiques (UV-Visible, fluorescence, IR, MET, Magnétométrie et ATG). Dans un second temps, nous avons greffé une polyamine (la polyéthylèneimine 600 Da) par la réaction de « Click Chemistry », afin d'améliorer l'internalisation cellulaire des nanoparticules.

Les premiers essais biologiques *in vitro* sur la lignée d'origine kératinocytaire humaine Hacat ont été réalisés. De ce fait, une relation structure-activité a pu être mise en évidence. En effet l'étude *in vitro* a montré une différence d'activité photocytotoxique selon la charge des porphyrines. Le greffage supplémentaire d'un agent internalisant (la PEI 600), a amélioré de manière significative l'action photocytotoxique des porphyrines cationiques et anioniques. Cette amélioration a été plus importante avec les porphyrines cationiques puisqu'elles ont présenté une meilleure photocytotoxicité comparée au photofrin®.

A la suite de ces premiers résultats biologiques satisfaisants, nous souhaitons tout d'abord poursuivre l'évaluation biologique des nouveaux photosensibilisateurs, cette fois-ci en tant qu'agent de diagnostic en IRM. L'élaboration des chlorines (dérivant de précurseur porphyrine) greffées sur les nanoparticules est également envisagée, car ces chromophores absorbant davantage dans le domaine du rouge sont favorables au traitement des tumeurs profondes. Enfin sur ces nanoparticules –chlorines nous envisageons greffer en leur surface un agent de ciblage de cellules tumorales pour leur conférer un caractère de ciblage de haute spécificité. De ce fait notre choix s'est porté sur l'acide folique qui est molécule biocompatible et reconnue par des « récepteurs folates » surexprimées sur certaines cellules cancéreuses (par exemple les cellules ZR-75 du cancer du sein).

Chapitre V Partie expérimentale

1- Réactifs et solvants

L'origine des réactifs et des solvants utilisés au cours de ce travail sont présentés dans tableau 19. Toutes les puretés ont été testées avec les procédures classiques (point de fusion, traces d'eau mesurées par IR...). Leurs éventuels traitements sont également mentionnés, ils ont été réalisés selon les procédures classiques décrites notamment dans le *Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry* (5^e édition, 1989).

Tableau 19 : Réactifs et solvants utilisés.

Réactifs et solvants	Origines	Abréviations communes	Traitements
Acétate d'éthyle 99%	Carlo Erba	AcOEt	-
Acétate de cuivre, monohydraté 98 %	Prolabo	-	-
Acétate de zinc	Acros	-	-
Acétonitrile (pour HPLC) 99,9 %	Fisher	AcN	-
Acide acétique glacial 99 %	Prolabo	-	-
Acide chlorhydrique 37 %	Aldrich	-	-
Acide Bromhydrique à 33 % (conservé à 4°C)	Aldrich	-	-
Acide propanoïque 99 %	Aldrich	-	-
Acide sulfurique 99 %	VWR	-	-
Acide trifluoroacétique	Acros	TFA	-
(+) L-ascorbate de sodium	Sigma	NaAsc	-
Azoture de sodium 99 %	Fluka	-	-
Benzaldéhyde 98 %	Prolabo	-	-
Bromure de propargyle (80 % dans le toluène)	Sigma-Aldrich	-	-
Carbonate de potassium (étuvé à 100 °C)	Aldrich	-	Etuvé à 100 °C,

Chloroforme 99,9 %	SDS	-	24 heures
Chloroforme anhydre	-	-	Distillé sur P ₂ O ₅ puis CaH ₂
Dextran 10 000 Da	Pharmacia	Dextran T10	-
Dichlorométhane 99,8 %	SDS	DCM	-
Dichlorométhane anhydre	-	-	-
Diméthylformamide 99 %	Acros	DMF	Distillé sur P ₂ O ₅ puis CaH ₂
Diméthylformamide anhydre [50ppm≥eau] (99,5 %)	Acros	-	-
Chlorhydrate de N,N'-diméthylaminopropyl-éthyl- carbodiimide 98 %	Acros	EDC	-
N,N-diméthylformamide 99 %	SDS	DMF	-
N,N-diméthylformamide anhydre 99,8 %	Acros	-	-
Ethanol absolu	VWR	-	-
Ether de pétrole	VWR	EP	-
Ether diéthylique	VWR	-	-
Ether diisopropylique 99 %	Acros	-	-
Hydrogénocarbonate de sodium 99 %	Prolabo	-	-
4-hydroxybenzaldéhyde 99 %	Acros	-	-
Hydroxyde d'ammonium 28-30 %	Acros	-	-
Hydroxyde de sodium 98 %	Alfa Aesar	-	-
N-hydroxysuccinimide 98 %	Acros	NHS	Distillé sous pression réduite
Iodométhane 99 %	Alfa Aesar	-	-
Méthanol	VWR	MeOH	-

Méthanolate de sodium 0,5M (conservé à 4°C)	Acros	-	-
Polyéthylène imine 600 Da	Alfa Aesar	PEI 600	-
Propargylamine	Acros		
4-pyridinecarboxaldéhyde 97 %	Aldrich	-	-
Pyrrole 98 %	Acros	-	
1,2,3,4,6-pentaacétyle- α -D-Glucopyranose 98 %	Aldrich	-	-
Résine basique Dowex 550 A	Sigma-Aldrich	-	-
Sulfate de magnésium, trihydraté 99 %	SDS	-	-
Tétrahydrofurane 99 %	Carlo Erba	THF	
Toluène 99 %	VWR	-	-
Triéthylamine 99,5 %	Acros	-	

2- Chromatographie

2-1- Chromatographie analytique

L'évolution des réactions ainsi que la pureté des produits sont contrôlées par chromatographie sur couche mince CCM (silice déposée sur plaque d'aluminium alufolien : gel de silice 60 F₂₅₄ Merck de 0,2 mm d'épaisseur). La révélation des plaques est effectuée,

- Soit par observation directe pour les composés colorés,
- Soit sous lampe UV (254 nm) pour les composés conjugués,
- Soit par vaporisation d'une solution à 1 % d'orcinol dans l'acide sulfurique à 20 % suivie d'un chauffage à 100 °C dans le cas des glucides,
- 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 dans le cas de produits bromés,
- Soit par vaporisation d'une solution de ninhydrine suivie d'un chauffage à 100 °C pour les produits aminés,

2-2- Chromatographie préparative

Chromatographie sur colonne : les purifications sont réalisées en phase normale. Les colonnes ont un diamètre de 2 à 5 cm et sont conditionnées sur 20 à 25 cm de hauteur avec de la silice (gel de silice 60 Merck de granulométrie 15 à 40 μm) dispersée dans le mélange choisi.

Combi-Flash Companion : Il s'agit d'un appareil de grande capacité. Il fonctionne en gradient avec un débit compris entre 5 et 100 mL/min. Après avoir préparé la colonne aux solvants utilisés, on insère une colonne de silice contenant notre produit à purifier (colonnes pouvant contenir de 4 mg à 33 g de produit). Le ratio des solvants est programmé en fonction du temps. La purification du produit est couplée à un suivi d'absorbance UV. On peut travailler en dépôt liquide directement ou solide sur florisil.

Chromatographie sur couche mince : les chromatographies sur plaques préparatives sont réalisées par étalement d'un gel de silice (80 g de gel de silice 60 PF₂₅₄ dispersée dans 220 mL d'eau) en une couche de 2 mm d'épaisseur sur six plaques de verre (20 \times 20 cm) placés sur un banc. Après séchage à l'air libre durant 15 heures, les plaques sont finalement activées 2 heures à 100 °C avant usage.

Chromatographie d'exclusion stérique : Toutes les nanoparticules de départ ont été purifiées par chromatographie d'exclusion stérique avec comme support le séphadex LH20 (Pharmacia).

3- Analyse physico-chimiques

3-1- Ultraviolet - visible

Les spectres UV –Visibles en solution ont été réalisés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 25 et ont été effectués dans des cellules de quartz de 1 cm de trajet optique. Tous les spectres ont été réalisés à une concentration voisine de 10^{-5} – 10^{-6} M dans le solvant adéquat. Les longueurs d'onde λ , correspondantes aux absorbances maximales sont exprimées en nm et les coefficients d'absorption molaire ϵ , en $\text{M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$.

Les spectres DRUV sur les tissus modifiés ont été réalisés sur un spectrophotomètre Varian CARY 5000 muni d'une sphère d'intégration, sans conditionnement particulier, au laboratoire SPCTS (UMR 6638 CNRS) de l'université de Limoges.

3-2- Fluorescence

Les spectres ont été réalisés sur un spectrofluorimètre quanta master PTI doté d'un système de détection photomultiplicateur 814 ($\lambda_{\text{max}} = 900 \text{ nm}$) et contrôlé par un logiciel complété du système d'acquisition Felix 32. Les mesures seront faites en solution diluée ($C \sim 10^{-4}$ à $10^{-8} \text{ molL}^{-1}$).

3-3- Infra- rouge

Les spectres IR ont été réalisés sur un appareil Perkin Elmer FT – IR spectrometer SPECTRUM 1000 sur des échantillons conditionnés en pastilles de KBr. Les nombres d'onde ν sont exprimés en cm^{-1} .

3-4- Température de fusion

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

3-5- Analyses élémentaires

Les analyses élémentaires ont été effectuées au service central d'analyse du CNRS de Solaize.

3-6- Résonance magnétique nucléaire

Les spectres RMN ont été enregistrés sur un appareil Brücker DPX-400, respectivement à une fréquence de 400,13 MHz pour le proton et de 100,62 MHz pour le carbone, au service commun de l'université de Limoges. Les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm en prenant le tétraméthylsilane comme référence interne et les constantes de couplage J sont exprimées en Hz. Les abréviations retenues pour nommer les figures sont ; s (singulet), d (doublet), dd (double doublet), t (triplet), q (quadruplet), m (multiplet). Les figures élargies comportent un « él » en indice.

3-7- Spectrométrie de masse

Les spectres de masse ont été effectués à l'IPCM (UMR 7201 CNRS) de l'Université Pierre Marie Curie, Paris VI par le Dr. Sandra Alves. Les spectres MALDI ont été obtenus par désorption laser avec un spectromètre à temps de vol Voyager Elite (Framingham MA, USA) équipé d'un laser d'azote 337 nm (VSL 337ND). Les spectres ESI ont été réalisés en mode positif avec un spectromètre à capture

d'ions Esquire 3000 (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) équipé d'une source ESI (Analytica Bradford, CT, USA).

3-8- Analyse thermogravimétrique

Les spectres ATG des nanoparticules synthétisées ont été réalisés sur un appareil SETARAM série Setys 2400 à l'école nationale supérieure d'ingénieur de limoges ENSIL (figure 127). Tous les spectres ont été obtenus pour une montée en température de 10 °/min allant de 25 °C jusqu'à 600 °C sous balayage d'argon, utilisant l'alumine calcinée comme référence inerte.



Figure 127 : Photographie de la Thermobalance utilisée pour l'analyse thermogravimétrique des nanoparticules synthétisées

3-9- Microscopie électronique à transmission

Les analyses TEM ont été effectuées avec un appareil JEOL 2010 UHR opérant sous une tension d'accélération de 200 KV, du service de microscopie électronique au Centre Européen de Céramique (CEC) de Limoges. Une goutte de suspension diluée au 1/1000^è est déposée sur une grille de microscopie de 3 mm en cuivre, recouverte de carbone. L'échantillon est séché à l'air libre pendant 6 heures.

3-10- Rendement quantique d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$)

Les mesures de rendement quantique en oxygène singulet des composés porphyriniques hydrosolubles et des nanoparticules porphyriniques ont été réalisées au laboratoire DCRP (UMR 7630 CNRS – INPL) de l'université de Nancy. Les photosensibilisateurs étudiés ont été excités à l'aide d'une lampe Xénon à arc placée sur un spectrofluorimètre SPEX 1680 possédant un double mono chromateur de 0,22 μm . La luminescence de l'oxygène singulet, suite à une excitation à 415 nm, a ensuite été mesurée à 1270 nm via un monochromateur PTI S/N 1565 grâce à un détecteur IR de la société North Coast Scientific (modèle EO-817L), refroidi à l'azote liquide. Les échantillons ont été dilués dans une goutte de chloroforme puis redilués dans l'éthanol ou directement dilués dans l'éthanol (selon la solubilité du produit) afin d'obtenir des solutions dont la densité optique au maximum d'absorption soit maintenue inférieure à $0,2 \pm 0,02$.

Les rendements quantiques d'oxygène singulet des photosensibilisateurs finaux ont été déterminés dans l'éthanol, en utilisant le rose de bengale ($\Phi = 0,68$ dans l'éthanol) comme référence^[207].

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta_{\text{ref}}} \times \left(\frac{A_{\text{ref}}}{A} \right) \times \left(\frac{I}{I_{\text{ref}}} \right)$$

Avec,

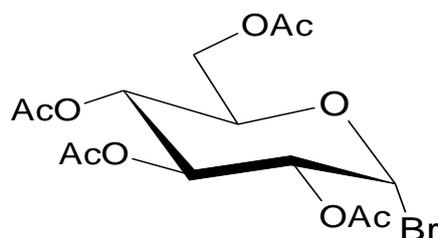
- Φ_{Δ} = rendement quantique de formation d'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$ du composé étudié,
- $\Phi_{\Delta_{\text{ref}}}$ = rendement quantique de formation d' $^1\text{O}_2$ du rose de bengale,
- A et A_{ref} = absorption à la longueur d'onde d'excitation (415 nm) du composé étudié et de la référence (rose de Bengale) respectivement,
- I et I_{ref} = intensité du pic de luminescence à 1270 nm du composé étudié et de la référence respectivement

3-11- Magnétisme

Les mesures d'aimantation à saturation utilisées dans le cadre du calcul de l'anisotropie magnétiques et des courbes d'hystérésis des nanoparticules d'oxyde de fer ont été par le docteur Eric Rivière du Laboratoire de Chimie Inorganique – ICMMO- Université Paris-Sud 11. Toutes les nanoparticules ont été analysées à l'aide d'un magnétomètre à SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) MPMS-5 (Magnetic Property Measurement System) conçu par la société Quantum Design. Les mesures ont été faites pour des champs magnétiques compris entre -7 et +7 Teslas, à des températures allant de 5K (-268 °C) à 300K (27 °C).

4- Synthèses

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



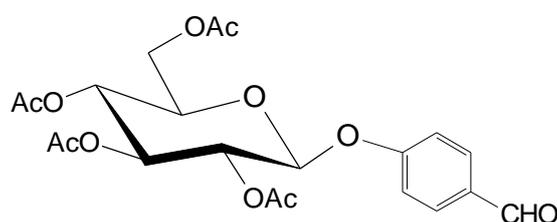
Le penta-*O*-acétyl- β -D glucose (15 g ; 38,4 mmol) est dissous dans 20 mL d'une solution à 33 % d'HBr dans l'acide acétique à 4 °C. La réaction est laissée sous agitation pendant 4 heures puis le mélange réactionnel est mis au réfrigérateur pendant 12 heures. L'excès d'acide bromhydrique est chassé à 0 °C par barbotage d'argon sous la hotte. Le mélange réactionnel est ensuite extrait par le dichlorométhane (50 mL), puis lavé par de l'eau distillée (2×50 mL). La solution finale est neutralisée rapidement avec une solution saturée de NaHCO₃ glacée (2×10 mL). Après lavage de la phase organique à l'eau distillée (2×100 mL), séchage sur MgSO₄, filtration et évaporation du solvant, le produit brut est recristallisé deux fois dans 25 ml d'éther diisopropylique. On isole alors 12,4 g (76 %) du 1-bromo-2, 3, 4, 6-tétra-*O*-acétyl- α -D-glucopyranose **1**.

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

T_F = 88 °C (litt. [206] TF = 88-89 °C)

La présence du brome est mise en évidence en pulvérisant une solution d'eau oxygénée à 30 % dans l'acide acétique, puis celle de fluorescéine suivie d'un chauffage à 100 °C de la plaque CCM.

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



7,5 g (17,65 mmol ; 1 éq.) de 1-bromo-2, 3, 4,6-O-acétyl- α -D-glucopyranose **1** et 6,44 g (52,76 mmol ; 3 éq.) de 4-hydroxybenzaldéhyde sont dissous dans le mélange à 20 mL d'hydroxyde de sodium à 7% et 30 mL d'acétone. Après 24h de réaction, 400 mL d'eau glacée sont ajoutés au milieu réactionnel. Au bout d'une heure d'agitation, il se forme un précipité qui est récupéré par filtration sur büchner. Le précipité ainsi obtenu est recristallisé dans le mélange méthanol/eau (1/1). On obtient 3, 3g (40 %) du composé **2**.

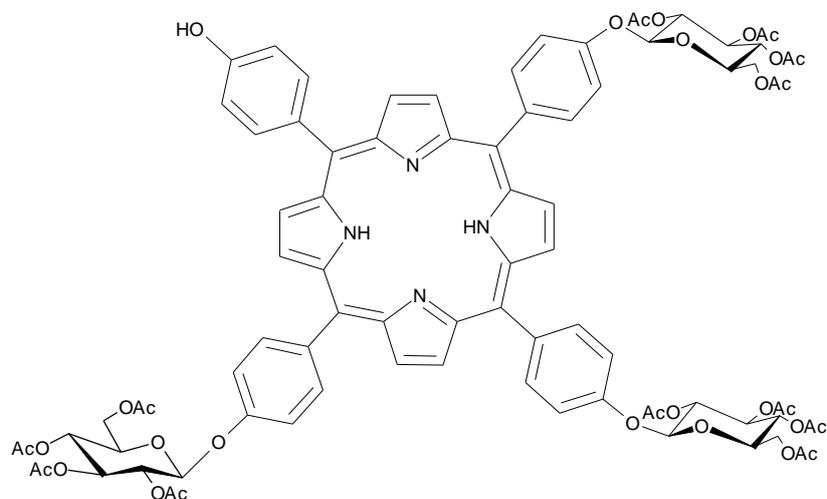
$R_f = 0,32$ (acétate d'éthyle/ éther de pétrole 1/1)

$T_F = 145^\circ\text{C}$ (litt.[207] $T_F = 144-145^\circ\text{C}$)

RMN ^1H (CDCl_3): $\delta_{\text{ppm}} = 9,90$ (s, 1 H, H_{CHO}); 7,85 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{3-5 \text{ Ar}}$); 7,10 (d, $J = 8,5$ Hz, 2 H, $\text{H}_{2-6 \text{ Ar}}$); 5,20-5,40 (m, 4 H, $\text{H}_{1',2',3',4' \text{ ose}}$); 4,27 (dd, $J = 12$ Hz, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{H}_{6' \text{ b ose}}$); 4,15 (dd, $J = 12$ Hz, $J = 5,6$ Hz, 1 H, $\text{H}_{6' \text{ a ose}}$); 3,90 (ddd, $J = 10$ Hz, $J = 5,6$ Hz, $J = 2,6$ Hz, 1 H, $\text{H}_{5' \text{ ose}}$); 2,06 (s, 3 H, $\text{H}_{\text{CH}_3\text{CO}}$); 2,05 (s, 6 H, $\text{H}_{\text{CH}_3\text{CO}}$); 2,03 (s, 3 H, $\text{H}_{\text{CH}_3\text{CO}}$).

SM (ESI): $m/z = 452$ (M) $^+$, 121(M-GlcAc) $^+$

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



Dans un bicol de 250 mL, 200 mg de 4-hydroxybenzaldéhyde (1,64 mmol ; 1 éq.) et 2,2 g de glucosylbenzaldéhyde **2** (4,72 mmol ; 3 éq.) sont dissous dans 50 ml d'acide propionique. Après 1 heure de reflux à 110 – 120 °C, le pyrrole (0,454 mL ; 6,55 mmol ; 4 éq.) fraîchement distillé est additionné goutte à goutte. La réaction se poursuit pendant 1 heure à 120 °C, sous agitation et à l'abri de la lumière. Après retour à la température ambiante, le solvant est évaporé à la pompe à palette. Le brut est absorbé sur florisil. On effectue une première purification sur colonne de silice (CHCl₃/EtOH : 99/1 à 98/2). Le produit issu de la colonne est enfin purifié par chromatographie sur plaques préparatives de silice (CHCl₃/EtOH : 95/5). Le composé **3** est obtenu, sous l'aspect d'un solide violet, avec un rendement de 212mg (7,8 %).

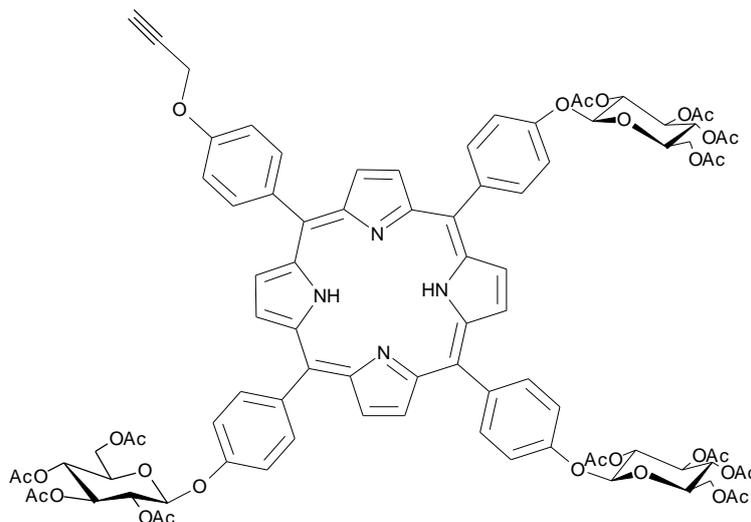
R_f = 0,54 (CHCl₃/EtOH : 95/5)

UV-Visible (CHCl₃), λ_{max} en nm (ε.10⁻³) : 420 (422,0) ; 516 (14,2) ; 552 (8,2) ; 592 (4,0) ; 650 (4,4).

RMN ¹H (CDCl₃) (Tableau 9) : δ_{ppm} = 8,86 (d, *J* = 4,8 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,82 (s, 4 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,81 (d, *J* = 4,8 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,11 (d, *J* = 8,4 Hz, 6 H, **H**_{2,6-aryl-ose}) ; 8,03 (d, *J* = 8,3 Hz, 2 H, **H**_{2,6-aryl}) ; 7,36 (d, *J* = 8,4 Hz, 6 H, **H**_{3,5-aryl-ose}) ; 7,17 (d, *J* = 8,3 Hz, 2 H, **H**_{3,5-aryl}) ; 5,48 (m, 3 H, **H**_{1',2',3'-O-Glucosyles}) ; 5,35 (t él., *J* = 9,5 Hz, 1 H, **H**_{4'-O-Glucosyles}) ; 4,44 (dd, *J* = 12 Hz, *J* = 5,1 Hz, 1 H, **H**_{6'a-O-Glucosyles}) ; 4,31 (d él., *J* = 12 Hz, **H**_{6'b-O-Glucosyles}) ; 4,06 (ddd, *J* = 9,6 Hz, *J* = 5,1 Hz, *J* = 2,3 Hz, 1 H, **H**_{5'-O-Glucosyles}) ; 2,22 (s, 1 H, **H**_{acétyles}) ; 2,12 (s, 1 H, **H**_{acétyles}), 2,11 (s, 1 H, **H**_{acétyles}) ; - 2,82 (s, 2 H, **H**_{NHint}).

SM (MALDI): *m/z* = 1671, 3 [M+H]⁺

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



Dans un ballon de 100 mL surmonté d'une garde à CaCl₂, le composé **3** (100 mg ; 0,06 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 20 mL de DMF anhydre auquel 42 mg de K₂CO₃ anhydre (0,3 mmol ; 5 éq.) sont ajoutés. 0,027 mL de bromure de propargyle (0,3 mmol, 5 éq.) sont introduits avec précaution, sous argon. Après 24 heures de réaction à température ambiante et à l'abri de la lumière, le produit est extrait dans le CHCl₃ et lavé à l'eau (2 × 100 mL). Il est ensuite séché sur MgSO₄, puis filtré. L'éther propargylique obtenu est purifié par chromatographie sur plaques préparatives (CHCl₃/EtOH : 95/5). Le composé **4** est obtenu sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement de 71mg (70 %).

R_f = 0,7 (CHCl₃/EtOH : 95/5)

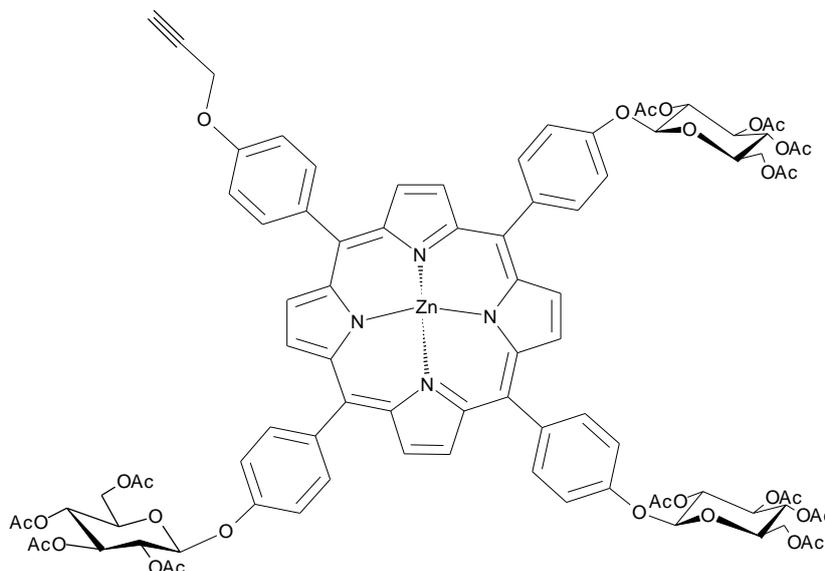
UV-Visible (CHCl₃), λ_{max} en nm (ε.10⁻³) : 421 (653,8) ; 517 (21,5) ; 554 (13,4) ; 592 (10,9) ; 648 (10,3).

IR ν (cm⁻¹), KBr : 2118 (-C≡C-); 3283 (≡C-H).

RMN ¹H (CDCl₃) (Tableau 9) : δ_{ppm} = 8,85 (d, *J* = 4,8 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,82 (s, 4 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,81 (d, *J* = 4,8 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,11 (d, *J* = 8,4 Hz, 6 H, **H**_{2,6-aryl-ose}) ; 8,10 (d, *J* = 8,3 Hz, 2 H, **H**_{2,6-aryl}) ; 7,36 (d, *J* = 8,4 Hz, 6 H, **H**_{3,5-aryl-ose}) ; 7,29 (d, *J* = 8,3 Hz, 2 H, **H**_{3,5-aryl}) ; 5,48 (m, 3 H, **H**_{1',2',3'-O-Glucosyles}) ; 5,35 (t él., *J* = 9,5 Hz, 1 H, **H**_{4'-O-Glucosyles}) ; 4,92 (d, *J* = 2,3 Hz, 2 H, **H**_{O-propargyle}) ; 4,44 (dd, *J* = 12 Hz, *J* = 5,1 Hz, 1 H, **H**_{6'a-O-Glucosyles}) ; 4,31 (d él., *J* = 12 Hz, **H**_{6'b-O-Glucosyles}) ; 4,06 (ddd, *J* = 9,6 Hz, *J* = 5,1 Hz, *J* = 2,3 Hz, 1 H, **H**_{5'-O-Glucosyles}) ; 2,63 (t, *J* = 2,3 Hz, 1 H, **H**_{O-propargyle}) ; 2,22 (s, 1H, **H**_{acétyles}) ; 2,12 (s, 1 H, **H**_{acétyles}), 2,11 (s, 1 H, **H**_{acétyles}) ; - 2,82 (s, 2 H, **H**_{NHint.}).

SM (MALDI): *m/z* = 1707, 65 [M+H]⁺

5-(4-propargyloxyphényl)-10,15,20-tris-[4-(2',3',4',6'-tétra-O-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)-phényl] porphyrinato zinc (5)



Dans un ballon de 100 mL, le composé **4** (60 mg ; 0,035 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 50 mL de THF auquel 17,4 mg d'acétate de zinc (0,14 mmol ; 4 éq.) sont ajoutés. Après 2 heures de réaction à reflux (80 °C) sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière, le THF est évaporé. Le produit est ensuite repris dans du CHCl₃ (20 mL), lavé à l'eau (2 × 20 mL), séché sur MgSO₄ puis filtré. Après évaporation, le composé **5** est obtenu sous l'aspect d'un solide violet avec un rendement quasi quantitatif 58 mg (95 %).

R_f = 0,7 (CHCl₃)

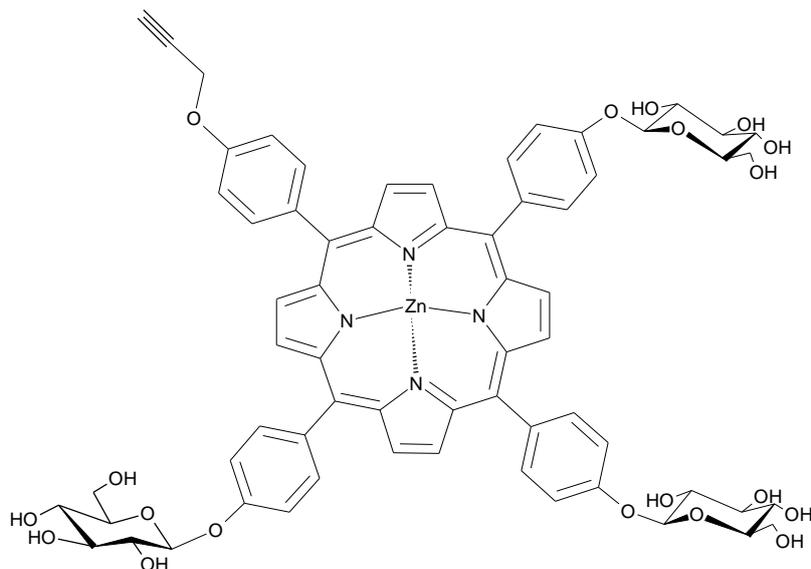
UV-Visible (CHCl₃), λ_{max} en nm (ε.10⁻³) : 422 (655,8) ; 554 (12,3) ; 592 (9,7)

IR ν (cm⁻¹), KBr: 2120 (-C≡C-); 3281 (≡C-H).

RMN ¹H (CDCl₃) (Tableau 9) : δ_{ppm} = 8,95 (d, *J* = 4,8 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,82 (s, 4 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,81 (d, *J* = 4,8 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,11 (d, *J* = 8,4 Hz, 6 H, **H**_{2,6-aryl-ose}) ; 8,10 (d, *J* = 8,3 Hz, 2 H, **H**_{2,6-aryl}) ; 7,36 (d, *J* = 8,4 Hz, 6 H, **H**_{3,5-aryl-ose}) ; 7,29 (d, *J* = 8,3 Hz, 2 H, **H**_{3,5-aryl}) ; 5,48 (m, 3 H, **H**_{1',2',3'-O-Glucosyles}) ; 5,35 (t él., *J* = 9,5 Hz, 1 H, **H**_{4'-O-Glucosyles}) ; 4,92 (d, *J* = 2,3 Hz, 2 H, **H**_{O-propargyle}) ; 4,44 (dd, *J* = 12 Hz, *J* = 5,1 Hz, 1 H, **H**_{6'a-O-Glucosyles}) ; 4,31 (d él., *J* = 12 Hz, **H**_{6'b-O-Glucosyles}) ; 4,06 (ddd, *J* = 9,6 Hz, *J* = 5,1 Hz, *J* = 2,3 Hz, 1 H, **H**_{5'-O-Glucosyles}) ; 2,63 (t, *J* = 2,3 Hz, 1 H, **H**_{O-propargyle}) ; 2,22 (s, 1H, **H**_{acétyles}) ; 2,12 (s, 1 H, **H**_{acétyles}), 2,11 (s, 1 H, **H**_{acétyles}).

SM (MALDI): *m/z* = 1769, 56 [M+Zn]⁺

5-(4-propargyloxyphényl)-10,15,20-tris[4-(β-D-glucopyranosyloxy)phényl]porphyrinato zinc (6)



40 mg de porphyrine métallée **5** (0,023 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 4 mL d'une solution de chloroforme et de méthanol (8/2) à laquelle on ajoute 0,69 mL (0,046 mmol, 1,5 éq. Par groupement acétyle) de solution méthanolique 0,5 M de méthylate de sodium. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante durant une heure puis la porphyrine est précipitée complètement par addition d'excès de chloroforme (50 mL). Après filtration, lavage au chloroforme (4 × 10 mL), la porphyrine **6** est redissoute dans l'eau. Cette porphyrine est ensuite mise sous dialyse (seuil de coupure = 1000 Da) pendant 72 heures. Le produit, après lyophilisation, est obtenu avec un rendement quasi quantitatif 30 mg (95 %).

Rf = 0,45 (CHCl₃/MeOH/H₂O : 6/4/1)

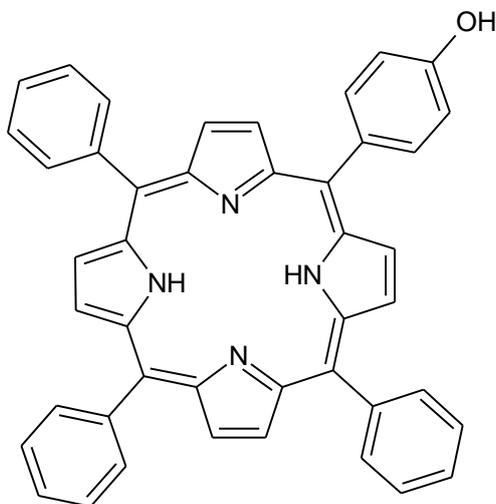
UV-Visible (H₂O) : λ_{max} en nm (ε.10⁻³) : 416 (478,6) ; 441 (688,4) ; 564 (97,60) ; 604 (78,30).

IR ν (cm⁻¹), KBr: 2118 (-C≡C-); 3283 (≡C-H).

RMN¹H (DMSO) (Tableau 9) : δ_{ppm} = 8,81(d, J = 5,1 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}); 8,80 (s, 4 H, **H**_{β-pyrroliques}); 8,78 (d, J = 4,9 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}); 8,10 (d, J = 8,7 Hz, 6 H, **H**_{2,6-aryl-ose}); 8,07 (d, J = 8,4 Hz, 2 H, **H**_{2,6-aryl}); 7,44 (d, J = 8,5 Hz, 2 H, **H**_{3,5-aryl}); 7,40 (d, J = 8,5 Hz, 6 H, **H**_{3,5-aryl-ose}); 5,52 (s el., 3 H, **H**_{1'-O-Glucosyles}); 5,28 (s el., 1 H, **H**_{2'-O-Glucosyles}); 5,22 (t, J = 12,9 Hz, 6 H, **H**_{3',4'-O-Glucosyles}); 5,09 (d, J = 2,2 Hz, 2 H, **H**_{O-propargyle}); 4,75 (s el., 3 H, **H**_{5'-O-Glucosyles}); 3,81 (d el., J = 10,9 Hz, 3 H, **H**_{6'a-O-Glucosyles}); 3,76 (t, J = 4,4 Hz, 1 H, **H**_{O-propargyle}); 3,60 (d el., J=10,9 Hz, 3 H, **H**_{6'b-O-Glucosyles}).

SM (MALDI): m/z = 1203, 41 [M-Zn]⁺

5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphénylporphyrine (**7**)



Dans un bicol surmonté d'un réfrigérant et d'une garde à chlorure de calcium, on dissout dans 500 mL d'acide propionique, le 4-hydroxybenzaldéhyde (604 mg ; 4,94 mmol ; 1 éq.) et le benzaldéhyde (1,5 mL ; 14,8 mmol ; 3 éq.). Le mélange est alors porté à 120°C puis maintenu sous agitation à cette température pendant 1 heure. Le pyrrole (1,4 mL ; 19,76 mmol ; 4 éq.) fraîchement distillé est ensuite introduit goutte à goutte. La réaction se poursuit pendant 1 heure à l'abri de la lumière. Les triphénylporphyrines cristallisent dans le milieu réactionnel après 18 heures à 4 °C. Après filtration et lavage à l'éthanol, le brut est fixé sur florisil. Le produit est ensuite purifié par chromatographie sur colonne de silice (CHCl₃/éther de pétrole : 80/20 ; 90/10 et CHCl₃ : 100). Le composé est **7** est alors obtenu sous l'aspect d'un solide bleu violet avec un rendement de 6% (191mg). Purification par Combi-Flash : Le mode est identique avec les mêmes quantités de réactifs ; seule la méthode de purification est automatisée. Le composé **7** est obtenu avec un rendement de 213 mg (7 %).

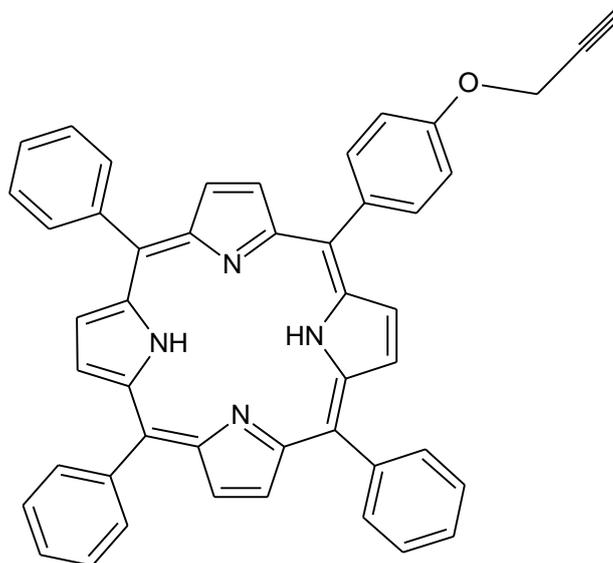
R_f = 0,6 (CHCl₃/éthanol : 95/5)

UV-Visible (CHCl₃), λ_{max} en nm (ε.10⁻³) : 419 (515); 516 (153,9) ; 552 (61,9) ; 591 (40,3) ; 647 (42,8).

RMN¹H (CDCl₃) (Tableau 10) : δ_{ppm} = 8,94 (d, *J* = 4,7 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,84 (d, *J* = 4,7 Hz, 2 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,82 (s el., 4 H, **H**_{β-pyrroliques}) ; 8,21 (d, *J* = 7,6 Hz, 6 H, **H**_{2,6-phényl}) ; 8,03 (d, *J* = 8,2 Hz, 2 H, **H**_{2,6-aryl}) ; 7,74 (d, *J* = 7,4 Hz, 9 H, **H**_{3,4,5-phényl}) ; 7,15 (d, *J* = 8,2 Hz, 2 H, **H**_{3,5-aryl}) ; -2,75 (s, 2 H, **H**_{NHint}).

SM (MALDI): *m/z* = 631, 52 [M+H]⁺

5-(4-propargyloxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (8)



Dans un ballon de 100 mL surmonté d'une garde à CaCl_2 , le composé **7** (191 mg ; 0,3 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 30 mL de DMF anhydre auquel 837 mg de K_2CO_3 anhydre (6,06 mmol ; 20 éq.) sont ajoutés. 0,54 mL de bromure de propargyle (6,06 mmol ; 20 éq.) sont ensuite introduits avec précaution, sous argon. Après 24 heures de réaction à température ambiante et à l'abri de la lumière, le DMF est évaporé. Après extraction dans le CHCl_3 , lavage à l'eau (2×100 mL), séchage sur MgSO_4 et filtration, l'éther propargylique est purifié par chromatographie sur plaques préparatives de silice ($\text{CHCl}_3/\text{éthanol} : 95/5$). Le composé **8** est obtenu avec un rendement de 174 mg (86 %).

$R_f = 0,8$ ($\text{CHCl}_3/\text{éthanol} : 95/5$)

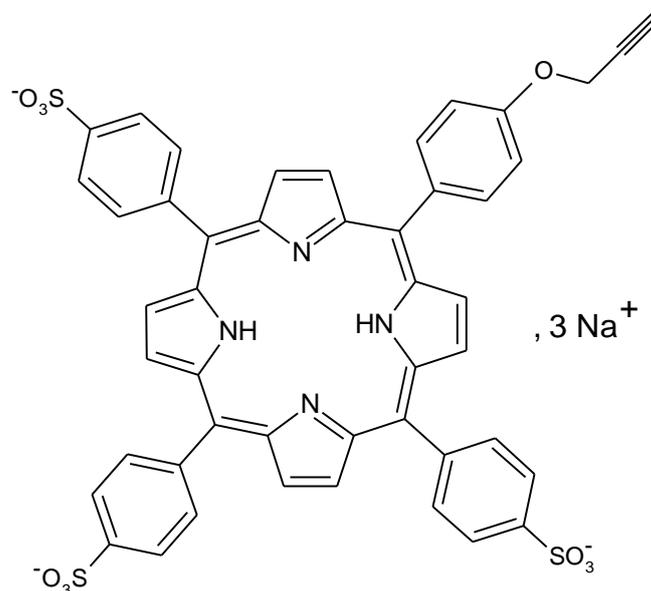
UV-Visible (CHCl_3), λ_{max} en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 419 (515) ; 516(153,9) ; 552 (61,9) ; 591 (40,3) ; 647 (32,8).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 2118 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$); 3283 ($\equiv\text{C}-\text{H}$).

$^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) (Tableau 10) : $\delta_{\text{ppm}} = 8,94$ (d, $J = 4,7$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,83 (s, 6 H, $\mathbf{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,21 (d, $J = 7,6$ Hz, 6 H, $\mathbf{H}_{2,6\text{-phényl}}$) ; 8,03 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{2,6\text{-aryl}}$) ; 7,74 (d, $J = 7,4$ Hz, 9 H, $\mathbf{H}_{3,4,5\text{-phényl}}$) ; 7,15 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{3,5\text{-aryl}}$) ; 4,93 (d, $J = 2,3$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{\text{O-propargyle}}$) ; 2,60 (t, $J = 2,3$ Hz, 1 H, $\mathbf{H}_{\text{O-propargyle}}$) ; -2,77 (s, 2 H, $\mathbf{H}_{\text{NHint}}$).

SM (MALDI): $m/z = 669,23$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

5-(4-propargyloxyphényl)-10, 15,20-tris-(4-sulphonatophényl) porphyrine sel de sodium (9)



207 mg du composé **8** (0,31 mmol) sont traités avec 10 mL d' H_2SO_4 à 95 % durant 24 heures à 70-80 °C, sous agitation et à l'abri de la lumière. La solution est ensuite diluée dans 100 mL d'eau ultra pure puis neutralisée par une solution saturée de Na_2CO_3 jusqu'à obtenir un pH voisin de 7. Après évaporation, les sels de sodium sont précipités par un excès de MeOH (opération répétée 5 fois). L'élimination des sels non porphyriniques est réalisée à l'aide d'une simple filtration sur fritté de porosité 3. La solution est reprise dans un minimum d'eau avant la mise au lyophilisateur. Après 3 jours de lyophilisation, le composé hydrosoluble **9** est obtenu sous l'aspect d'un solide vert avec un rendement de 255 mg (84 %).

$R_f = 0,6$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} : 5/4/1$)

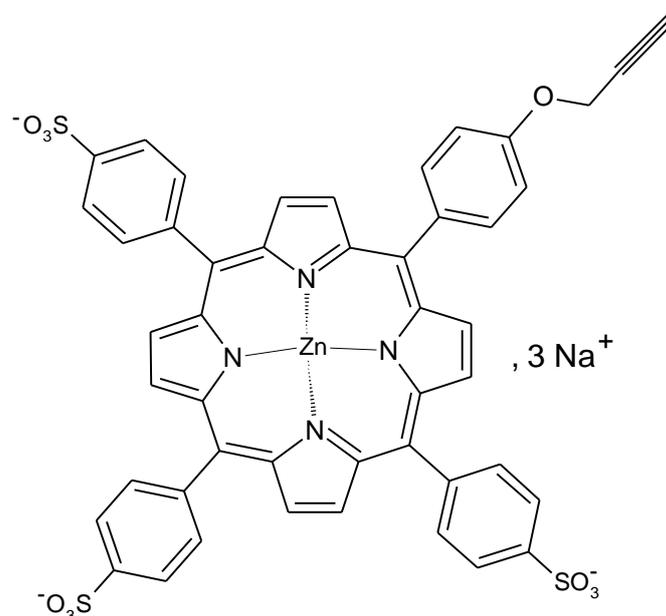
UV-Visible (H_2O), λ_{max} en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 415 (163,3) ; 519 (65) ; 558 (57) ; 599 (25,2) ; 645 (19).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 2118 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$); 3283 ($\equiv\text{C}-\text{H}$).

RMN^1H (DMSO) (Tableau 10) : $\delta_{\text{ppm}} = 8,97$ (d, $J = 4,5$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,95 (d, $J = 4,5$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,83 (s, 4 H, $\mathbf{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$) ; 8,19 (d, $J = 8$ Hz, 6 H, $\mathbf{H}_{3,5\text{-phényl}}$) ; 8,11 (d, $J = 8$ Hz, 6 H, $\mathbf{H}_{2,6\text{-phényl}}$) ; 7,92 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{2,6\text{-aryl}}$) ; 7,02 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{3,5\text{-aryl}}$) ; 4,91 (d, $J = 2,3$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{\text{O-propargyle}}$) ; 2,62 (t, $J = 2,3$ Hz, 1 H, $\mathbf{H}_{\text{O-propargyle}}$) ; -2,86 (s, 2 H, $\mathbf{H}_{\text{NHint}}$).

SM (MALDI): $m/z = 906,40$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$

5-(4-propargyloxyphényl)-10,15,20-tris-(4-sulfonatophényl) porphyrinato zinc sel de sodium (10)



Dans un ballon de 100 mL, le composé **9** (255 mg ; 0,26 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 80 mL d'eau ultra pure auquel 192 mg d'acétate de zinc (1,05 mmol ; 4 éq.) sont ajoutés. Après 2 heures de réaction à reflux (100 °C) sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière. Le composé **10**, après lyophilisation, est obtenu sous l'aspect d'un solide vert avec un rendement de 189 mg (70 %).

$R_f = 0,6$ (CHCl₃/MeOH/H₂O : 5/4/1)

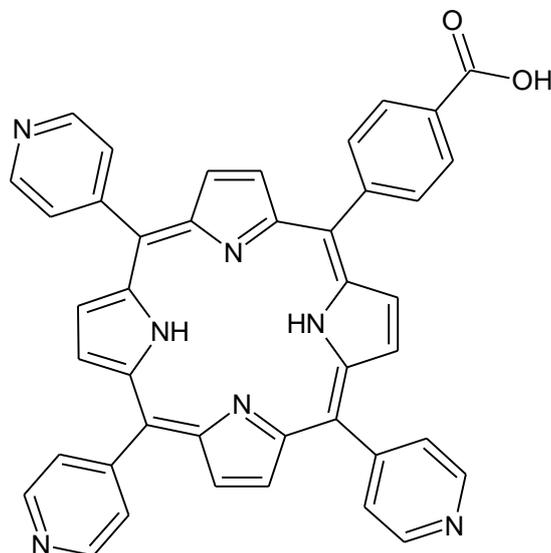
UV-Visible (H₂O), λ_{\max} en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 423 (200,7) ; 559 (106,4) ; 600 (48).

IR ν (cm⁻¹), KBr: 2120 (-C≡C-); 3281 (≡C-H).

RMN¹H (DMSO) (Tableau 10) : $\delta_{\text{ppm}} = 8,98$ (d, $J = 4,5$ Hz, 2 H, **H** _{β -pyrroliques}) ; 8,96 (d, $J = 4,5$ Hz, 2 H, **H** _{β -pyrroliques}) ; 8,83 (s, 4 H, **H** _{β -pyrroliques}) ; 8,20 (d, $J = 8$ Hz, 6 H, **H**_{3,5-phényl}) ; 8,12 (d, $J = 8$ Hz, 6 H, **H**_{2,6-phényl}) ; 7,93 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, **H**_{2,6-aryl}) ; 7,02 (d, $J = 8,2$ Hz, 2 H, **H**_{3,5-aryl}) ; 4,91 (d, $J = 2,3$ Hz, 2 H, **H**_{O-propargyle}) ; 2,62 (t, $J = 2,3$ Hz, 1 H, **H**_{O-propargyle}).

SM (MALDI): $m/z = 906,40[M-Zn]^+$

5-(4-carboxyphenyl)-10, 15,20-tris (4-pyridyl) porphyrine (11)



Dans un bicol de 500 mL, 1,27 g de 4-carboxybenzaldéhyde (8,48 mmol ; 1 éq.) sont dissous dans 250 mL d'acide propionique. 2,4 ml de 4-pyridinecarboxaldéhyde (25,38 mmol ; 3 éq.) sont ensuite additionnés au milieu réactionnel. Après 1 heure de reflux à 110 – 120 °C, le pyrrole (2,4 mL ; 33,84 mmol ; 4 éq.) fraîchement distillé est additionné goutte à goutte. La réaction se poursuit pendant 1 heure à 120°C, sous agitation et à l'abri de la lumière. Le solvant est ensuite évaporé à la pompe à palette. Le brut est ainsi absorbé sur florisol. On effectue une première purification sur colonne de silice (CHCl₃/EtOH : 95/5 ; 90/10 ; 70/30). Le produit issu de la colonne est enfin purifié par chromatographie sur plaques préparatives de silice (CHCl₃/EtOH : 85/15). Le composé **11** est obtenu, sous l'aspect d'un solide violet, avec un rendement de 178 mg (3 %).

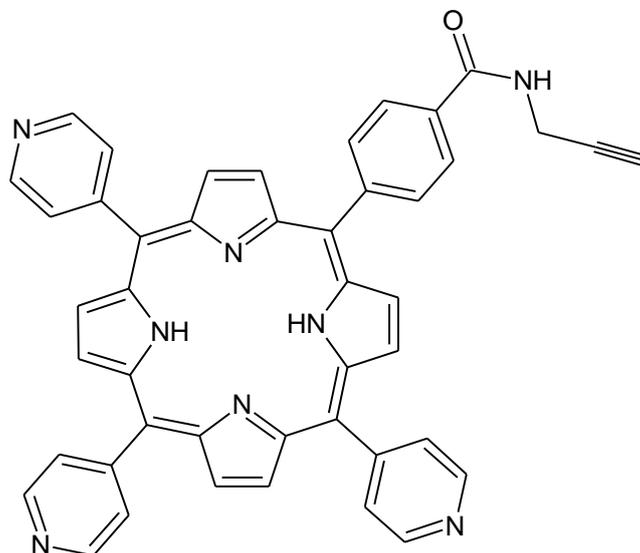
$R_f = 0,5$ (CH₂Cl/EtOH : 95/5)

UV- Visible (CHCl₃), λ_{\max} en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 418 (406,3) ; 513 (18) ; 543 (5,8) ; 588 (4,2) ; 643 (2,1).

RMN¹H (CDCl₃) (Tableau 11) : $\delta_{\text{ppm}} = 9,11$ (s, 4 H, **H** _{β -pyrroliques}); 9,07 (d, $J = 4,6$ Hz, 2 H, **H** _{β -pyrroliques}); 8,98 (d, $J = 5,1$ Hz, 6 H, **H**_{2,6-pyridyl}); 8,93 (d, $J = 5$ Hz, 2 H, **H** _{β -pyrroliques}); 8,36 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, **H**_{2,6-aryl}); 8,32 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, **H**_{3,5-aryl}); 8,20 (d, $J = 5,1$ Hz, 6 H, **H**_{3,5-pyridyl}) ; -2,69 (s, 2 H , **H**_{NHint}).

SM (MALDI): $m/z = 662, 19$ [M+H]⁺

5-(4-*N*propargylcarboxamidophenyl)-10, 15,20-tris (4-pyridyl) porphyrine (**12**)



Dans un ballon de 100 mL surmonté d'une garde à CaCl₂, le composé **11** (62 mg ; 0,093 mmol ; 1 éq.) est dissous dans 10 mL de DMF anhydre auquel 179,6 mg d'EDC (0,93 mmol ; 10 éq.) et 107 mg de NHS (0,93 mmol ; 10 éq.) sont ajoutés. Après 18 heures d'activation, la propargylamine (26 µL ; 0,37 mmol ; 4 éq.) est ajoutée au milieu réactionnel. La réaction est laissée à température ambiante et à l'abri de la lumière durant 3 heures. Après évaporation du DMF et purification par chromatographie sur plaques préparatives de silice (CHCl₃/EtOH : 90/10), le composé **12** sous aspect d'un solide violet est obtenu avec un rendement de 32 mg (49%).

$R_f = 0,5$ (CHCl₃/EtOH : 9/1)

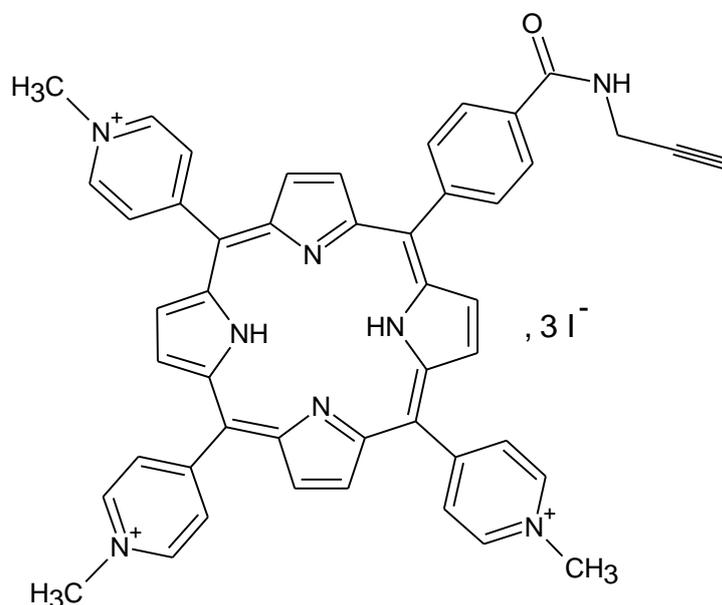
UV- Visible (CHCl₃), λ_{\max} en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 420 (406,3) ; 513 (18) ; 543 (5,8) ; 588 (4,2) ; 643 (2,1).

IR ν (cm⁻¹), KBr: 2117 (-C≡C-); 3279 (≡C-H); 1676 (C=O).

RMN¹H (CDCl₃) (Tableau 11) : $\delta_{\text{ppm}} = 9,11$ (s, 4 H, **H** _{β -pyrroliques}); 9,02 (d, $J = 4,7$ Hz, 2 H, **H** _{β -pyrroliques}); 8,95 (d, $J = 5,1$ Hz, 6 H, **H**_{2,6-pyridyl}); 8,90 (d, $J = 5$ Hz, 2 H, **H** _{β -pyrroliques}); 8,62 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, **H**_{2,6-aryl}); 8,40 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, **H**_{3,5-aryl}); 8,20 (d, $J = 5,1$ Hz, 6 H, **H**_{3,5-pyridyl}); 4,28 (d, $J = 5,2$ Hz, 1 H, **H**_{NH-propargyle}); 4,23 (dd, $J = 5,6$ Hz, $J = 2,4$ Hz, 1 H, **H**_{NH-propargyle}); 3,17 (d, $J = 3,2$ Hz, 1 H, **H**_{NH-propargyle}); -2,73 (s, 2 H, **H**_{NH-int.}).

SM (MALDI): $m/z = 699, 26$ [M+H]⁺

5-(4-propargylamidophenyl)-10, 15,20-tris (4-*N*-méthylpyridinium) Iodure porphyrine (13)



Dans un ballon de 50 mL, 22 mg de composé **12** (0,31 μmol ; 1 eq.) sont dissous dans 20 mL de DMF anhydre. 144 μL d'iodométhane (2,3 mmol ; 75 eq.) sont ajoutés et la réaction est laissée durant 24 heures sous argon à température ambiante. Après évaporation du DMF sous vide, précipitation dans l'éther diéthylique puis filtration, le composé **13** est obtenu sous l'aspect d'un solide vert avec un rendement quantitatif (34 mg).

$R_f = 0,4$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} : 5/4/1$)

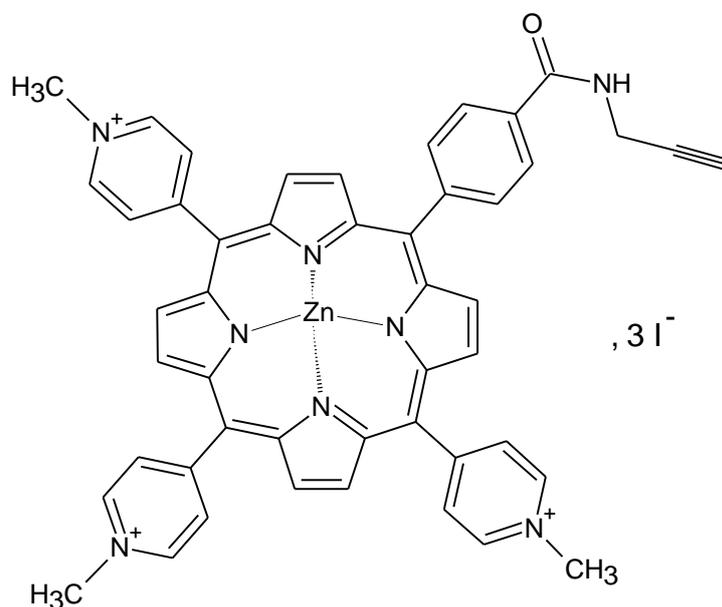
UV-Visible (H_2O), λ_{max} en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 435 (146,2) ; 510 (16,3) ; 563 (11,2) ; 607 (4,4) ; 647 (2,3).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 2120 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$); 3281 ($\equiv\text{C}-\text{H}$); 1696 ($\text{C}=\text{O}$).

$^1\text{H NMR}$ (DMSO) (Tableau 11) : $\delta_{\text{ppm}} = 9,48$ (d, $J = 6,2$ Hz, 6 H, $\mathbf{H}_{2,6\text{-pyridyl}}$); 9,14 (s, 4 H, $\mathbf{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$); 9,07 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$); 8,97 (d, $J = 5,7$ Hz, 6 H, $\mathbf{H}_{3,5\text{-pyridyl}}$); 8,93 (d, $J = 5$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$); 8,37 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, $\mathbf{H}_{2,6\text{-aryl}}$); 8,33 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, $\mathbf{H}_{3,5\text{-aryl}}$); 4,72 (s, 3 H, $\mathbf{H}_{\text{CH}_3\text{-pyridines}}$); 4,69 (s, 6 H, $\mathbf{H}_{\text{CH}_3\text{-pyridines}}$); 4,28 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, $\mathbf{H}_{\text{NH-propargyle}}$); 4,23 (dd, $J = 5,6$ Hz, $J = 2,4$ Hz, 1 H, $\mathbf{H}_{\text{NH-propargyle}}$); 3,17 (d, $J = 3,2$ Hz, 1 H, $\mathbf{H}_{\text{NH-propargyle}}$); -2,60 (s, 2 H, $\mathbf{H}_{\text{NHint.}}$).

SM (ESI): $m/z = 741, 31$ [$\text{M}-3\text{I}$]³⁺

5-(4-propargylamidophenyl)-10, 15,20-tris (4-N-méthylpyridium) Iodure porphyrinato zinc (14)



Dans un ballon de 50 mL, le composé **13** (27,4 mg ; 24,36 μmol ; 1 eq.) est dissous dans 20 mL d'eau ultra pure auquel 18 mg d'acétate de zinc (97,6 μmol ; 5 eq.) sont ajoutés. Après 2 heures de réaction à reflux (100 °C) sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière, le produit est mis sous dialyse (seuil de coupure= 1000 Da). Après lyophilisation, le composé **14** est obtenu sous l'aspect d'un solide vert avec un rendement de 26 mg (66 %).

$R_f = 0,4$ ($\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O} : 5/4/1$)

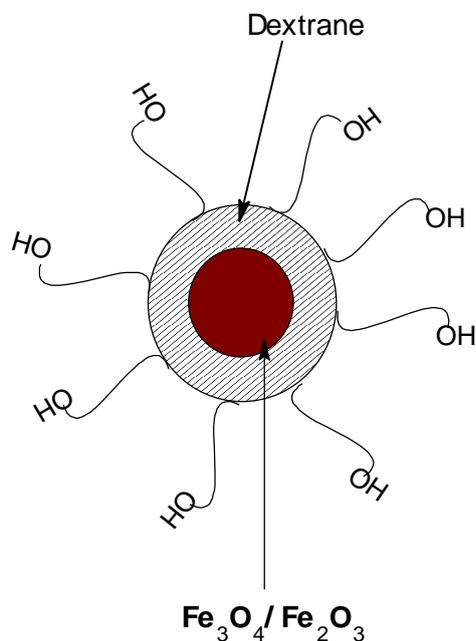
UV-Visible (H_2O), λ_{max} en nm ($\epsilon \cdot 10^{-3}$) : 435 (146,2) ; 563 (11,2) ; 607 (4,4).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 2120 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$); 3281 ($\equiv\text{C}-\text{H}$); 1643 ($\text{C}=\text{O}$).

RMN^1H (DMSO) (Tableau 11) : $\delta_{\text{ppm}} = 9,46$ (d, $J = 6,2$ Hz, 6 H, $\text{H}_{2,6\text{-pyridyl}}$); 9,16 (s, 4 H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$); 9,07 (d, $J = 4,8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$); 8,99 (d, $J = 5,7$ Hz, 6 H, $\text{H}_{3,5\text{-pyridyl}}$); 8,96 (d, $J = 5,1$ Hz, 2 H, $\text{H}_{\beta\text{-pyrroliques}}$); 8,37 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{2,6\text{-aryl}}$); 8,33 (d, $J = 8,4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{3,5\text{-aryl}}$); 4,72 (s, 3 H, $\text{H}_{\text{CH}_3\text{-pyridines}}$); 4,71 (s, 6 H, $\text{H}_{\text{CH}_3\text{-pyridines}}$); 4,28 (d, $J = 5,2$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\text{NH-propargyle}}$); 4,25 (dd, $J = 5,6$ Hz, $J = 2,4$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\text{NH-propargyle}}$); 3,17 (d, $J = 3,2$ Hz, 1 H, $\text{H}_{\text{NH-propargyle}}$).

SM (ESI): $m/z = 805, 24$ [$\text{M}-3\text{I}$]³⁺

Nanoparticules d'oxyde de fer recouvertes de Dextrane T10 (15)

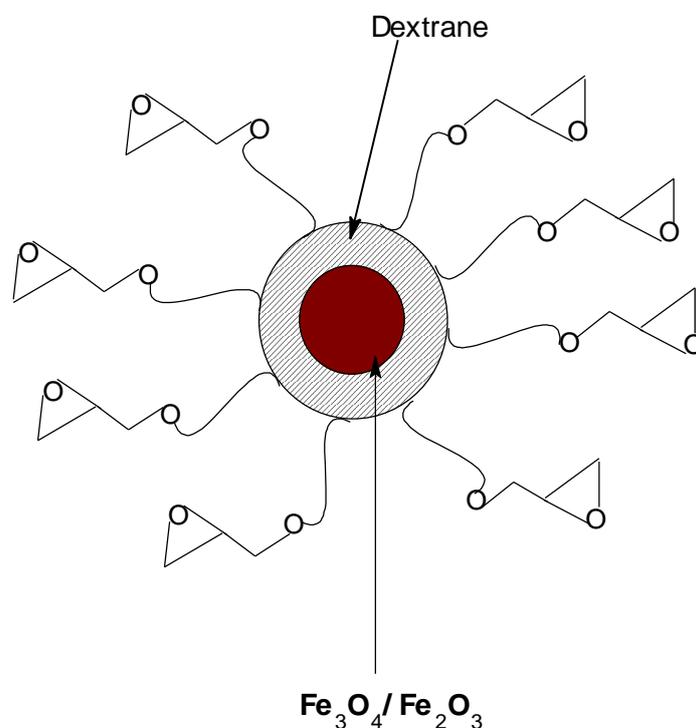


2 g de dextrane T10 (masse molaire moyenne 10 000 Da) sont dissous dans 35 mL d'eau ultra pure. Le chlorure de fer (III) hexahydraté (1 g ; 3,7 mmol) et le chlorure de fer (II) tétrahydraté (0,5 g ; 2,5 mmol), préalablement dissous dans 27 mL d'eau ultra pure, sont ensuite ajoutés. Après 30 minutes de réaction à température ambiante sous agitation magnétique et sous azote, l'hydroxyde d'ammonium à 28 % (9,34 mL ; 66,6 mmol) est additionné goutte à goutte au milieu réactionnel. Après 2 h de réaction à 90 °C sous agitation magnétique, le produit est purifié par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne sephadex LH20. Le produit ainsi purifié est mis sous dialyse (seuil de coupure : 6000-8000 Da). Le composé **15** est obtenu, après lyophilisation avec une masse de 3,6 g.

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3367 (ν_{OH} de valence du OH dextrane), 2921 ($\nu_{\text{C-H}}$ de valence des C-H), 1646 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane), 1342 (ν_{CH_2} de déformation des liaisons C-H), 1206 et 1274 ($\nu_{\text{C-O}}$ d'élongation), 1013 et 1110 ($\nu_{\text{C-O}}$ de valence).

Analyse élémentaire : %C = 33,15, %H = 5,52 et %O = 36,92

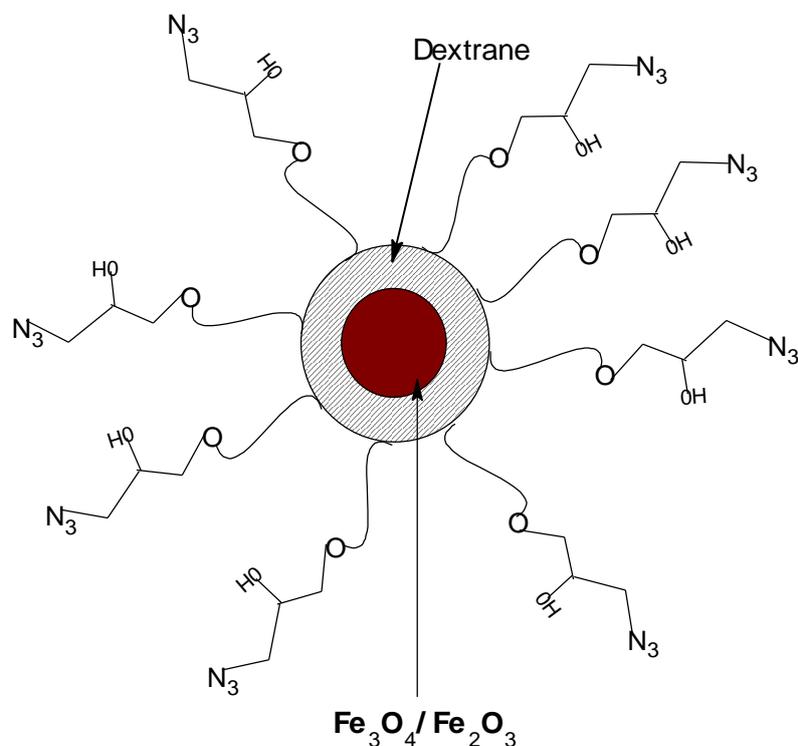
Fixation des époxydes sur les nanoparticules (16)



Les nanoparticules d'oxyde de fer (3,6 g), préalablement lyophilisées, sont introduites dans 125 mL d'eau ultra pure. De la soude à 1M (0,8 L ; 0,5 mol soit 400 mL / g de dextran) est ajouté à la solution de nanoparticules d'oxyde de fer. Après 30 minutes de réaction à reflux (60 °C) sous agitation magnétique, l'épichlorhydrine (11,3 mL ; 144 mmol soit 72 mmol/g de dextran) est additionnée goutte à goutte. Après 2 heures de réaction à 60 °C, les nanoparticules réticulées sont mises sous dialyse (seuil de coupure : 6000 – 8000 Da) durant 72 heures. Le composé **16** est ainsi obtenu avec une masse de 3 g.

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3367 (ν_{OH} de valence du OH dextrane), 2921 ($\nu_{\text{C-H}}$ de valence des C-H), 1646 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane), 1342 (ν_{CH_2} de déformation des liaisons C-H), 1206 et 1274 ($\nu_{\text{C-O}}$ d'élongation), 1013 et 1110 ($\nu_{\text{C-O}}$ de valence).

Nanoparticules d'oxyde de fer Azidées (17)



3 g de nanoparticules époxydées sont introduites dans 100 mL d'eau ultra pure. De l'azidure de sodium NaN_3 (9,36 g ; 144 mmol ; 1éq/mol d'époxyde) est par la suite ajouté. Après 24 heures de réaction à reflux (80 °C) et sous agitation magnétique, le produit est mis sous dialyse (seuil de coupure : 6000 – 8000 Da) durant 72 heures. Après lyophilisation, le composé **17** est obtenu avec 2,8 g.

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3367 (ν_{OH} de valence du OH dextrane), 2921 ($\nu_{\text{C-H}}$ de valence des C-H), 2110 (ν_{N_3}), 1646 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane), 1342 (ν_{CH_2} de déformation des liaisons C-H), 1206 et 1274 ($\nu_{\text{C-O}}$ d'élongation), 1013 et 1110 ($\nu_{\text{C-O}}$ de valence).

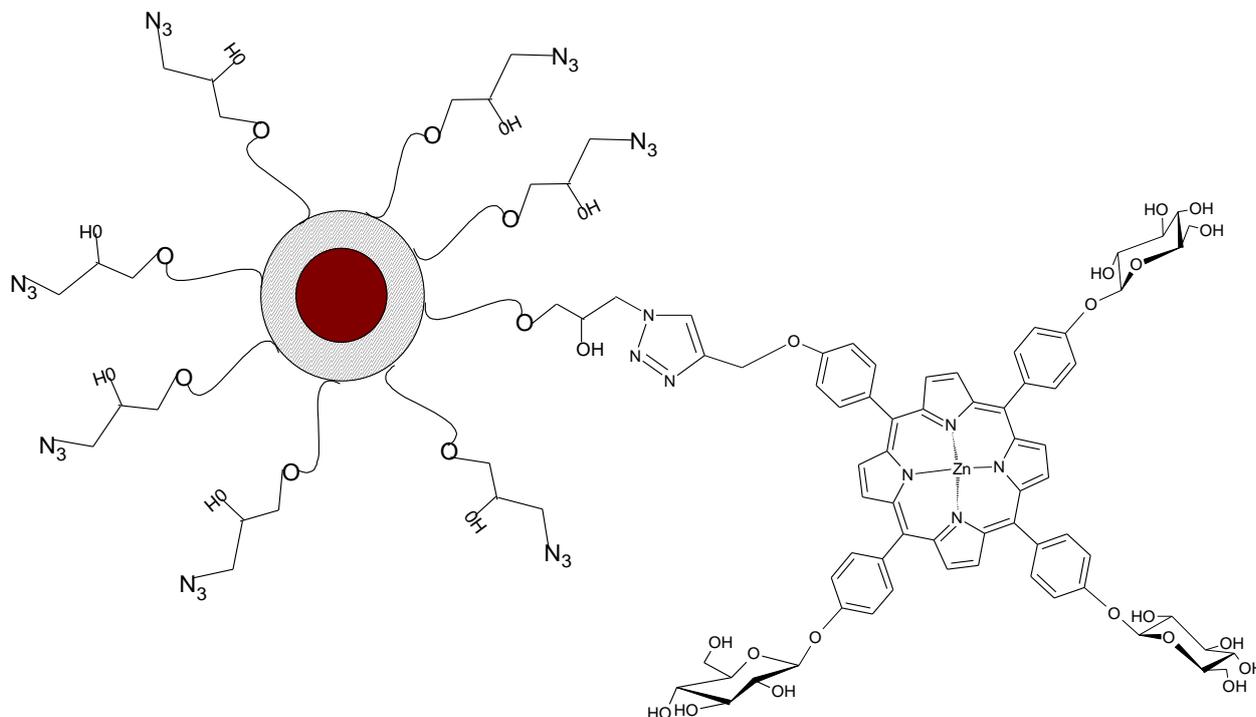
Analyse élémentaire : %C = 42,45, %H = 6,23, %, %O = 39,14 et %N = 1,11

DS = 0,056 (en N_3).

Procédure générale d'élaboration des nanoparticules d'oxyde de fer porphyriniques

Le composé porphyrinique **6**, **10** ou **14** (1éq.) est mis en présence d'acétate de cuivre (5 éq.) et d'ascorbate de sodium (5 éq.) qui sont solubilisés dans un minimum d'eau. Les nanoparticules préalablement azidées sont par la suite introduites dans le milieu réactionnel précédent. Après 24 heures de réaction à température ambiante sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière, le produit est mis sous dialyse (seuil de coupure : 6000 -8000 Da) durant 72 heures. Après plusieurs jours de lyophilisation, les nanoparticules porphyriniques sont obtenues sous forme solide.

Nanoparticules d'oxyde de fer – Porphyrine neutre (18)



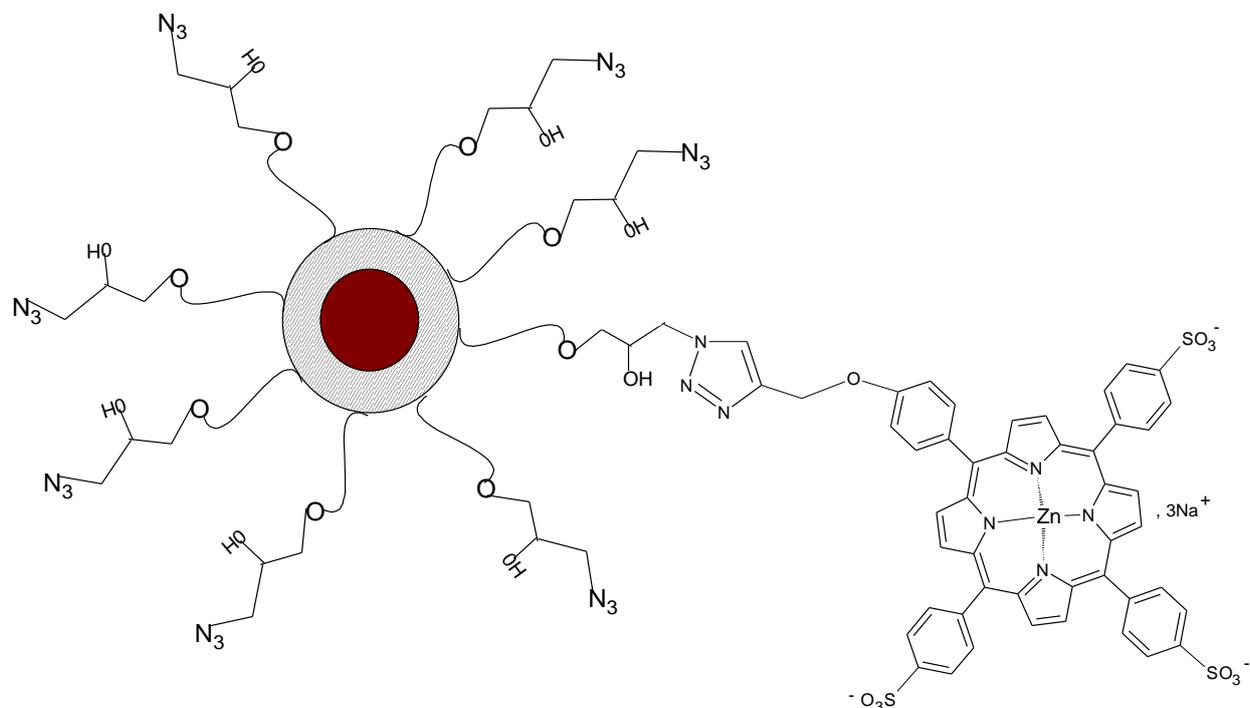
A partir du composé **6** (12 mg ; 8,7 μmol ; 1 eq.), de 8 mg d'acétate de cuivre (43,6 μmol ; 5 eq.) et de 10 mg d'ascorbate de sodium (50,5 μmol ; 6 eq.), les nanoparticules neutres **18** sont obtenues avec un rendement relatif de greffage de 24 % (molaire).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3367 (ν_{OH} de valence du OH dextrane), 2921 ($\nu_{\text{C-H}}$ de valence des C-H), 2110 (ν_{N_3}), 1646 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane), 1342 (ν_{CH_2} de déformation des liaisons C-H), 1206 et 1274 ($\nu_{\text{C-O}}$ d'élongation), 1013 et 1110 ($\nu_{\text{C-O}}$ de valence).

UV-Visible (H_2O), 416 nm et 441 nm (bandes de Soret).

Fluorescence : Emission = 605 nm (excitation à 441 nm).

Nanoparticule d'oxyde de fer – Porphyrine anionique (19)



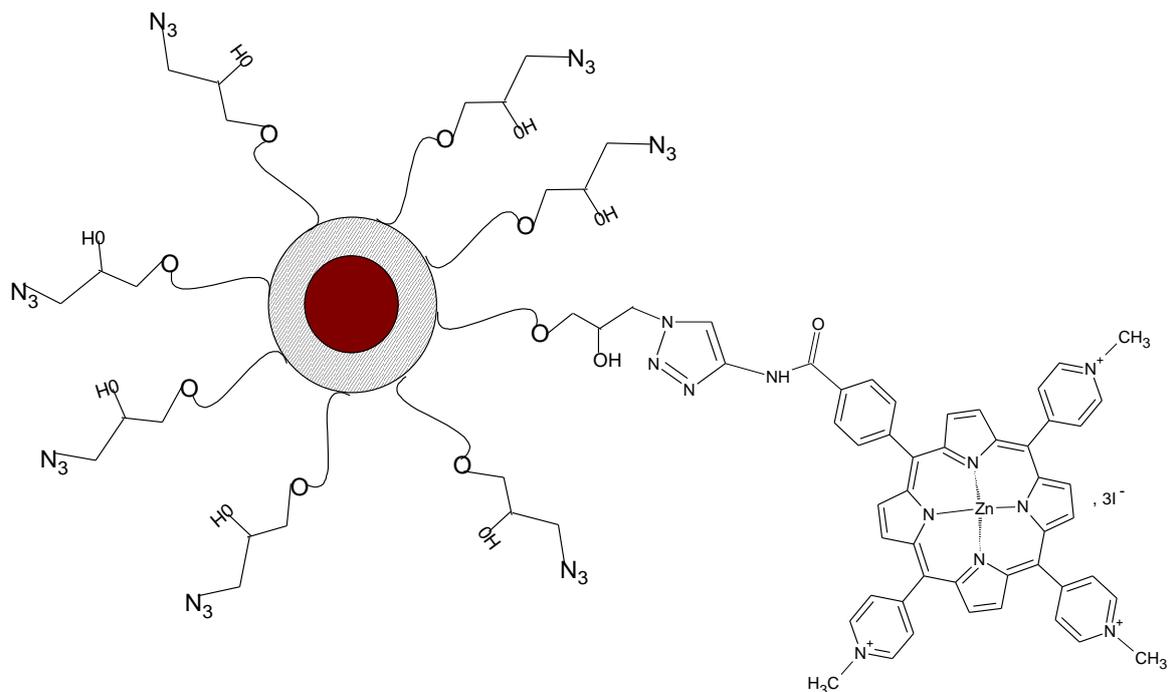
A partir du composé **10** (9 mg ; 8,7 μmol ; 1 eq.), de 8 mg d'acétate de cuivre (43,6 μmol ; 5 eq.) et de 10 mg d'ascorbate de sodium (50,5 μmol ; 6 eq.), les nanoparticules anioniques **19** sont obtenues avec un rendement relatif de greffage de 49 % (molaire).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3367 (ν_{OH} de valence du OH dextrane), 2921 ($\nu_{\text{C-H}}$ de valence des C-H), 2110 (ν_{N_3}), 1646 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane), 1342 (ν_{CH_2} de déformation des liaisons C-H), 1206 et 1274 ($\nu_{\text{C-O}}$ d'élongation), 1013 et 1110 ($\nu_{\text{C-O}}$ de valence).

UV-Visible (H_2O), 423 nm (bande de Soret).

Fluorescence : Emission = 641 nm (excitation à 423 nm).

Nanoparticule d'oxyde de fer – Porphyrine cationique (20)



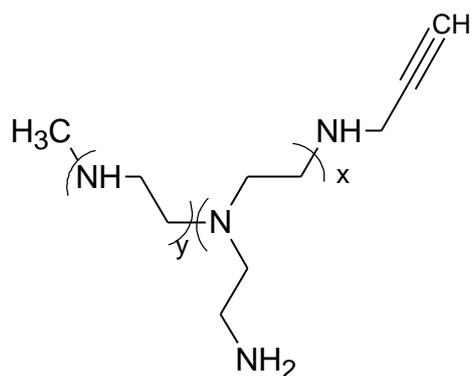
A partir du composé **14** (14 mg ; 8,7 μmol ; 1 eq.), de 8 mg d'acétate de cuivre (43,6 μmol ; 5 eq.) et de 10 mg d'ascorbate de sodium (50,5 μmol ; 6 eq.), les nanoparticules cationiques **20** est obtenu avec un rendement relatif de greffage de 43 % (molaire).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3367 (ν_{OH} de valence du OH dextrane), 2921 ($\nu_{\text{C-H}}$ de valence des C-H), 2110 (ν_{N_3}), 1646 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane), 1342 (ν_{CH_2} de déformation des liaisons C-H), 1206 et 1274 ($\nu_{\text{C-O}}$ d'élongation), 1013 et 1110 ($\nu_{\text{C-O}}$ de valence).

UV-Visible (H_2O), 435 nm (bande de Soret).

Fluorescence : Emission = 629 nm (excitation à 435 nm).

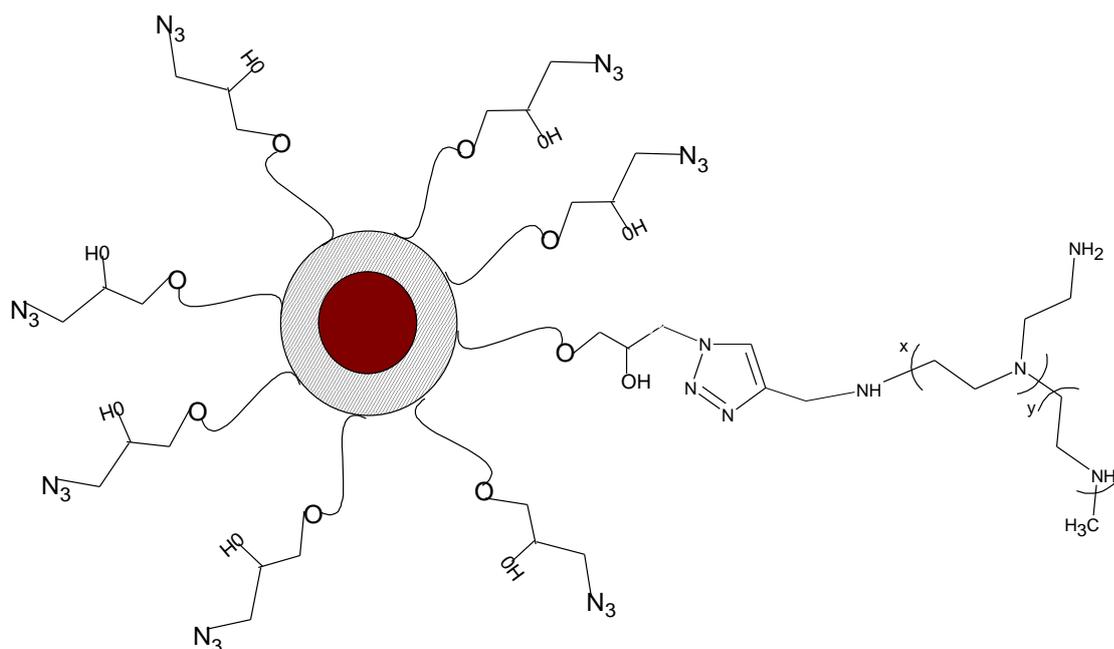
Polyéthylèneimine 600 propargylée (21)



Dans un ballon de 100 mL, 1g de PEI 600 (0,02 mol d'amine) sont dissous dans 50 mL de DMF. Le bromure de propargyle (11 mL ; 0,12 mol ; soit 5 équ.) est ensuite ajouté au milieu réactionnel. Après 24 heures de réaction à température ambiante sous agitation magnétique, le DMF est évaporé à la pompe à palette. Après précipitation dans l'éthanol puis filtration, le composé **21** est obtenu sous l'aspect d'un solide jaune avec un rendement 96 mg (74 %).

IR ν (cm⁻¹), KBr: 3438 ($\nu_{\text{N-H}_{\text{secondaire}}}$), 2114,2 ($\nu_{\text{C}\equiv\text{C}_{\text{propargyle}}}$), 1644 (ν_{NH_2}), 1121,6 ($\nu_{\text{C-N}}$).

Nanoparticule d'oxyde de fer – Polyéthylène imine 600 (22)



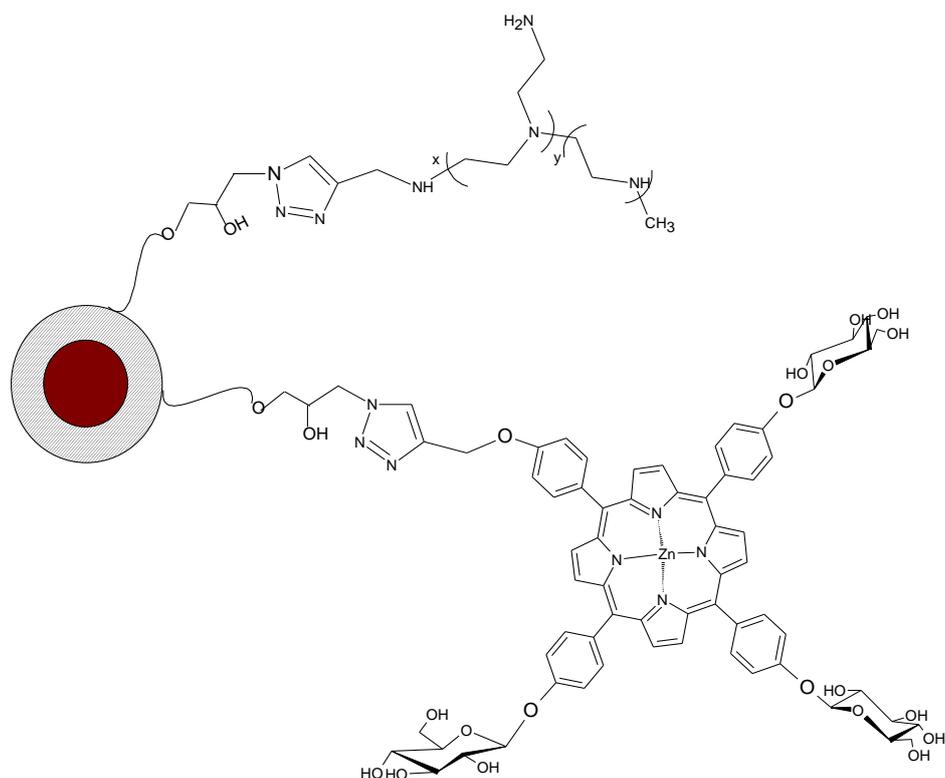
A une solution de **21** (57,6 mg ; 0,096 mmol ; 1 éq.) dans 30 mL d'eau ultra pure, on introduit les nanoparticules d'oxyde de fer azidées **17** (40 mg). 8 mg (0,044 mmol ; 2 éq. /**21**) d'acétate de cuivre et 10 mg (0,05 mmol ; 2 éq. /**21**) d'ascorbate de sodium, solubilisés dans un minimum d'eau, sont ensuite additionnés. Après 24 heures de réaction à température ambiante sous agitation magnétique, le produit est mis sous dialyse (seuil de coupure de 6000 - 8000 Da) durant 72 heures. Après lyophilisation, la nanoparticule **22** est ainsi obtenue.

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3343 (ν_{OH} dextrane), 2921 ($\nu_{\text{N-H}}$), 2081 (ν_{N_3}), 1644 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane), 1342 (ν_{CH_2} de déformation des liaisons C-H), 1207 et 1278 ($\nu_{\text{C-O}}$ d'élongation).

Procédure générale d'élaboration des nanoparticules d'oxyde de fer porphyriniques avec des motifs polyéthylènimine (PEI)

On utilise la même procédure que précédemment. Le composé porphyrinique **6**, **10** ou **14** (1 éq.) est mis en présence d'acétate de cuivre (5 éq.) et d'ascorbate de sodium (5 éq.) qui sont solubilisés dans un minimum d'eau avant d'être additionné dans le milieu réactionnel. Les nanoparticules préalablement « cliquées » à la PEI 600 sont par la suite introduites dans le milieu réactionnel. Après 24 heures de réaction à température ambiante sous agitation magnétique et à l'abri de la lumière, le produit est mis sous dialyse (seuil de coupure : 6000 - 8000 Da) durant 72 heures. Après plusieurs jours à lyophilisation, les nanoparticules porphyriniques avec des motifs PEI sont obtenues.

Nanoparticule d'oxyde de fer – Polyéthylèneimine – Porphyrine neutre (23)



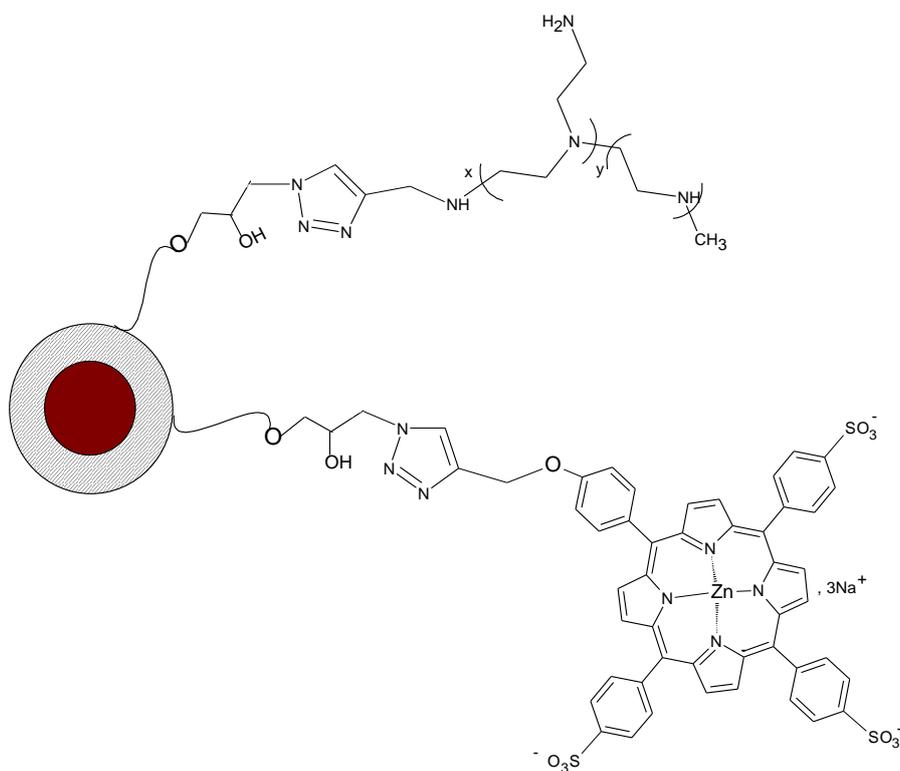
A partir du composé **6** (12 mg ; 8,7 μmol ; 1 eq.), de 8 mg d'acétate de cuivre (43,6 μmol ; 5 eq.) et de 10 mg d'ascorbate de sodium (50,5 μmol ; 6 eq.), les nanoparticules neutres **18** est obtenu avec un rendement relatif de greffage de 18 % (molaire).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3343 (ν_{OH} dextrane), 2921 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1644 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane).

UV-Visible (H_2O), 416 nm et 441 nm (bandes de Soret).

Fluorescence : Emission = 605 nm (excitation à 441 nm).

Nanoparticule – Polyéthylèneimine – Porphyrine anionique (24)



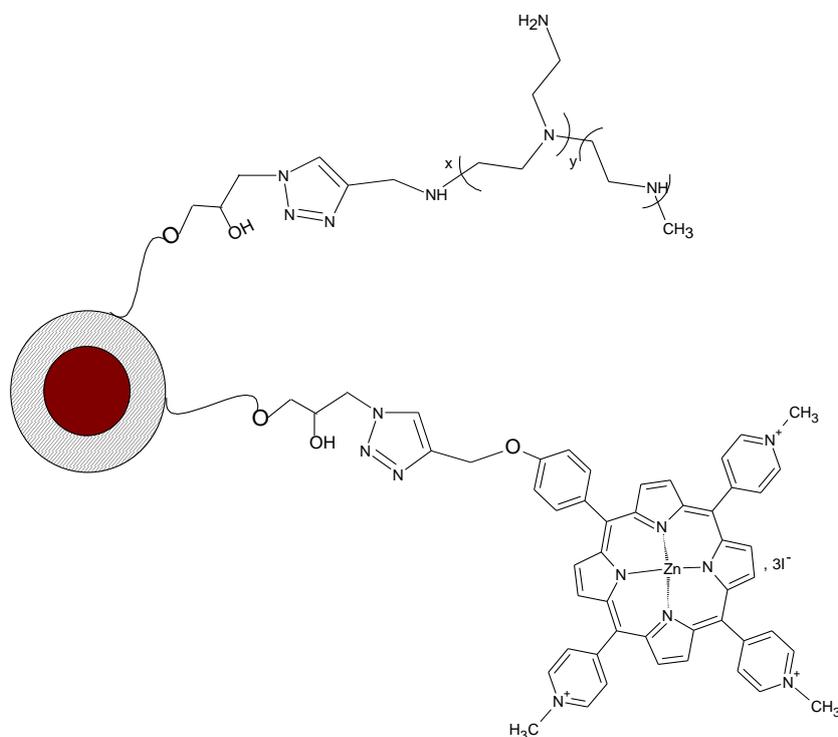
A partir du composé **10** (9 mg ; 8,7 μmol ; 1 eq.), de 8 mg d'acétate de cuivre (43,6 μmol ; 5 eq.) et de 10 mg d'ascorbate de sodium (50,5 μmol ; 6 eq.), les nanoparticules anioniques **19** sont obtenues avec un rendement relatif de greffage de 34 % (molaire).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3359 (ν_{OH} dextrane), 2921 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1644 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane).

UV-Visible (H_2O), 423 nm (bande de Soret).

Fluorescence : Emission = 641 nm (excitation à 423 nm).

Nanoparticule d'oxyde de fer – Polyéthylèneimine – Porphyrine cationique (25)



A partir du composé **14** (14 mg ; 8,7 μmol ; 1 eq.), de 8 mg d'acétate de cuivre (43,6 μmol ; 5 eq.) et de 10 mg d'ascorbate de sodium (50,5 μmol ; 6 eq.), les nanoparticules cationiques **20** est obtenu avec un rendement relatif de greffage de 32 % (molaire).

IR ν (cm^{-1}), KBr: 3359 (ν_{OH} dextrane), 2921 ($\nu_{\text{N-H}}$), 1644 (ν_{OH} des OH de l'eau lié au dextrane).

UV-Visible (H_2O), 435 nm (bande de Soret).

Fluorescence : Emission = 629 nm (excitation à 435 nm).

5- Evaluation biologique

5-1- Culture cellulaire

Pour évaluer la cytotoxicité des molécules synthétisées, nous avons utilisé une lignée cellulaire de kératinocytes humains, les cellules Hacat. Les cellules sont entretenues dans un milieu de culture spécifique KFSM (*Keratinocyte Serum Free Medium*, GibcoBRL, Invitrogen, Cergy-pontoise) dans une atmosphère contrôlée (37 °C, 5 % CO₂ et 95 % d'humidité). Le KFSM est complété avec de l'extrait pituitaire bovin (*Bovine Pituitary Extract*, BPE) et du facteur de croissance épidermique recombinant (*recombinant Epidermal Growth Factor*, rEGF) respectivement à des concentrations finales de 25 µg/ml et 1,5 ng/ml. La culture cellulaire est effectuée de manière stérile sous une hotte à flux laminaire et contrôlée quotidiennement à l'aide d'un microscope à contraste de phase.

5-2- Evaluation de la photocytotoxicité des molécules synthétisées

5-2-1- Principe

L'effet photocytotoxique est évalué par un test MTT. Le test MTT (Mosmann, 1983) est une technique colorimétrique basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl tetrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. La quantité de cristaux de formazan formés est proportionnelle au nombre de cellules viables. Les cristaux de formazan sont solubilisés et détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 595 nm.

5-2-2- Méthodologie

Les cellules Hacat sontensemencées en plaques 96 puits à une densité de 5000 cellules par puits dans un volume de 200µl dans le milieu de culture KFSM, 48h avant traitement avec les actifs. Pour chaque condition analysée, 3 puits différents sont réalisés. Après 48h de culture, les cellules sont incubées pendant 2 h à 37 °C en présence des différents actifs à des concentrations de 0 à 1000 nM en effectuant des dilutions au demi en série.

Au bout de 2 h d'incubation, le milieu contenant les drogues est retiré et les cellules sont lavées par du milieu de culture. Les cellules sont irradiées en présence d'une lumière visible (à une fluence de 25 J/cm² fournie par une lampe de 18 W). Après irradiation, les cellules sont incubées à 37 °C sous atmosphère contrôlée (5 % CO₂ et 95 % d'humidité). 24 h après irradiation, 15 µl de solution de MTT (Promega) sont ajoutés dans chaque puits à une concentration finale de 0.4 mg/ml. Après 3h d'incubation à 37 °C en atmosphère contrôlée, les plaques 96 puits sont centrifugées à 4000 rpm à température ambiante pendant 15 minutes afin de culotter les cellules ainsi que les cristaux de formazan formés. Le milieu de chaque puits est retiré et les cristaux de formazan sont solubilisés par 200 µl de DMSO puis les plaques sont incubées toute la nuit à 37 °C. L'absorbance est mesurée à 595 nm par un lecteur de plaques (TRIAD, Dynex Technologies). Les résultats sont présentés en pourcentage par rapport au contrôle négatif (cellules non-incubées avec les drogues) :

$(DO \text{ moyenne des cellules traitées} / DO \text{ moyenne des cellules contrôles}) \times 100 \pm \text{écart-type}$; ou présentés sous forme de courbes traçant l'évolution de l'absorbance à 595nm (activité déshydrogénase résiduelle) en fonction du temps.

L'effet cytotoxique intrinsèque des PS est évalué en réalisant des plaques 96 puits dans les mêmes conditions que décrites précédemment mais sans irradiation lumineuse.

Pour chaque PS, la valeur IC50 (concentration nécessaire pour diminuer de 50 % la viabilité cellulaire) est obtenue après une analyse par régression non-linéaire

5-3- Etude de la pénétration cellulaire des photosensibilisateurs

5-3-1- Principe

La pénétration effective et sélective des photosensibilisateurs à l'intérieur des cellules tumorales est un paramètre crucial de leur efficacité, puisque l'irradiation lumineuse active ces molécules qui génèrent un grand rendement quantique en oxygène singulet à l'origine de l'induction de voies de signalisation de mort. Il est possible de suivre la pénétration des PS dans les cellules par microscopie confocale.

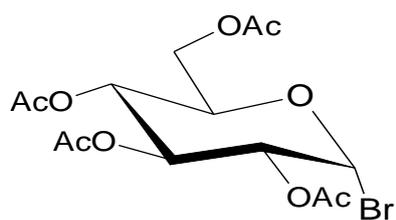
5-3-2- Méthodologie

Les cellules HacaT sontensemencées à raison de 20 000 cellules par puits dans des chambres de culture type LabTek 8 puits (Corning) et incubées à 37 °C à 5 % de CO₂. Après 48 h, le milieu de culture est retiré et remplacé par les différentes concentrations de PS préparés extemporanément dans du milieu de culture complet. Après 2 h d'incubation, le milieu contenant l'excès de PS est enlevé et trois lavages des cellules au PBS 1X sont réalisés. Ensuite, les cellules sont analysées par microscopie

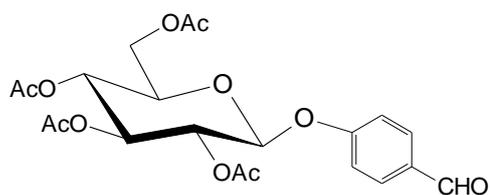
confocale (LSM510 META, Zeiss) et la fluorescence émise est visualisée après excitation à 405 nm (diode UV).

Produits synthétisés

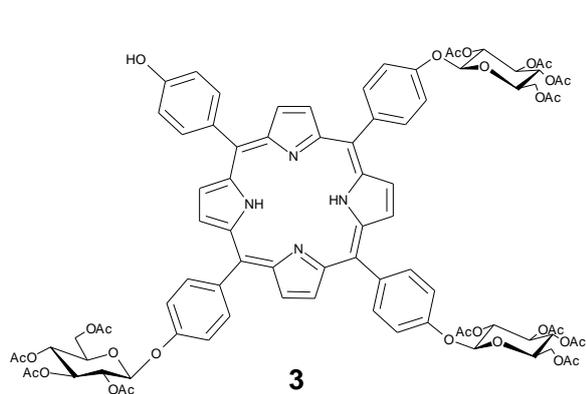
Produits synthétisés



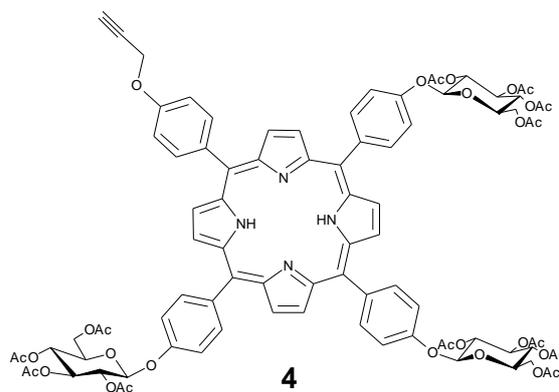
1



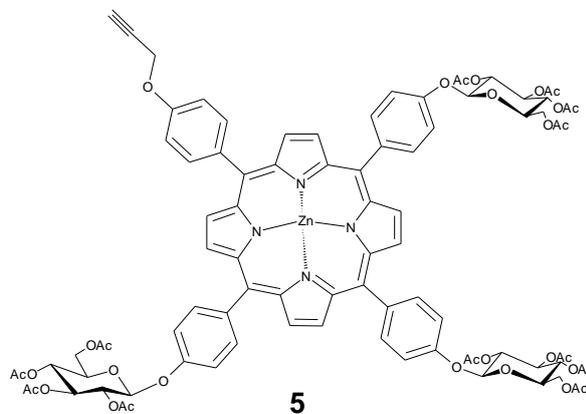
2



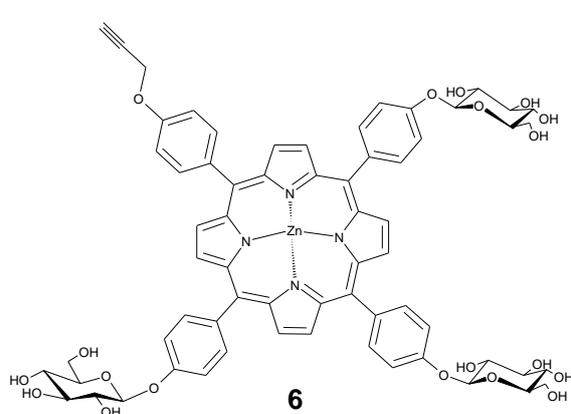
3



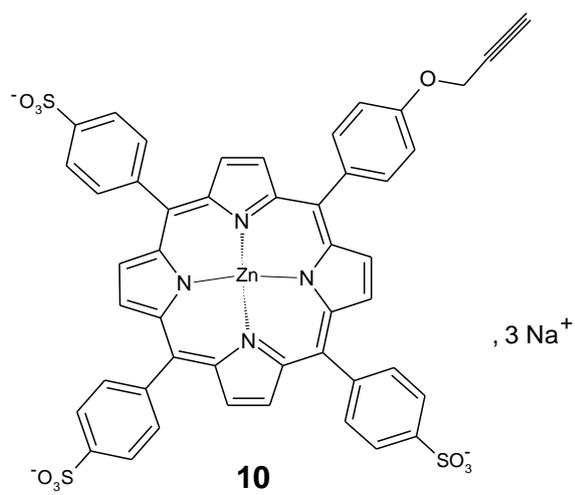
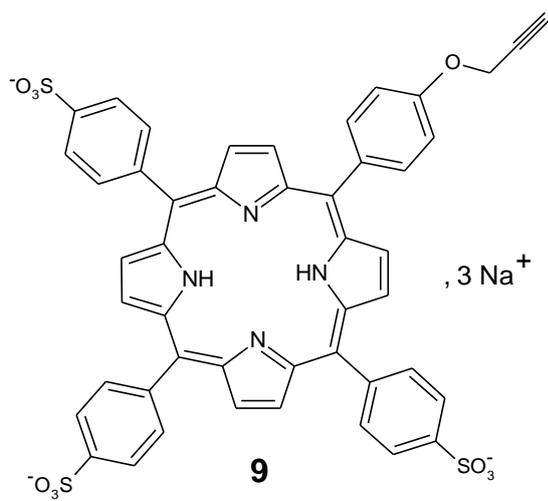
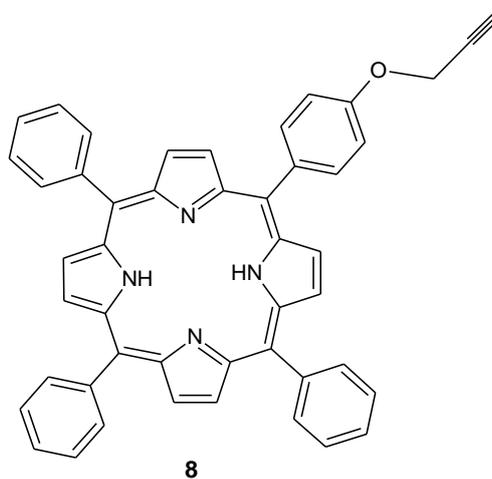
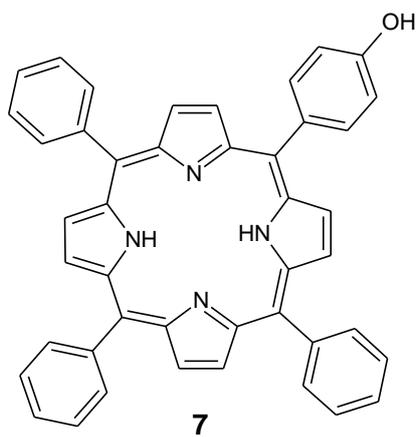
4

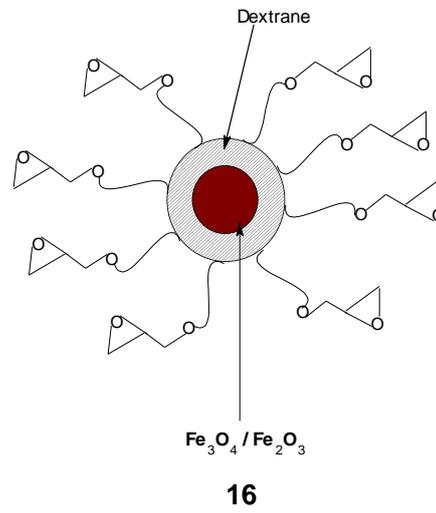
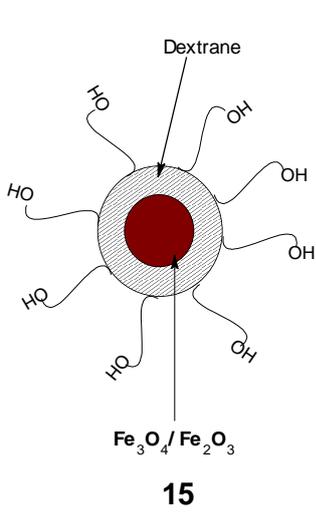
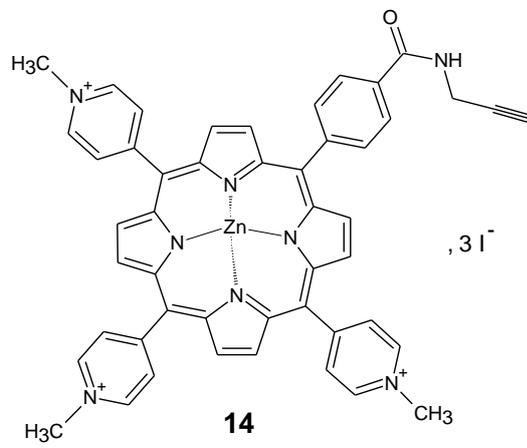
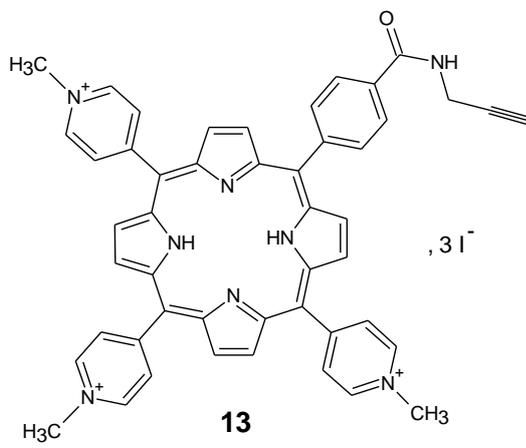
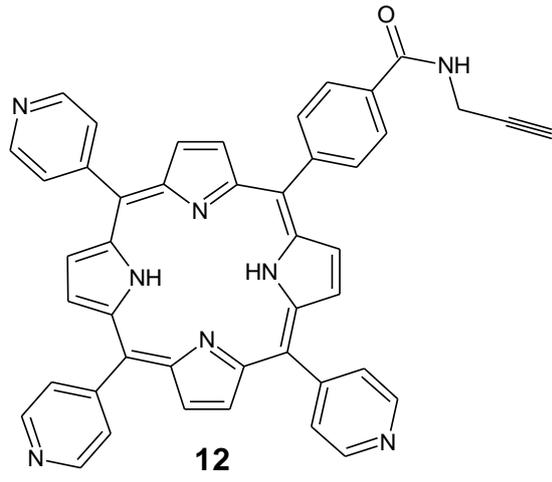
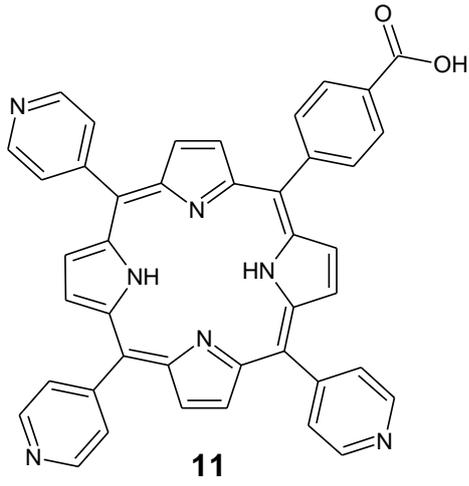


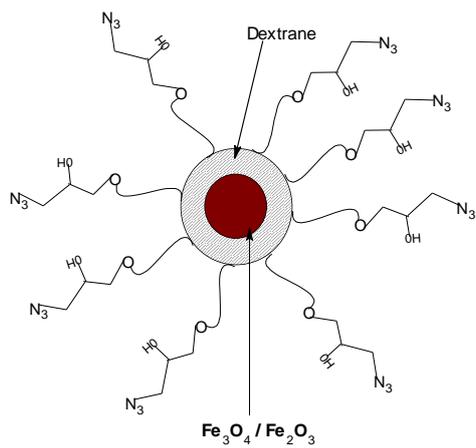
5



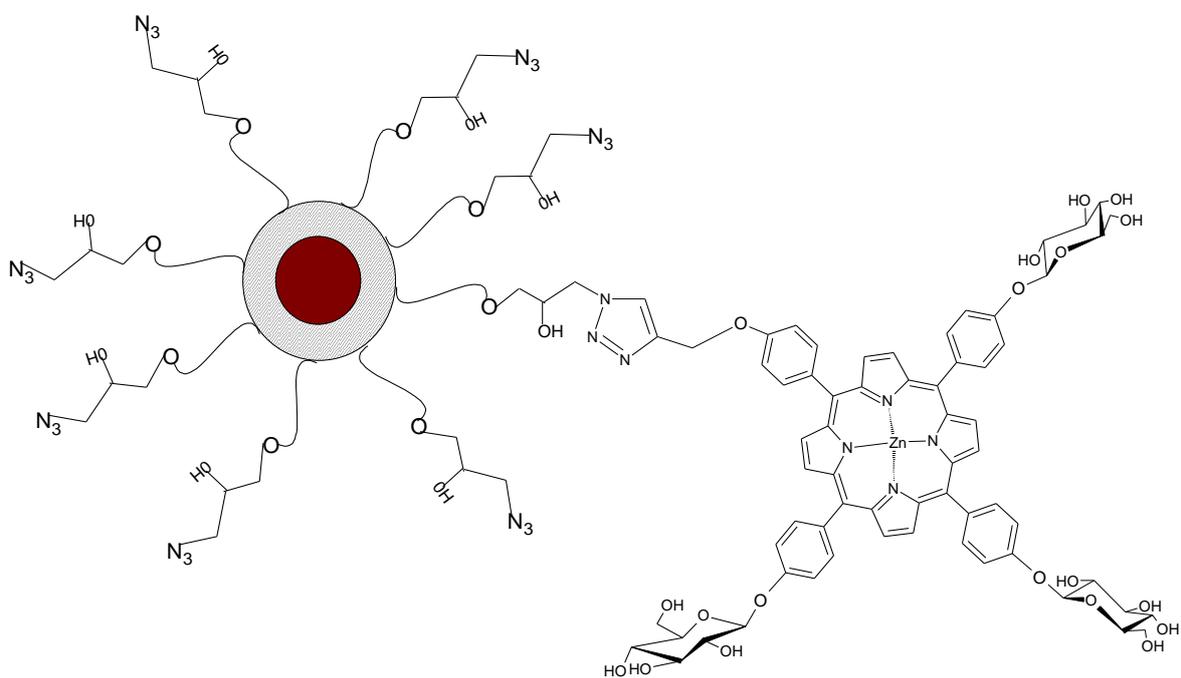
6



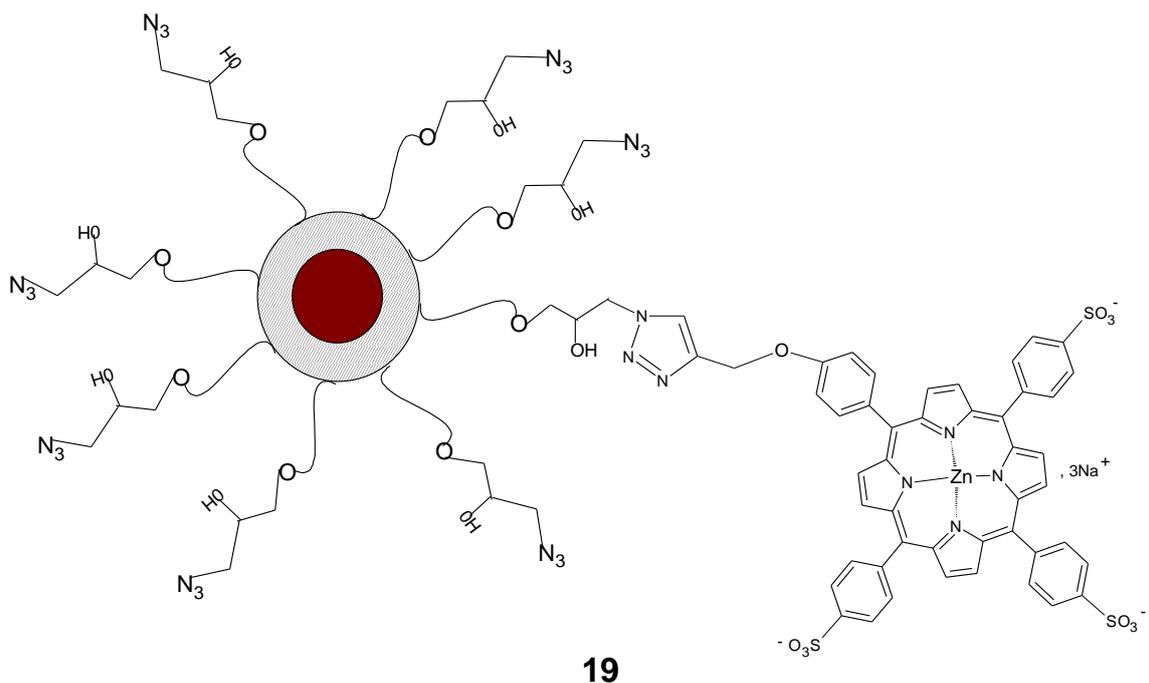




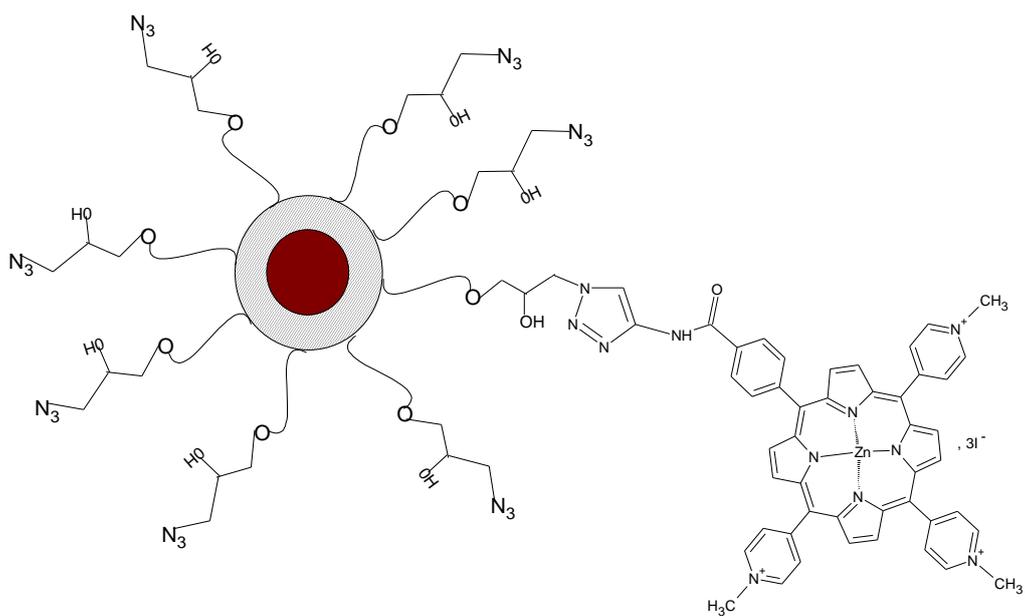
17



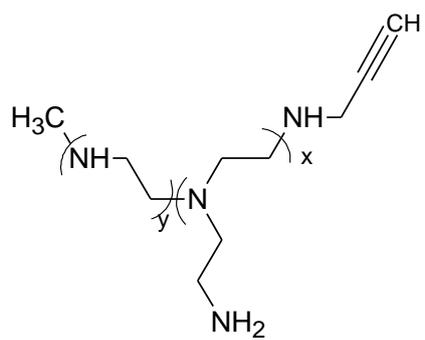
18



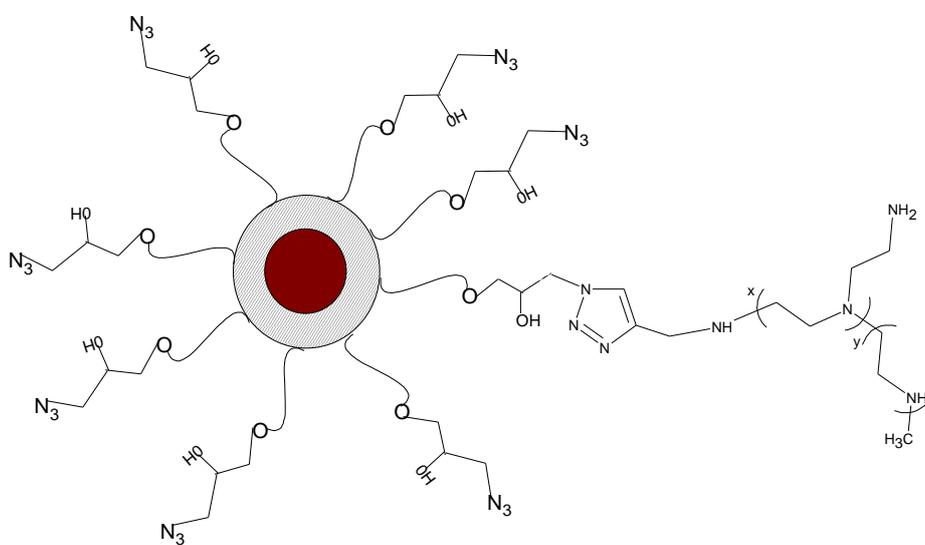
19



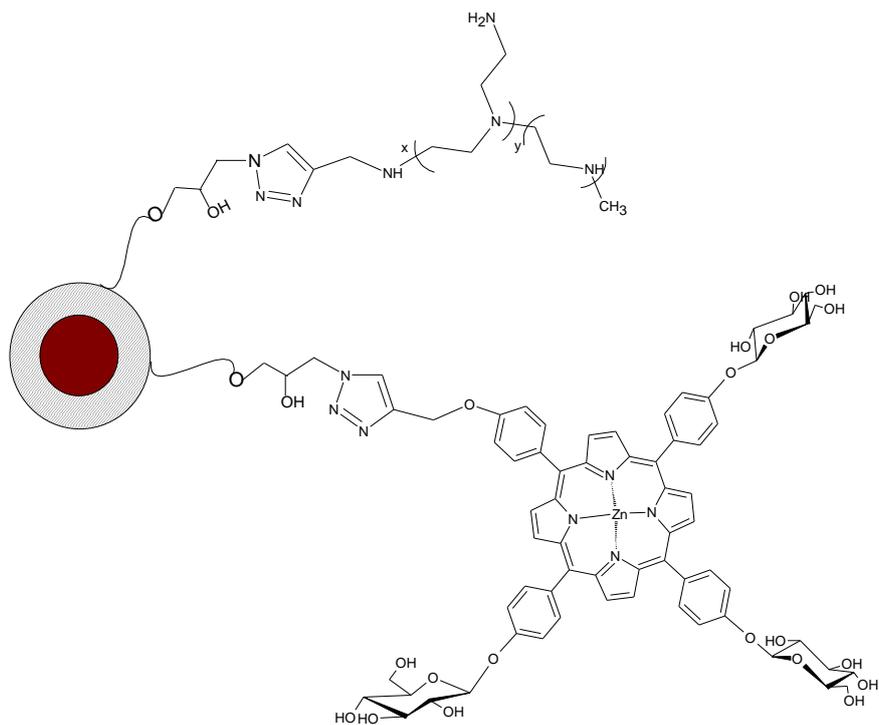
20



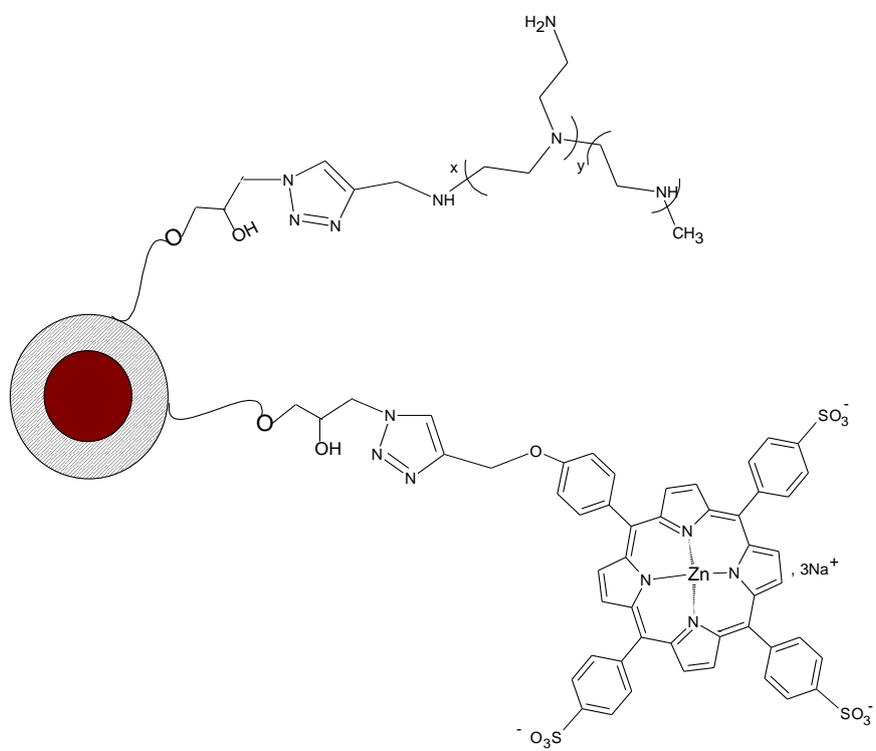
21



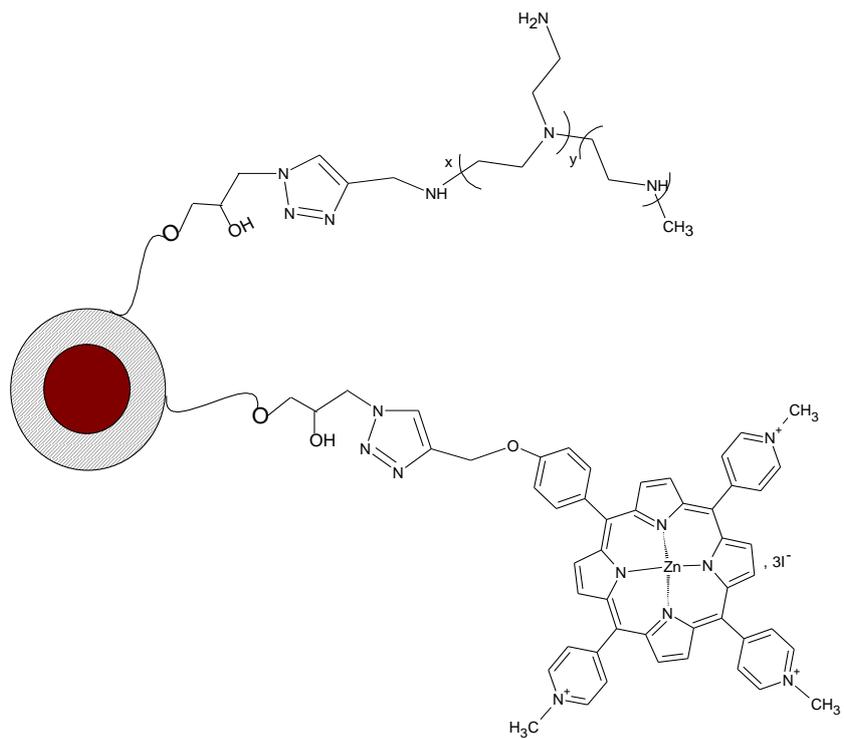
22



23



24



25

Références

-
- ^[1] Carlos Sonnenschein, Ana M. Soto, *Seminars in Cancer Biology*, **2008**, 18, 372-377.
- ^[2] G. Bergers and L. E. Benjamin., *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 401-410.
- ^[3] R. Kalluri., *Nat. Rev. Cancer*, **2003**, 3, 422-433.
- ^[4] Riseau, W., *Nature*, **1997**, 386, 671- 4.
- ^[5] L. P. Reynolds, A. T. Grazul-Bilska, and D. A. Redmer, *Int. J. Exp. Pathol.*, **2002**, 83, 151.
- ^[6] J. Li, Y.-P. Zang, and R. Kirsner, *Micros. Res. Tech*, **2003**, 60, 107-114.
- ^[7] Folkman, J., *Nat Med*, **1995**, 1, 27 – 31.
- ^[8] Carmeliet, P., *Nat Med*, **2003**, 9, 653 – 60.
- ^[9] Djonov, V.; Baum, O.; Burri, P.H., *Cell Tissue Res*, **2003**, 314, 107 – 17.
- ^[10] Folkman, J., *J. Natl. Cancer I.*, **1990**, 82, 4 – 6.
- ^[11] Hanahan, D.; Folkman, J., *Cell*, **1996**, 86, 353 – 64.
- ^[12] Bakleh, M., Méthodologie de synthèse pour l'élaboration de photosensibilisateurs sélectifs à visée anti-cancéreuse Limoges, **2005 – 2008**.
- ^[13] Auerbach, R. ; Lewis, R. ; Shinnars, B. ; Kubai, L.; Akhatar, N., *Clin. Chem.*, **2003**, 49, 32 – 40.
- ^[14] Senger, D. R; Galli, S. J.; Dvorak, A. M.; Perruzzi, C. A.; Susan Harvey, V.; Dvorak, H. F., *Science*, **1983**, 219, 983 – 985.
- ^[15] Berse, B.; Brown, L.F.; Van de Water, L.; Dvorak, H.F.; Senger, D.R, *Mol. Biol. cell*, **1992**, 3, 211 – 220.
- ^[16] Ferrara, N.; Davis- Smyth, T., *Endocr Rev*, **1997**, 18, 4 – 25
- ^[17] Freeman, M. R.; Schneck, F. X.; Gagnon, M.L.; Corless, C.; Soker, S.; Niknejad, K.; Peoples, G. E.; Klagsbrun, M., *Cancer Research*, **1995**, 55, 4140 – 4145.
- ^[18] Melter, M.; Reinders, M. E. J.; Sho, M.; Pal, S.; Geehan, C.; Denton, M. D.; Mukhopadhyay, D.; Briscoe, D. M., *Blood*, **2000**, 96, 3801 – 3808.
- ^[19] a) N. Ferrara, K. Houck, L. Jakeman, and D. W. Leung, *Endocr. Rev.*, **1992**, 13, 18-32. b) N. Ferrara, *Kidney Int.*, **1999**, 56, 794-814.
- ^[20] Kim, K.J.; Li, B.; Winer, J.; Armanini, M.; Gillett, N.; Phillips, H.S.; Ferrara, N., *Nature*, **1993**, 362, 841 – 844.
- ^[21] Muller, Y. A.; Christinger, H. W.; Keyt, B. A.; De Vos, A. M., *Structure*, **1997**, 5, 1325 – 1338.
- ^[22] B. A. Keyt, H. V. Nguyen, L. T. Berleau, C. M. Duarte, J. Parke, H. Chen, and N. Ferrara, *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271, 5638-5646.
- ^[23] Gluzman – Poltorak, Z.; Cohen, T.; Herzog, Y.; Neufeld, G., *Cell*, **1998**, 92, 735 – 745.
- ^[24] Soker, S.; Takashima, S.; Miao, H. Q.; Neufeld, G.; Klagsbrun, M., *Cell*, **1998**, 92, 735 – 745.
- ^[25] Soker, S.; Miao, H. Q.; Nomi, M.; Takashima, S.; Klagsbrun, M., *J Cell Biochem*, **2002**, 85, 357 – 368.
- ^[26] Howes We, Rosensrein J., *Am J Roentgenol Radium Ther*. **1948**, 60, 763-75.

-
- [27] David W Mullins, David G Alleva, Carol J. Burger, Klaus D Elgert, *Immunopharmacology*, **1997**, 37, 63-73.
- [28] Judah Folkman, *Adv. Cancer Res.*, **1974**, 19, 331-358.
- [29] Miroslav Hill, Jana Hillova, *Adv. Cancer Res.*, **1976**, 23, 237-297.
- [30] Allan van Oosterom, *Eur.J. Cancer*, **2001**, 37, S6.
- [31] Alb. Aouba, Mireille Eb, Gr. Rey, G. Pavillon, E. Jouglu, Centre d'épidémiologie sur les causes médicales de décès (Inserm-CédiDc), Le Kremlin-Bicêtre, **2011**, 249 – 254.
- [32] L. Milgrom, S. MacRobert, *Chem. Br.*, **1998**, 34, 45-50.
- [33] D.Kessel, T.H Chou, *Adv. Exp. Med. and Biol.*, **1983**, 160, 115-127.
- [34] D. R. Doiron, C.J. Gomer (Eds.), Alan R. Liss Inc., New York, **1984**.
- [35] G. Jori, Novel therapeutic modalities based on photosensitized processes, *EPA Newslett*, **1997**, 60, 12-18.
- [36] M.R. Hambin, T. Hassan, Advances in photodynamic theory, *Opt. Photonics News* 7, **1996**, 16-21.
- [37] G. Jori, *Photochem. Photobiol.*, **1990**, 52, 439-443.
- [38] Bonnett R., *New Scientist*, **1989**, 55.
- [39] A.J. MacRobert, S.G. Bown, D. Phillips, *Ciba Foundation Symposium*, **1989**, 146, 40-59.
- [40] C.J. Byrne, L.V. Marshallsay, A.D. Ward, *J. Photochem. Photobiol. B*, **1990**, 6, 13-27.
- [41] R. Bonnett, G. Martinez, *Tetrahedron*, **2001**, 57, 9513-9547.
- [42] T. R. Nathan, D. E. Whitelaw, S. C. Chang, W. R. Lees, P. M. Ripley, H. Payne, M. C. Parkinson, M. Emberton, A. R. Gilliams, A. R. Mundy, S. G. Bown, *J. Urology*, **2002**, 168, 1427-1432.
- [43] 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.
- [44] J. Webber, D. Kessel, D. Fromm, Yale, *J. Biol. Med.*, **1997**, 70, 127-137.
- [45] M. Ochsner, *Arzneim.-Forsch.*, **1997**, 47, 1185-1194.
- [46] DUSA Pharmaceuticals Inc. homepage: <http://www.dusapharma.com>.
- [47] A.J. MacRobert, S.G. Bown, D. Phillips, *Ciba Foundation Symposium*, **1989**, 146, 4-16.
- [48] M. Kreimer-Birnbaum, *Semin. Hematol.*, **1989**, 26, 153-173.
- [49] G. Jori, *EPA Newslett.*, **1997**, 60, 12-18.
- [50] B.C. Wilson, *Ciba Foundation Symposium*, **1989**, 146, 60-77.
- [51] A. Hirth, U. Michelsen, D. Wöhrle, *Chem. Unserer Zeit*, **1999**, 33, 84-94.
- [52] G.R. Seely, *The Chlorophylls*, Academic Press, London, New York, **1966**, 67-109.
- [53] P.H. Hynninen, *Chlorophylls*, CRC Press, Boca Raton, FL, **1991**, 145-209.
- [54] C. Kaldapa, J. C. Blais, V. Carré, R. Granet, V. Sol, M. Guilloton, M. Spiro, and P. Krausz, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 331-335.
- [55] M. Momenteau, P. Maillard, M.-A. De Bélinay, D. Carrez, A. Croisy, *J. Biomed. Optic*, **1999**, 4, 298.

-
- [56] Ph. Maillard, B. Loock, D.S. Grierson, I. Laville, J. Blais, F. Doz, L. Desjardins, D. Carrez, J.-L. Guerquin-Kern, A. Croisy, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, **2007**, 4, 261-268.
- [57] V. Sol, F. Lamarche, G. Garcia, M. Enache, R. Granet, M. Guilloton, J.C. Blais and Pierre Krausz, *Bioorg. Med. Chem.*, **2006**, 14, 1364-1377.
- [58] R.A. Casero, P.M. Woster, *J. Med. Chem.*, **2001**, 4, 1-25.
- [59] V. SARRAZY, G. GARCIA, J.P. M^BAKIDI, C. LE MORVAN, G. BEGAUD-GRIMAUD, R. GRANET, V. SOL, P. KRAUSZ, *J. PHOTOCHEM. PHOTOBIOLOG.*, **2011**, 103, 3, 201-206.
- [60] V. Sol, J. C. Blais, V. Carre, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 4431 - 4444.
- [61] C. Frochot, B. Distasio, R. Vandresse, J.M. Belgy, M. Dodeller, F. Guillemin, M. L. Viriot, M. Barberi-Heyod, *Bioorg.Chem.*, **2007**, 35, 205-220.
- [62] V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 1486-1493.
- [63] V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, *Tetrahedron Lett.*, **2004**, 45, 5295-5299.
- [64] M.E. Bakleh, V. Sol, K. Estieu-Gionnet, R. Granet, G. Délérís, P. Krausz, *Tetrahedron*, **2009**, 65, 7385-7392.
- [65] H.B.F Dixon., A. Cornish-Bowden, C. Liebecq, K.L. Loening, G.P Moss., J. Reedijk, S.F Velick., P.Venetianer, Vliegenthart J.F.G., *Pure Appl. Chem.*, **1987**, 59, 779-832.
- [66] J.L.Sessler, D.Seidel, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2003**, 42, 5134.
- [67] W.Jentzen, M.C.Simpson, J.D. Hobbs, X.Song, T. Ema, N.Y Nelson., C.J. Medforth, K.M. Smith, M. Veyrat, Mazzanti M., Ramasseul R., J-C. Marchon, T. Takeuchi, W.A Goddard., J.A. Shelmutt, *J. Am. Chem. Soc.*, **1995**, 117, 11085-11097.
- [68] Meyer E.F., *Acta Crystallogr., Sect. B: Struct. Sci.*, **1972**, B28, 2162-2167.
- [69] L.R. Milgrom, *Oxford Univ Press*, UK, **1997**, 249-260.
- [70] M. Gouterman, *J. Mol. Spectrosc.*, **1961**, 6, 138-163.
- [71] M. Smith M., *Porphyryns and Metalloporphyryns*, Elsevier Amsterdam, **1975**, 910.
- [72] Becker E.D., Bradley R.B., *J. Chem. Phys.*, **1959**, 31, 1413-1414.
- [73] R.J. Abraham, G.E. Hawkes, M.F Hudson., K.M.Smith, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, **1975**, 3, 204-211.
- [74] F.Rusconi, J.M.Schmitter, *Analisis Magazine*, **1998**, 26, 13-17.
- [75] M.Karas, D. Bachmann, U. Bahr, F.Hillenkamp, *Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes*, **1987**, 78, 53-68.
- [76] P.J. Rothmund, *J. Am. Chem. Soc.*, **1935**, 61, 2912-2915.
- [77] P.J. Rothmund, A.R. Menotti, *J. Am. Chem. Soc.*, **1941**, 63, 267-270.
- [78] A.D. Adler, F.R. Longo, J.D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff, *J. Org. Chem.*, **1967**, 32, 476.
- [79] A.M.A.R. Gonsalves, M.M. Pereira, *J. Heterocycl. Chem.*, **1985**, 22, 931-933.
- [80] J.S. Lindsey, Hsu H.C., Schreiman I.C., *Tetrahedron Lett.*, **1986**, 27, 4969-4970.
- [81] A. Petit, A. Loupy, P. Maillard, M. Momenteau, *Synth. Commun.*, **1992**, 22, 1137-1142.
- [82] Y.Vignaud, R. Granet and P. Krausz, *J.Porphyrins Phthalocyanines*, **2008**, 10, 937.
- [83](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.
- ^[84] C. Casiraghi, M. Cornia, G. Rassu, C. Del Sante, P. Spanu, *Tetrahedron*, **1992**, 48, 5619-5628.
- ^[85] S.J. Vigmond, M.C. Chang, K.M.R. Kallury, M. Thompson, *Tetrahedron Lett.*, **1994**, 35, 2455-2458.
- ^[86] Lee C-H., J.S. Lindsey, *Tetrahedron*, **1994**, 50, 11427-11440.
- ^[87] K. M. Smit., *Porphyrins and metalloporphyrins*, Ed. Elsevier, **1975**, 29-58.
- ^[88] B. J. Littler, Y. Ciringh, J. S. Lindsey, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 2864-2872.
- ^[89] A. Treibs, N. Haberle, *Liebigs Ann. Chem.*, **1968**, 718, 183-207.
- ^[90] W. Siedel, F. Winkler, *Liebigs Ann. Chem.*, **1943**, 54, 162-201.
- ^[91] H. Fischer, H. Friedrich, W. Lamatsch, K. Morgenroth, *Techn. Hochschule, Munchen. Ann.*, **1928**, 466, 147-178.
- ^[92] J.L. Sessler, J.W. Genge, A. Urbach, P. Sansom, *Synlett*, **1996**, 2, 187-188
- ^[93] (a) K.M. Smith, *Porphyrins and Metalloporphyrins*, K.M. Smith (Ed.), Elsevier, Amsterdam, **1975**, 29-58 ; (b) P.S. Clezy, *Aust. J. Chem.*, **1991**, 44, 1163.
- ^[94] H. Fischer, *Org. Synth. Coll.*, **1955**, 3, 442-443.
- ^[95] R.F. Labbe, G. Nishida, *Biochem. Biophys. Acta*, **1957**, 437
- ^[96] R. Willstatter, M. Utzinger, *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, **1911**, 382, 129-194.
- ^[97] N. Drogat, M. Barrière, R. Granet, V. Sol, P. Krausz., *Dyes Pigments*, **2011**, 88, 125-127.
- ^[98] Lehn J.M., Kirch M., Sauvage J.P., Ziessel R., *La Recherche*, **1980**, 11, 205.
- ^[99] (a) Goodby J.W., Robinson P.S., Teo B.K., Cladis P.E., *Mol. Cryst. Liq. Cryst.*, **1980**, 56, 303-309 ; (b) Gregg B.A., Fox M.A., Bard A.J., *Chem. Commun.*, **1987**, 15, 1134-1135 ; (c) Shimizu Y., Miya M., Nagata A., Ohta K., Matsumura A., Yamamoto I., Kusabayashi S., *Chem. Lett.*, **1991**, 1, 25-28 ; (d) Liu C.Y., Pan H.L., Tang H., Fox M.A., Bard A.J., *J. Phys. Chem.*, **1995**, 99, 7632-7636 ; (e) Wang Q.M., Bruce D.W., *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, **1997**, 36, 150-152.
- ^[100] N.M. Bressler, *Arch. Ophthalmol. (Chicago)*, **2001**, 119, 198-207.
- ^[101] C. Ringot, V. Sol, M. Barrière, N. Saad, P. Bressollier, R. Granet, P. Couleaud, C. Frochet, and P. Krausz, *Biomacromolecules*, **2011**, 12, 1716-1723.
- ^[102] Embleton, M.J., Rowland, G.F., Simmonds, R.G., Jacobs, E., Mardsen, C.H., Baldwin, R.W., *Br. J. Cancer*, **1983**, 43-49.
- ^[103] Couvreur, P., dans *Vecteurs nanoparticules de médicaments, formes pharmaceutiques nouvelles*, Buri, P., Puisieux, P., Doelker, E., Benoit, J.P., Eds., *Lavoisier*, **1985**, 577-611.
- ^[104] Yoshida, R., Sakai, K., Okano, T., Sakurai, Y., Han Bae, Y., Kim, S.W., *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **1991**, 3, 155-162.
- ^[105] Kramer, P.A., *J. Pharm. Sci.*, **1974**, 63, 1646.
- ^[106] C. Dubernet, J.P. Benoit, *Actual. Chim.*, **1986**, 19-28.
- ^[107] P. Couvreur, C. Vauthier, *Pharm. Res.*, **2006**, 23, 1417-1450.
- ^[108] K. Maruyama, O. Ishida, T. Takizawa, K. Moribe, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **1999**, 40, 89-102.

-
- [109] K. Andrieux, D. Desmaële, J. D'Angélo, P. Couvreur, *L'actualité chimique*, **2003**, 135-139
- [110] A.R Hilgenbrink., P.S. Low, *J. Pharm. Sci.*, **2005**, 94, 2135-2146.
- [111] P. Couvreur, C. Vauthier, *Pharm. Res.*, **2006**, 23, 1417-1450.
- [112] S.A. Weston, C.R. Parish, *J. Immunol. Methods*, **1990**, 133, 87-97.
- [113] L. Song, E.J. Hennink, I.T. Young, H.J. Tanke, *Biophys. J.*, **1995**, 68, 2588-2600.
- [114] D.J. Bornhop, C.H. Contag, K. Licha, C.J. Murphy, *J. Biomed. Opt.*, **2001**, 6, 106-110.
- [115] H.S. Yang, P.H. Holloway, S. Santra, *J. Chem. Phys.*, **2004**, 121, 7421-7426.
- [116] S. Iijima, *Nature*, **1991**, 354, 56-58.
- [117] M.J. O'Connell, S.M. Bachilo, C.B. Huffman, V.C. Moore, M.S. Strano, E.H. Haroz, K.L. Rialon, P.J. Boul, W.H. Noon, C. Kittrell, J. Ma, Hauge R.H., R.B. Weisman, R.E. Smally, *Science*, **2002**, 297, 593-596.
- [118] P. Juzenas, W. Chen, Y.P. Sun, M. Alvaro, R. Generalov, N. Generalova, I. Lie Chrstensen, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2008**, 60, 1600-1614.
- [119] R. Bhattacharya, C.R. Patra, A. Earl, S. Wang, A. Katarya, L. Lu, J.N., Kizhakkedathu M.J. Yaszemski, P. Greipp, D. Mukhopadhyay, P. Mukherjee, *Biol. Med.*, **2007**, 3, 224-238.
- [120] C.F. Shwa; Gold-based therapeutic agents ; *Chem. Rev.*, **1999**, 99, 2589-2600.
- [121] D.L. Feldheim, C.A. Foss, *New York, Marcel Dekker*, **2002**.
- [122] A. Henglein, *Chem. Rev.*, **1989**, 89, 1861-1873.
- [123] S.H. Liu, M.Y. Han, *Adv. Funct. Mater.*, **2005**, 15, 961-967.
- [124] H.Z. Huang, X.R. Yang, *Biomacromolecules*, **2004**, 5, 2340-2346.
- [125] R. Bhattacharya, C.R. Patra, A. Earl, S. Wang, A. Katarya, L. Lu, J.N., Kizhakkedathu M.J. Yaszemski, P. Greipp, D. Mukhopadhyay, P. Mukherjee, *Biol. Med.*, **2007**, 3, 224-238.
- [126] X. Li, H. Zhou, L. Yang, G. Du, Atmaram S. Pai-Panandiker, X. Huang, B. Yan, *Biomaterials*, **2011**, 32, 2540-2545
- [127] S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray, *Pharmacol. Rev.*, **2001**, 53, 283-318.
- [128] R. Weissleder, D.D. Stark, B.L. Engelstad, B.R. Bacon, C.C. Compton, D.LL White, P. Jacobs, J. Lewis, *Am. J. Roentgenol.*, **1989**, 152, 167-173.
- [129] K. Donadel, M.D.V. Felisberto, V.T. Favere, M. Rigoni, N.J. Batistela, M.C.M. Laranjeira, *Biomimetic and Supramolecular Systems*, **2008**, 28, 509-514.
- [130] B. Steitz, H. Hofmann, S.W. Kamau, P.O. Hassa, M.O. Hottiger, B. Rechenberg, M. Hofmann-Antenbrink, A. Petri-Fink, *J. Magn. Magn. Mater.* , **2007**, 311, 300-305.
- [131] H.W. Duan, M. Kuang, X.X. Wang, Y.A. Wang, H. Mao, S.M. Nie, *J. Phys. Chem. C*, **2008**, 112, 8127-8131.
- [132] C.Sun, R. Sze, M.Q. Zhang, *J. Biomed. Mater. Res. PartA*, **2006**, 78A, 550-557.
- [133] N. Kohler, C. Sun, J. Wang, M.Q. Zhang, *Langmuir*, **2005**, 21, 8858-8864.
- [134] X. Montet, K. Montet-Abou, F. Reynolds, R. Weissleder, L. Josephson, *Neoplasia*, **2006**, 8,214-222.

-
- [135] O. Veiseh, C. Sun, J. Gunn, N. Kohler, P. Gabikian, D. Lee, N. Bhattarai, R. Ellenbogen, R. Sze, A. Hallahan, J. Olson, M.Q. Zhang, *Nano. Letters*, **2005**, 5, 1003–1008.
- [136] M.A. Funovics, B. Kapeller, C. Hoeller, H.S. Su, R. Kunstfeld, S. Puig, K. Macfelda, *Magn. Reson. Imaging*, **2004**, 22, 843–850.
- [137] A.S. Lübbe, G. Berger, J. Brock, D.G. McClure, *J.Magn.Magn.Mater.*, **1999**, 194, 149-155.
- [138] P.K. Gupta, C.T. Hung, *Life Sciences*, **1989**, 44, 175 – 186.
- [139] R.K. Gilchrist, R. Medal, W.D. Shorey, R.C. Hanselman, J.C. Parott, C.B. Taylor, *Ann. Surg.*, **1957**, 146, 596 – 606.
- [140] O.S. Nielsen, M. Horsman, J. Overgaard, *Eur. J. Cancer*, **2001**, 37, 467.
- [141] J.C. Bacri, M. Da Silva, R. Perzynski, J.N. Pons, J. Roger, D. Sabolovic, A. Halbreich, *Plenum Press, New York*, **1997**, 44, 597- 606.
- [142] A. Jordan, P. Wust, R. Scholz, B. Tesche, H. Fahling, T. Mitrovics, T. Vogl, J. Cervos-Navarro, R. Felix, *J. Hyperther.*, **1996**, 12, 705-722.
- [143] M. Shinkai, M. Yanase, H. Honda, T. Wakabayashi, J. Yoshida, T. Kobayashi, *JPN. J. Cancer Res.*, **1996**, 87, 1179 – 1183.
- [144] M. Yanase, M. Shinkai, H. Honda, T. Wakabayashi, J. Yoshida, T. Kobayashi, *JPN. J. Cancer Res.*, **1997**, 88, 630 – 632.
- [145] D.C.F.Chan, D.B. Kirpotin, P.A. Bunn, *Plenum Press, New York*, **1997**, 45, 607 – 618.
- [146] A. Jordan, P. Wust, R. Scholz, H. Faehling, J. Krause, R. Felix, *Plenum Press, New York*, **1997**, 43, 569 – 595.
- [147] S. Mornet, S. Vasseur, F. Grasset, E. Dugget, *J. Mat. Chem.*, 2004, 14, 2161.
- [148] P.C. Lauterbur, *Nature*, **1973**, 242, 191.
- [149] P.C. Lauterbur, M.H. Mendoca-Dias, A.M. Rubin, *Press, New York*, **1978**, 1, 752 – 759.
- [150] P.T Beall., *Physio. Chem. Phys. Med. NMR*, **1984**, vol. 16, 129.
- [151] A.D. Watson, S.M. Rocklage, M.J. Carvlin, *Magn. Reson. Imaging*, Stark, D., Bradley, W.G., Eds., **1992**, 1, 372 – 437.
- [152] T. W. Chan, C. Eley, P. Liberti, and H. Y. Kressel, *Investigative Radiology*, **1992**, 27, 443 – 449.
- [153] C. Grüttner, J. Teller, C. Schümichen, B. R. Paulke, *Plenum Press, New York*, **1997**, 4, 53 – 67.
- [154] P. Reimer, T. Shen, A.S. Lee, T.J. Brady, J. Witternberg, Weissleder, R., *Proc. Soc. Reson. Med. 11th annual meeting, New York*, **1992**, 3224.
- [155] H. H. Bengele, S. Palmacci, J. Rogers, C. W. Jung, J. Crenshaw, and L. Josephson, *Magn. Reson. Imaging*, **1994**, 12, 433 – 442.
- [156] Y. Kawamura, K. Endo, Y. Watanabe, T. Saga, T. Nakai, H. Hikita, K. Kagawa, J. Konishi, *Radiology*, **1990**, 174, 357 – 360.
- [157] D. Pouliquen, J.J. Le Jeune, R. Perdrisot, A. Ermias, P. Jallet, *Magn. Res. Imaging*, **1991**, 9, 275 – 283.
- [158] C.W. Jung, P. Jacobs, *Magn. Reson. Imaging*, **1995**, 13, 661 – 674.
- [159] W.S. Enoch, R. Wessleder, 2nd Ed., *Saunders, W.B., Philadelphia*, **1996**, 192 – 220.
- [160] R.A. Decréau, J.P. Collman, Y. Yang, Y. Yan, N.K. Devaraj, *J. Org. Chem.*, **2007**, 72, 2794-2802.
- [161] K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Rev.*, **1993**, 93, 1503-1531.

-
- [162] K. Driaf, P. Krausz, B. Verneuil, M. Spiro, J. C. Blais et G. Bolbach, *carbohydr. Res.*, **1989**, 192, 347-350.
- [163] Mueller, N. Lisa et al, *Org. Biomol. Chem.*, **2010**, 8, 3294-3299.
- [164] V. Sol, V. Chaleix, Y. Champavier, R. Granet, Y.-M. Huang, P. Krausz, *Bioorgan. Med. Chem.*, 14, **2006**, 7745-7760.
- [165] V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, *Eur. J. Org. Chem.*, **2003**, 1486-1493.
- [166] T. Sugimoto, K. Sada, Y. Tateishi, T. Suzuki, Y. Sei, K. Yamaguchi, S. Shinkai, *Tetrahedron Lett.*, **2005**, 46, 5347-5350
- [167] V. Sol, J.C. Blais, V. Carré, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro et P. Krausz, *J. Org. Chem.*, **1999**, 64, 4431 – 4444.
- [168] M.A. Willard, L.K. Kurihara, E.E. Carpenter, S. Calvin, V.G. Harris, *Int. Mater. Rev.*, **2004**, 49, 125 -170.
- [169] N. H. Maina, M. Tenkanen, H. Maaheimo, R. Juvonen, L. Virkkia, *Carbohydr. Res.*, **2008**, 343, 1446 – 1455.
- [170] M. E. Slodki, R. E. England, R. D. Plattner, W. E. Dick, *carbohydr. Res.*, **1986**, 156, 199 – 206.
- [171] J. F. Robyt, *Dextran*, In *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*. J. I. Kroschwitz ed., Wiley-VCH: New York, **1986**, 4, 752 – 767.
- [172] E. Dellacherie, In *Polysaccharides in medicinal applications*, S. Dumitriu **1996**, Ed. Marcel Dekker, Inc : N.Y. Basel, Hong-Kong, 524-544.
- [173] E.L. Rozenfel'd, A. S. Senko, *Clin. Chim. Acta.*, **1964**, 10 (3), 223-228.
- [174] A. J. Goenwall, G.A. Ingelman, , *U.S. Patent*, **1948**, 2, 437 – 518.
- [175] P. Tartaj, M.P. Morales, S. Veintemillas- Verdaguer, T. Gonzalez-Carreno, C.J Serna, *Elsevier*, Amsterdam, Netherlands, **2006**.
- [176] R. Weissleder, D.D. Stark, C.C. Compton, J. Wittenberg, J.T. Ferruci, *Am. J. Roentgenol.*, **1987**, 149, 1161 – 1165.
- [177] R. Weissleder, G. Elizondo, D.D. Stark, P.F. Hahn, J. Marfil, J.F. Gonzalez, S. Saini, L.E. Todd, J.T. Ferruci, *Am. J. Roentgenol.*, **1989**, 152, 175 – 180.
- [178] S. Laurent, D. Forge, M. Port, A. Roch, C. Robic, L.V. Elst, R.N. Muller, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 2064 – 2110.
- [179] P. Wunderbaldinger, L. Josephson, R. Weissleder, *Crosslinked iron oxides (CLIO): A new platform for the development of targeted MR contrast agents*, **2002**, 304 – 306.
- [180] R.S. Molday, D. Mackenzie, *J. Immunol. Methods*, **1982**, 52, 353-367.
- [181] M.J. Hope, M.B. Bally, G. Webb, P.R. Cullis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1985**, 812, 55 – 65.
- [182] S. H. Xuan, L.Y. Hao, W.Q. Jiang, X. L. Gong, Y. Hu, Z. Y. Chen, *J. Magn. Mater.* , **2007**, 308, 210-213.
- [183] C.D. Hein, X.M. Liu, D. Wang, *Pharmaceut. Res.* 25, **2008**, 2216-2230.
- [184] a) W.S. Home, C.D. Stout, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.* , **2003**, 125, 9372 -9376. b) W.S. Home, M.K. Yada, C.D. Stout, M.R. Ghadiri, *J. Am. Chem. Soc.*, **2004**, 126, 15366-15367.
- [185] [www.biodivin.com/cuivre en viti bio.pdf](http://www.biodivin.com/cuivre_en_viti_bio.pdf).
- [186] W.G. Lewis, L.G. Green, F. Grynspan, Z. Radić, P.R. Carlier, P. Taylor, M.G. Finn, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 1053-1057.
- [187] (a) J-F Lutz, Z. Zarafshani, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, **2008**, 60, 958-970; (b) M. Meldal, *Macromol. Rapid. Comm.*, **2008**, 29, 1016-1051; (c) C.E. Hoyle, C.N. Bowman, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, 49, 1540-1573; (d) J.C. Jewett, C.R. Bertozzi, *Chem. Soc. Rev.*, **2010**, 39, 1272-1279.

-
- [188] R. Huisgen, R. Knorr, L. Mobius, G. Szeimies, *Chem. Ber.*, **1965**, 98, 4014-4021.
- [189] V.V. Rostovstev, L.G. Green, V.V. Fokin, K.B. Sharpless, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2002**, 41, 2596-2599.
- [190] F. Himo, T. Lovell, R. Hilgraf, V.V. Rostovstev, L. Noodleman, K.B. Sharpless, V.V. Fokin, *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, 127, 210-216.
- [191] V.O. Rodinov, V.V. Fokin, M.G. Finn, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2005**, 44, 2210-2215.
- [192] M. Meldal, C.W. Tornøe, *Chem. Rev.*, **2008**, 108, 2952-3015.
- [193] E. Lieber, D.R. Levering, L. Paterson, *Analyt. Chem.*, **1951**, 23, 1594-1604.
- [194] S. Young Oh, D. Il Yoo, Y. Shin and G. Seo, *Carbohydrate R.*, **2005**, 340, 417-428.
- [195] Z. Zhang, Q. Guo, Y. Lu, T. Jia, K. Yan, Z. Li, *J. Porphyr. Phthalocya.*, **2010**, 14, 264-270.
- [196] E. Esposito, S. Sebben, R. Cortesi, E. Menegatti, and C. Nastruzzi, *Int J Pharm*, **1999**, 189, 29-41.
- [197] R. Cortesi, C. Mischiati, M. Borgatti, L. Breda, A. Romanelli, M. Saviano, C. Pedone, R. Gambari, and Nastruzzi. *AAPS J*, **2004**, 6, 10-21.
- [198] D. Fischer, Y. Li, B. Ahlemeyer, et al., *Biomaterials*, **2003**, 24, 1121 – 1131.
- [199] C.K. Goldman, L. Soroceanu, N. Smith, G.Y. Gillespie, W. Shaw, S. Burgess, G. Bilbao, D.T Curiel, *Nat. Biotechnol.*, **1997**, 15, 462 – 466.
- [200] D.A. Wang, A.S. Narang, M. Kotb, A.O. Gaber, D.D. Miller, S.W. Kim, and R.I. Mahato, *Biomacromolecules*, **2002**, 3, 1197 – 207.
- [201] J.L. Merlin, G. Dolivet, C. Dubessy, E. Festor, R.M. Parache, L. Verneuil, P. Erbacher, J.P. Behr, and F. Guillemin, *Cancer Gene Ther*, **2001**, 8, 203 – 210.
- [202] M.C. DeRosa, R.J. Crutchley, *Coordin. Chem. Rev.*, **2002**, 233-234, 351-371.
- [203] Ph. Maillard, B. Looock, D.S. Grierson, I. Laville, J. Blais, F. Doz, L. Desjardins, D. Carrez, J.-L. Guerquin-Kern, A. Croisy, *Photodiagn. Photodyn. Ther.*, 4, **2007**, 261-268
- [204] J. N. Silva, A. Galmiche, João P.C. Tomé, A. Boullier, Maria G.P.M.S. Neves, Eduarda M.P. Silva, J.C. Capiod, José A.S. Cavaleiro, R. Santus, J.C. Mazière, P. Filipe, P. Morlière, *Biochem. Pharm.*, 80, **2010**, 1373-1385
- [205] E.C. Cho, J. Xie, P.A. Wurm, and Y. Xia, *Nano Lett.*, **2009**, 9, 1080 – 1084.
- [206] Z.Naturforsch.,C: *J. Biosci.* , **1986**, 41, 511 – 520.
- [207] a) K. Toshima, K. Tatsuta, *Chem. Res.*, **1993**, 93, 1503-1531. b) C. Kaldapa, J.C. Blais, V. Carre, R. Granet, V. Sol, M. Guilloton, M. Spiro, P.Krausz, *Tetrahedron Lett.*, **2000**, 41, 331-335.