



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'INPL

Discipline : Bioingénierie-Biomatériaux

Présentée et soutenue publiquement par

Benoît Di Stasio

École doctorale

Biologie Santé Environnement

Soutenue le 31 octobre 2006

ETUDE DE NOUVEAUX PHOTOSENSIBILISANTS POUR DES APPLICATIONS EN THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

Membres du jury :

R. Santus	Professeur (Rapporteur)
X. Allonas	Professeur (Rapporteur)
J-B. Regnouf	Professeur
M-L. Viriot	Directeur de recherche (CNRS)
C. Frochot	Chargée de recherche (CNRS)
M. Barberi-Heyob	Chargée de recherche, HDR (invitée)

Laboratoires de recherche :

**DCPR-GRAPP, UMR 7630 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, 1 rue Grandville, 54000
Nancy, France**

**Centre Alexis Vautrin, CRAN-UMR 7039 CNRS, Nancy-Université, Avenue de
Bourgogne, Brabois, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France**

A Mathys, Caro, papa & maman

Je n'oublie pas ceux qui ne sont plus là...

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes sans qui ce travail n'aurait jamais vu le jour. Je pense d'abord à Marie-Laure qui a été d'une aide si précieuse de part ses connaissances, son enthousiasme, sa gentillesse et son courage.

Je souhaiterais également remercier René Santus, Xavier Allonas, et Jean-Bernard Regnouf pour avoir accepté de lire, critiquer et juger ce travail, de tout cœur, merci.

Ensuite, il y a bien sûr Céline Frochot et Muriel Barberi-Heyob, toujours là, toujours à l'écoute, toujours prêtes à discuter nos idées et qui ont tout fait pour que j'arrive au bout.

Je tiens également à remercier Régis Vanderesse et Albert Manfred Brouwer pour leur aide et leur accueil chaleureux.

Il y a aussi les techniciennes, Marie-Jo, Carole, Sophie, Elisabeth... merci pour votre aide quotidienne.

Je pense également à tous les doctorants des nombreux laboratoires où j'ai effectué ce travail, merci pour les échanges d'idées, les conseils et... les soirées! Je souhaiterais juste faire une mention spéciale à Sébastien Hupont. Merci mon pote, j'espère que tu vas réussir ta thèse aussi bien que tes bébés.

PARTIE I ETAT DE L'ART – OBJECTIFS DU TRAVAIL	12
1 LE CANCER	13
1.1 INTRODUCTION	13
1.2 DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES	13
1.3 LA CANCEROGENESE	16
1.4 METHODES UTILISEES POUR LE DIAGNOSTIC ET LE TRAITEMENT DES CANCERS	18
1.4.1 LE DIAGNOSTIC	18
1.4.2 LE TRAITEMENT	19
2 LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	21
2.1 PRINCIPE DE BASE	21
2.2 RAPPELS HISTORIQUES	21
2.3 MECANISMES	23
2.3.1 LES PROCESSUS PHOTOCHIMIQUES	24
2.3.2 MECANISMES DIRECTS : DOMMAGES CELLULAIRES	27
2.3.3 MECANISMES INDIRECTS : DOMMAGES VASCULAIRES ET IMMUNITAIRES	28
2.4 LES PHOTOSENSIBILISANTS	28
2.4.1 LE PHOTOSENSIBILISANT IDEAL	28
2.4.2 STRUCTURE CHIMIQUE	29
2.4.3 CARACTERISATION DES PORPHYRINES ET DE LEURS DERIVES	31
2.5 METHODE DE SYNTHESE DES PORPHYRINES	37
2.5.1 LES MESO-PORPHYRINES	37
2.5.2 LES PORPHYRINES β -SUBSTITUEES	44
2.6 METHODE DE SYNTHESE DES CHLORINES	46
2.7 LES PHOTOSENSIBILISANTS DE 1 ^{ERE} GENERATION	47
2.8 LES PHOTOSENSIBILISANTS DE 2 ^{EME} GENERATION	49
2.8.1 LES PORPHYRINES	49
2.8.2 LES CHLORINES ET LES BACTERIOCHLORINES	50
2.8.3 L'ACIDE 5-AMINO-LEVULINIQUE (5-ALA)	52
2.8.4 LES DERIVES DE LA BENZOPORPHYRINE (BPD-MA)	54
2.8.5 LES PHTALOCYANINES ET LES NAPHTHALOCYANINES	55
2.8.6 LA TEXAPHYRINE DE LUTENIUM	55
2.8.7 LES PURPURINES	56
2.9 LES PHOTOSENSIBILISANTS DE 3 ^{EME} GENERATION	57
2.9.1 LA VECTORISATION PAR DES GROUPEMENTS OSIDIQUES	60
2.9.2 LES SUBSTANCES ANTI-ANGIOGENIQUES ET LA STRATEGIE DE COUPLAGE VIA RGD POUR CIBLER L'INTEGRINE $\alpha_v\beta_3$	64
2.9.3 LES STRATEGIES ANTI-ANGIOGENIQUES	67
2.9.4 LES RECEPTEURS DE LA FAMILLE DES INTEGRINES	68
2.9.5 PHOTOSENSIBILISANTS VECTORISES CIBLANT LES RECEPTEURS AUX INTEGRINES	77
PARTIE II ETUDE DE COMPOSES GLYCOSYLES POUR DES APPLICATIONS EN THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	82
1 CONTEXTE DE L'ETUDE	83
2 OBJECTIF	84
3 RESULTATS	84
4 CONCLUSION	85
NEW GLYCOSYLATED PORPHYRINS FOR PDT APPLICATIONS	87

THE 2-AMINOGLUCOSAMIDE MOTIF IMPROVES CELLULAR UPTAKE AND PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF TETRAPHENYLPORPHYRIN	92
---	----

PARTIE III ETUDE DE COMPOSES LIES AU PEPTIDE RGD POUR DES APPLICATIONS EN THERAPIE PHOTODYNAMIQUE **104**

1 CONTEXTE DE L'ETUDE	105
2 OBJECTIF	105
3 RESULTATS	106
4 CONCLUSION	106

INTEREST OF RGD-CONTAINING LINEAR OR CYCLIC PEPTIDE TARGETED TETRAPHENYLCHLORIN AS NOVEL PHOTOSENSITIZERS FOR SELECTIVE PHOTODYNAMIC ACTIVITY	108
---	-----

PARTIE IV ETUDE PHOTOPHYSIQUE DE NOUVEAUX COMPOSES POUR DES APPLICATIONS EN THERAPIE PHOTODYNAMIQUE **124**

1 CONTEXTE DE L'ETUDE	125
2 OBJECTIF	125
3 MATERIELS ET METHODES	126
3.1 COMPOSES ETUDIES	126
3.2 DETERMINATION DES COEFFICIENTS D'EXTINCTION MOLECULAIRES ET DES RENDEMENTS QUANTIQUES DE FLUORESCENCE	127
3.2.1 ABSORPTION UV-VISIBLE	127
3.2.2 FLUORESCENCE EN EXCITATION CONTINUE	127
3.2.3 DETERMINATION DES RENDEMENTS QUANTIQUES DE FORMATION D'OXYGENE SINGULET	127
3.2.4 DETERMINATION DE LA DUREE DE VIE DE L'ETAT TRIPLET	129
4 RESULTATS ET DISCUSSION	129
4.1 DETERMINATION DES ϵ ET DES RENDEMENTS QUANTIQUES DE FLUORESCENCE	129
4.2 DETERMINATION DES RENDEMENTS QUANTIQUES DE FORMATION D'OXYGENE SINGULET	133
4.3 LIMITE DE LA METHODE UTILISEE	134
4.4 DETERMINATION DE LA DUREE DE VIE DE L'ETAT TRIPLET ET DE LA CONSTANTE DE QUENCHING	134
5 CONCLUSION	136

CONCLUSION GENERALE	138
----------------------------	------------

BIBLIOGRAPHIE	142
----------------------	------------

Résumé

Les dérivés de porphyrines sont des macrocycles tétrapyrroliques impliqués dans de nombreux processus d'oxydoréduction. Ces composés conduisent à de nombreuses applications, dont la Thérapie Photodynamique (PDT), qui est une photochimiothérapie de certains cancers. Cette technique est basée sur l'utilisation de photosensibilisants rendus cytotoxiques par traitement lumineux en présence d'oxygène et connaît un développement constant depuis les travaux de Dougherty dans les années 1970. Actuellement utilisés en clinique, il existe deux générations de dérivés de porphyrines anti-cancéreuses. La 1^{ère} génération, bien que relativement efficace, est actuellement remplacée par des composés de 2^{ème} génération, plus actifs et entraînant moins d'effets secondaires.

De nombreuses équipes dans le monde cherchent à synthétiser des composés capables de reconnaître spécifiquement et directement (par adressage) ou indirectement (par vectorisation ou adressage) les cellules cancéreuses. Ces composés sont dits de 3^{ème} génération. Nous avons orienté le travail vers la synthèse et l'évaluation biologique de composés tétrapyrroliques associés à des agents de transport et/ou de reconnaissance tels que les sucres ou certaines séquences peptidiques de type Arginine-Glycine-Aspartate (RGD). Outre la modification des caractéristiques physico-chimiques du macrocycle initial (amélioration de la solubilité, amphiphilie), ces motifs permettent une reconnaissance spécifique des cellules cancéreuses, *via* les lectines pour les motifs de type sucre et *via* les intégrines pour les motifs de type RGD.

Nous avons synthétisé des tétraphénylporphyrines glycosylées ou couplées à des peptides et testé leurs propriétés physicochimiques. De plus, nous avons mené une étude biologique *in vitro* de ces nouveaux photosensibilisants sur plusieurs lignées cellulaires afin d'évaluer leur potentiel photocytotoxique. Dans le cadre d'un programme européen Cost-Chemistry intitulé "*New molecular systems with therapeutic applications in photodynamic therapy of cancer and microbial infections*", nous avons également étudié les propriétés photophysiques de nombreux photosensibilisants synthétisés par une équipe roumaine.

Mots clefs : chlorines, *in vitro*, PDT, porphyrines, ciblage, synthèse chimique

Summary

Derived of porphyrins are tetrapyrrolic macrocycles involved in several redox processes. These compounds are used for different biological applications, like photodynamic therapy (PDT). PDT is a promising treatment of oncological diseases, upon photo-activation with visible light and molecular oxygen which became popular in the seventies with the first results on Photofrin[®] published by Dougherty. Due to their poor efficacy these first generation compounds were replaced by compounds of 2nd generation, more effective and involving less side effects.

Many teams in the world seek to synthesize compounds able to directly recognize specifically and (by targeting) or indirectly (by vectorization) cancer cells. These compounds are known as of 3rd generation. We are involved in the synthesis and the biological evaluation of tetrapyrrolic compounds associated to recognition and/or transport agents such as sugars or RGD-like peptide sequences. In addition to the modification of the physicochemical characteristics of the initial macrocycle (improvement of solubility, amphiphilicity) these moieties allow a specific recognition of the cancerous cells, via the lectins for the sugar moieties and via the integrins for the RGD type moieties. We synthesized glycosylated tetraphenylporphyrins or coupled to peptides and tested their physicochemical properties. Moreover, we undertook an in vitro biological study of these new photosensitizers on several cell lines in order to evaluate their therapeutic potential.

Within the framework of an European Cost-Chemistry program entitled "*New molecular systems with therapeutic applications in photodynamic therapy of cancer and microbial infections*", we also studied the photophysical properties of many photosensitizers synthesized by a Rumanian team.

Keywords : chlorin, in vitro, PDT, porphyrins, targeting, chemical synthesis

Glossaire

3D : 3 dimensions

5-ALA : Acide 5-amino-lévilinique

5-FU : 5-fluoro-uracile

ϵ : Coefficient d'absorption molaire

Φ^1O_2 : Rendement quantique de formation d'oxygène singulet

τ : Durée de vie de l'état triplet

A549 : Cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

Apaf-1 : Apoptosi protease activating factor-1

bcl-2 : B-cell leukemia/lymphoma 2

BPD-MA : Dérivé monoacide de la benzoporphyrine

C : Concentration

CCD : Charge Coupled Device

cdk : Kinases cycline-dépendantes

CIS : Conversion Intersystème

DCC : Dicyclohexyl carbodiimide

DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone

DL₅₀ : Dose de lumière induisant 50% de mort cellulaire

DMLA : Dégénérescence maculaire liée à l'âge

DMSO : Diméthyl sulfoxyde

DO : Densité Optique

EMT6 : Cellules issues de tumeurs mammaires murines

ErbB : avian erythroblastic leukemia oncogene

FDA : Food and Drugs Administration

FEP : Fluorescence en Excitation Pulsée

FGF : Fibroblast Growth Factor

Fmoc : Groupement N-(9-fluorényl)méthoxycarbonyl

HCCA : Acide α -cyano-4-hydroxycinnamique

HF : Acide fluorhydrique

HpD : Dérivé de l'hématoporphyrine

HT29 : Cellules issues d'adénocarcinome colique humain

HUVEC : Cellules endothéliales issues de la veine de cordon ombilical humain

IC₅₀ : Concentration induisant 50% d'inhibition
IR : Infra Rouge
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
KDR : Récepteur du VEGF
k_q : Constante de quenching
L : Longueur
LDL : Low Density Lipoprotein
LIMBS : Ligand-Associated Metal Binding Site
Log : logarithme
MACE : Mono-L-aspartylchlorine e6
MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MEC : Matrice extracellulaire
MIDAS : Metal Ion-Dependent Adhesion Site
m-THPBC : *Méso*-tétrahydroxyphénylbactéριοchlorine
m-THPC : *Méso*-tétrahydroxyphénylchlorine
m-THPP : *Méto*-tétra-(hydroxyphényl)porphyrine
Myc ou v-myc : Myelocytomatosis viral oncogene
N.A. : Non Applicable
N.D. : Non Déterminé
Nd-YAG : Neodymium-doped yttrium aluminium garnet
Npe6 : Mono-L-aspartylchlorine e6
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
OPO : Oscillateur Optique Paramétrique
OsO₄ : Tétraoxyde d'osmium
p53 : phosphoprotéine de poids moléculaire 53 kDa
Pc : Phtalocyanine
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDT : Thérapie Photodynamique
PEX : un sous-produit de la dégradation d'une métalloprotéinase
pH : potentiel hydrogène
PpIX : Protoporphyrine IX
Ppm : Partie par million
PS : Photosensibilisant
p-TPPS4 : *para*-tétra-(sulfonatophényl)porphyrine
RGD : H-Arg-Gly-Asp-OH

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

ROS : Reactive Oxygen Species

t-Boc : Groupement t-butyloxycarbonyl

TFA : Acide trifluoroacétique

TMPP : Tétra-méthoxyphényl-porphyrine

TNF α : Tumor Necrosis Factor

TNP : Tétra-naphtalo-porphyrine

TPP : Tétraphénylporphyrine

UV : Ultra Violet

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction Générale

Les dérivés de porphyrines sont des macrocycles tétrapyrroliques qui constituent une classe essentielle de composés biologiques, surtout de par leur implication dans de nombreux processus d'oxydoréduction. Ces dérivés sont responsables, par exemple, de la fixation de l'oxygène sur l'hémoglobine des érythrocytes et sur la myoglobine, présente majoritairement dans les muscles. Une famille de dérivés de porphyrines, dont la plus connue est certainement la chlorophylle, est responsable de la photosynthèse et donc, indirectement, des conditions aérobies qui prédominent sur la terre.

Ces composés conduisent à de nombreuses applications, telles que leur utilisation comme catalyseurs régio-sélectifs en chromatographie (d'ailleurs, le mot chromatographie a été inventé par Tswett lors de la première séparation de pigments végétaux colorés, dont la chlorophylle) ou en tant qu'agent de photo-décomposition de l'eau. Un autre domaine d'application des macrocycles tétrapyrroliques est la Thérapie Photodynamique (PDT), qui est une photochimiothérapie de certains cancers. Cette technique est basée sur l'utilisation de photosensibilisants rendus cytotoxiques par traitement lumineux en présence d'oxygène et connaît un développement constant depuis les travaux de Dougherty dans les années 1970. A ce jour, elle est également utilisée pour soigner la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et les myopies pathologiques. Des traitements fondés sur ce même principe sont en cours de développement concernant les caries dentaires, certaines affections bactériennes cutanées, ou encore le traitement de maladies cardiovasculaires.

Actuellement, il existe deux générations de dérivés de porphyrines anti-cancéreuses. La 1^{ère} génération regroupe le dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) et le porfimer sodique connu sous l'appellation de Photophrin[®] qui est un mélange complexe et mal défini de porphyrines naturelles. Ce dernier a obtenu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en 1996. Bien que relativement efficaces, ces composés de 1^{ère} génération sont actuellement remplacés par des composés de 2^{ème} génération, plus actifs, de composition chimique bien définie et entraînant moins d'effets secondaires, permettant un essor remarquable de la PDT dans de nombreuses applications. Parmi ces composés, on pourra citer la *méso*-tétrahydroxyphénylchlorine (*m*-THPC ou Foscan[®]) ou encore la

vertéporfine (Visudyne[®]), qui est la forme monoacide de la benzoporphyrine. La première est utilisée pour traiter des cancers de petite taille de l'œsophage, du poumon et du larynx. La seconde est uniquement utilisée dans le cadre de la DMLA.

Le nombre restreint de composés utilisés en clinique explique que de nombreuses équipes dans le monde cherchent à synthétiser des composés de 3^{ème} génération capables de reconnaître spécifiquement et directement (par adressage) ou indirectement (par vectorisation) les cellules cancéreuses. En effet, il est généralement accepté que, pour être efficaces, les nouveaux composés doivent posséder des motifs de reconnaissances spécifiques du type cellulaire ou tissulaire visé. L'avenir de la lutte contre le cancer, en général, et de la PDT, en particulier, passe donc obligatoirement par l'utilisation de composés variés et adaptés à chaque cancer, voire, à chaque patient. Dans cette optique, nous avons orienté le travail vers la synthèse et l'évaluation biologique de composés tétrapyrroliques associés à des agents de transport et/ou de reconnaissance tels que les sucres ou certaines séquences peptidiques de type Arginine-Glycine-Aspartate (RGD). Outre la modification des caractéristiques physico-chimiques du macrocycle initial (amélioration de la solubilité, amphiphilie), ces motifs devraient permettre une reconnaissance spécifique des cellules cancéreuses, *via* les lectines pour les motifs de type sucre et *via* les intégrines pour les motifs de type RGD. En effet, les lectines et les intégrines $\alpha_v\beta_3$ sont surexprimées, à la fois dans certaines lignées cancéreuses, mais aussi au niveau des cellules endothéliales impliquées dans la néo-vascularisation tumorale, ce qui pourrait permettre d'obtenir une synergie de traitement.

Ce travail pluridisciplinaire n'aurait pu être effectué sans l'étroite collaboration entre le Département de Chimie Physique des Réactions au sein de l'École Nationale Supérieure des Industries Chimiques et le laboratoire de Photobiologie en cancérologie du Centre Alexis Vautrin. Nous avons, dans un premier temps, étudié l'impact de la glycosylation de la tétraphénylporphyrine et tétraphénylchlorine sur leurs propriétés physico-chimiques et biologiques en considérant la lignée cellulaire HT29 (lignée de carcinome colique humain). Dans un deuxième temps, et grâce à l'expérience acquise, nous avons synthétisé des tétraphénylchlorines couplées à des peptides contenant le motif RGD et, d'une

part, testé leurs propriétés physico-chimiques et d'autre part, mené une étude biologique *in vitro* de ces nouveaux photosensibilisants en prenant deux lignées cellulaires : Les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine (HUVEC) qui surexprime les intégrines reconnaissant le motif RGD et la lignée EMT6, qui n'exprime pas ces intégrines afin d'évaluer un possible effet vasculaire de ces photosensibilisants.

Par le fait que notre étude est associée à un programme européen Cost-Chemistry intitulé "*New molecular systems with therapeutic applications in photodynamic therapy of cancer and microbial infections*", nous avons étudié les propriétés photophysiques de nombreux photosensibilisants synthétisés par l'équipe roumaine du Dr R.M. Ion (en charge du programme), l'étude a été effectuée à l'Université d'Amsterdam dans le cadre d'un échange Européen Marie Curie.

Partie I

Etat de l'art – Objectifs du travail

1 Le cancer

1.1 Introduction

Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération anormale et anarchique des cellules d'un tissu ou d'un organe. En évoluant, ces cellules acquièrent généralement un pouvoir d'envahissement loco-régional, puis la capacité de former des métastases à distance du foyer primaire, en utilisant les systèmes vasculaires et lymphatiques. On parle dans ce cas de tumeurs malignes, par opposition aux tumeurs bénignes qui n'envahissent pas les tissus voisins. Ce type de maladie a été relaté dans les premiers recueils médicaux égyptiens, mésopotamiens ou encore indiens datant du troisième millénaire avant la naissance du Christ. Le terme « *carcinoma* » a été utilisé pour la première fois au 4^{ème} siècle avant notre ère par Hippocrate ^[1]. De nos jours, la cancérologie concentre son action sur deux fronts : le diagnostic précoce des tumeurs et le développement de nouveaux traitements ciblés. En effet, le diagnostic précoce permet ensuite de traiter efficacement les tumeurs, avec des chances de guérison plus grandes. La mise au point de traitements ciblés agissant spécifiquement au niveau des cellules tumorales pourrait augmenter l'efficacité thérapeutique et la tolérance des médicaments actuels.

1.2 Données épidémiologiques

L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime qu'il y a 10 millions de nouveaux cas de cancer dans le monde chaque année et que 6 millions de personnes en meurent. Des atteintes très différentes sont observées selon le sexe. Les hommes sont particulièrement touchés par les cancers du poumon, de la prostate, de l'estomac, suivis par le cancer du colon et du rectum, du foie, de l'œsophage et de la vessie (Figure 1). Les femmes, quant à elles, sont essentiellement touchées par le cancer du sein et de l'utérus, suivis par ceux du colon et du rectum, du poumon et de l'estomac (Figure 2) ^[2]. En France, les études épidémiologiques dénombrent 150 000 décès par an pour 280 000 nouveaux cas (Figure 3) ^[3]. De fait, le cancer apparaît comme la première cause de décès chez les hommes et la deuxième cause chez les femmes, juste derrière les maladies cardio-vasculaires. On peut également noter l'augmentation rapide de certains cancers, tels que les mélanomes, depuis 20 ans (Figure 4).

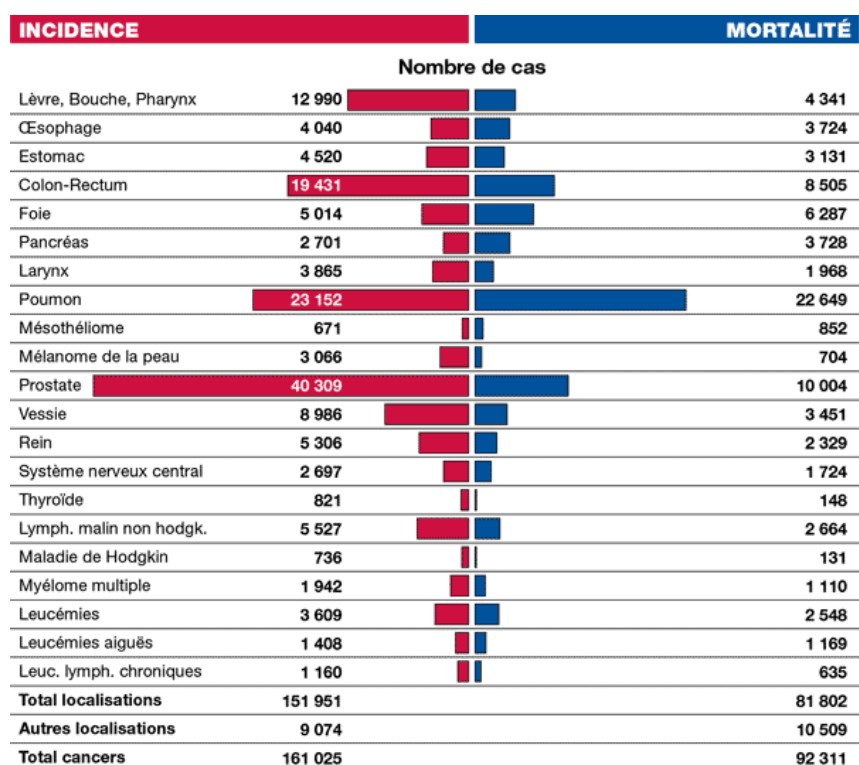


Figure 1 : Incidence et taux de mortalité des différents types de cancer en France chez l'homme en 2000 [3]

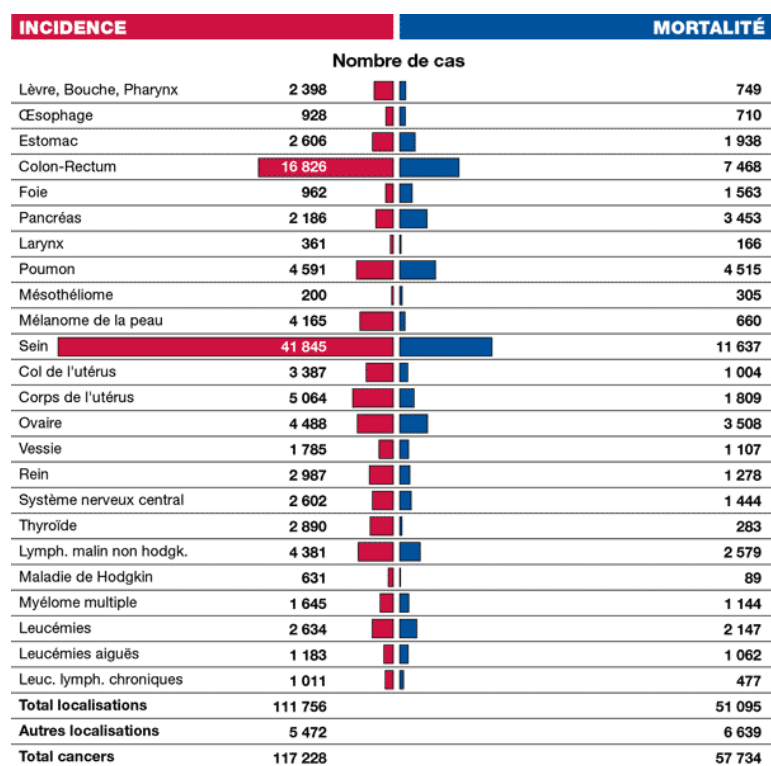


Figure 2 : Incidence et taux de mortalité des différents types de cancer en France chez la femme en 2000 [3]

	INCIDENCE	MORTALITÉ
Nombre de cas		
Lèvre, Bouche, Pharynx	15 388	5 090
Œsophage	4 968	4 434
Estomac	7 126	5 069
Colon-Rectum	36 257	15 973
Foie	5 976	7 850
Pancréas	4 887	7 181
Larynx	4 226	2 134
Poumon	27 743	27 164
Mésothéliome	871	1 157
Mélanome de la peau	7 231	1 364
Sein	41 845	11 637
Col de l'utérus	3 387	1 004
Corps de l'utérus	5 064	1 809
Ovaire	4 488	3 508
Prostate	40 309	10 004
Vessie	10 771	4 558
Rein	8 293	3 607
Système nerveux central	5 299	3 168
Thyroïde	3 711	431
Lymph. malin non hodgk.	9 908	5 243
Maladie de Hodgkin	1 367	220
Myélome multiple	3 587	2 254
Leucémies	6 243	4 695
Leucémies aiguës	2 591	2 231
Leuc. lymph. chroniques	2 171	1 112
Total localisations	263 707	132 897
Autres localisations	14 546	17 148
Total cancers	278 253	150 045

Figure 3 : Incidence et taux de mortalité globaux en France des différents types de cancer en 2000 [3]

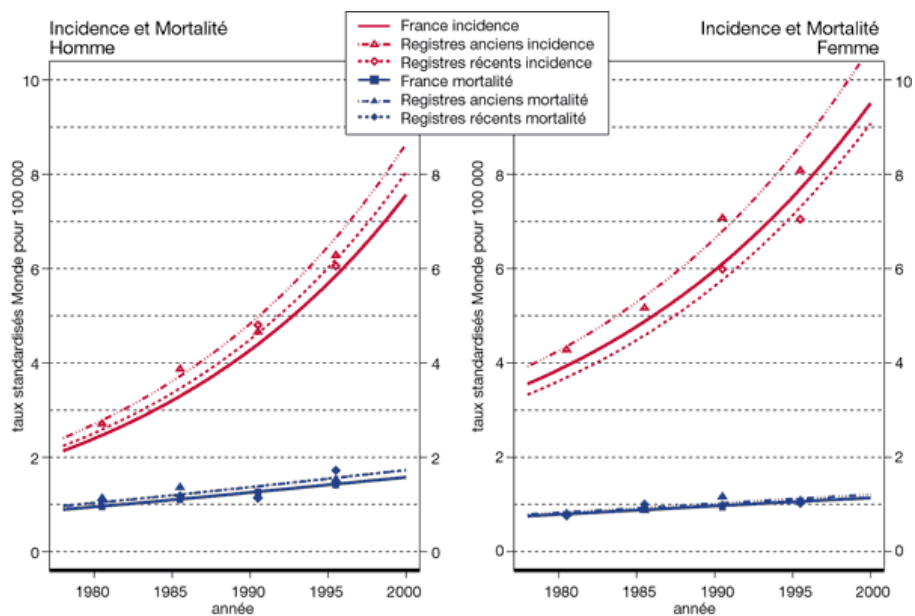


Figure 4 : Evolution de l'incidence et de la mortalité des mélanomes en France depuis 1980 [3]

1.3 La cancérogenèse

Les cellules cancéreuses échappent aux mécanismes normaux de différenciation et de régulation de la prolifération, tout en acquérant un pouvoir de migration et d'invasion des tissus sains. On peut distinguer trois phases dans le processus de cancérogenèse :

- La transformation maligne d'une cellule saine et sa prolifération (cancérogenèse).
- L'angiogenèse et l'extension loco-régionale.
- L'invasion ganglionnaire puis métastatique.

La cancérogenèse implique en général plusieurs altérations génétiques, principalement au niveau des gènes de régulation du cycle cellulaire. Ceux-ci peuvent se classer en deux grandes familles :

- Les oncogènes : ils peuvent coder pour des facteurs de croissance ou leurs récepteurs (erbB par exemple), des facteurs de transcription (myc), des protéines inductrices de l'apoptose (bcl-2) ou encore des protéines kinases (raf). Leur expression est dominante et ils entraînent la perte du contrôle du cycle cellulaire.
- Les gènes suppresseurs de tumeurs : le plus connu de ces gènes est p53, qui est altéré dans 50% des cancers. Une double mutation est généralement nécessaire à la perte de ces gènes protecteurs.

Les six propriétés universelles acquises par les tumeurs malignes ont été décrites par Hanahan et Weinberg comme suit (Figure 5) ^[4] :

- Le développement d'une boucle d'auto-stimulation : la stimulation autocrine des cellules malignes conduit à la génération de signaux de croissance mitogènes. De plus, la surexpression des récepteurs des facteurs de croissance ou leur activation constitutive induit une réponse à des taux de facteurs de croissance très faibles.

- L'insensibilité aux inhibiteurs de croissance : l'inactivation des mécanismes de contrôle du cycle cellulaire (p53, inhibiteurs de cdk) ou des récepteurs des signaux anti-prolifératifs favorisent la prolifération cellulaire.
- L'invasion tumorale et les métastases : la modification ou la perte de glycoprotéines à la surface des cellules tumorales permet à la tumeur de se répandre au niveau ganglionnaire puis de métastaser. Les propriétés de migration des cellules tumorales sont dues à la fois à une surexpression de molécules d'adhésion à la matrice extracellulaire (e.g. les intégrines) et à la perte de molécules d'adhésion intercellulaires comme les cadhérines. L'envahissement de la membrane basale ainsi que la pénétration dans les systèmes circulatoire et lymphatique sont dus à la libération d'enzymes protéolytiques telles que la collagénase et les métalloprotéases. Le développement des métastases est généralement associé à un très mauvais pronostic vital.
- Leur potentiel de réplication illimité : les cellules tumorales échappent au phénomène de sénescence par la dérégulation du gène de la télomérase.
- L'induction de la néo-angiogenèse, processus clé de la progression tumorale. Lorsque les tumeurs dépassent 2 mm, les nutriments et l'oxygène ne peuvent plus parvenir au centre de la tumeur par simple diffusion ^[5]. La tumeur passe alors d'une phase de croissance avasculaire à la phase angiogénique par libération de *stimuli* pro-angiogéniques. Les cellules cancéreuses augmentent la production de facteurs de croissance comme le VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) et les FGF 1 et 2 (*Fibroblast Growth Factor*), tout en diminuant l'activité d'inhibiteurs comme l'interféron β . Cela conduit à la formation de ramifications vasculaires qui soutiennent la croissance tumorale. La néo-angiogenèse est une cause fondamentale de la malignité des tumeurs et donc une cible thérapeutique de choix. Cette stratégie sera développée dans le chapitre dédié à la néo-angiogenèse.
- L'évitement de l'apoptose : dans les cellules normales, les effecteurs apoptotiques reçoivent en permanence des signaux de vie ou de mort

provenant de l'espace extracellulaire grâce à des interactions ligands/récepteurs. En inactivant les récepteurs induisant la mort cellulaire ou en émettant des facteurs de survie de manière autocrine, les cellules tumorales échappent à l'apoptose. Au niveau intracellulaire, les protéines de la famille de Bcl-2 activent ou inhibent l'apoptose en cas de stress oxydatif, de lésion de l'ADN et de bien d'autres dérèglements. On observe très souvent une dérégulation de ces protéines dans les cellules tumorales.

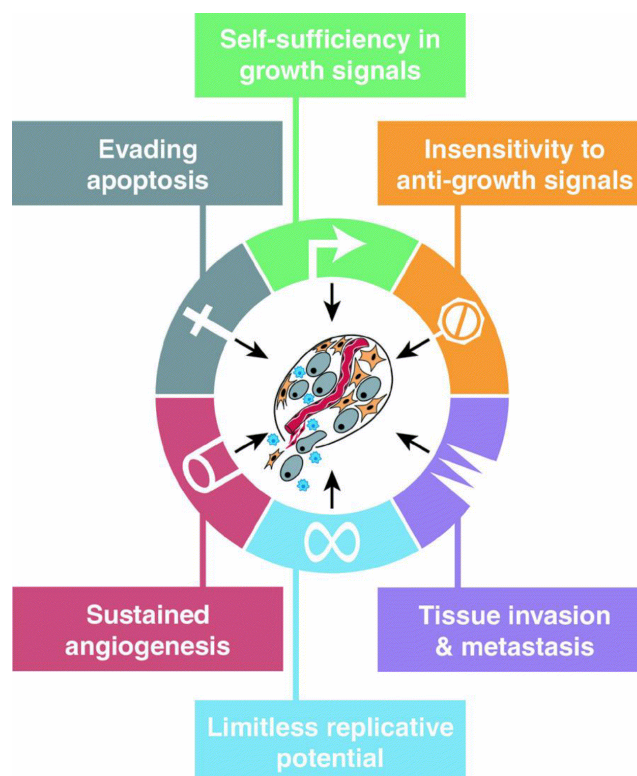


Figure 5 : Les six propriétés universelles acquises par les tumeurs malignes selon Hanahan et Weinberg ^[4]

1.4 Méthodes utilisées pour le diagnostic et le traitement des cancers

1.4.1 Le diagnostic

Les techniques utilisées de nos jours sont majoritairement des techniques d'imagerie, toujours appuyées par un examen anatomo-pathologique.

- La radiographie utilise les rayons X en présence ou non d'agents contrastants.

- La tomographie et le scanner sont de plus en plus utilisés afin d'obtenir une image en 3D de la tumeur.
- L'échographie utilise la réflexion des ultrasons et est utilisée pour l'exploration des organes profonds non creux.
- L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) permet d'explorer les organes mous riches en eau, comme le cerveau.
- La scintigraphie permet d'étudier des zones d'hyper- ou d'hypo-fixation de substances radioactives injectées.
- Le Petscan (tomographie par émission de positons) est une technique relativement récente permettant d'observer l'activité métabolique tumorale *via* des métabolites radioactifs.
- L'endoscopie permet la visualisation de lésions accessibles par une fibre optique et le prélèvement de biopsies. La recherche de lésions précoces peut être effectuée grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes, ce que l'on appelle le photodiagnostic, les biopsies sont ensuite analysées en immunohistochimie.

1.4.2 Le traitement

De toutes les méthodes existantes, la plus ancienne est la chirurgie et reste la plus efficace dans la majorité des cas. Toutefois, de meilleurs résultats sont obtenus en y associant d'autres techniques.

1.4.2.1 La radiothérapie

La radiothérapie induit la mort des cellules tumorales à l'aide de rayonnements ionisants qui entraînent des lésions de l'ADN. La source ionisante peut être externe ou interne. On parle alors de curiethérapie. Cette méthode est surtout utilisée dans le cas de petites tumeurs et dans les cancers du sein, elle limite l'irradiation des tissus environnants.

1.4.2.2 La chimiothérapie

La chimiothérapie est basée sur l'utilisation de molécules capables de tuer les cellules proliférantes. Les anti-métabolites, comme le 5-FU (5-fluoro-uracile), inhibent la biosynthèse des acides nucléiques en bloquant certaines étapes essentielles. Les agents alkylants se lient par liaison covalente aux acides nucléiques, inhibant la transcription et la division cellulaire.

Le plus connu des agents alkylants est le cis-platine. Les inhibiteurs de topoisomérases, quant à eux, bloquent la fusion locale du double brin d'ADN lors de la réplication et de la transcription. Les agents intercalants sont tous de la famille des anthracyclines et leur structure plane permet une intercalation entre les deux brins d'ADN. Les poisons du fuseau cellulaire, comme la vincristine, inhibent la formation du fuseau mitotique et, donc, gênent la répartition des chromosomes dédoublés (Figure 6).

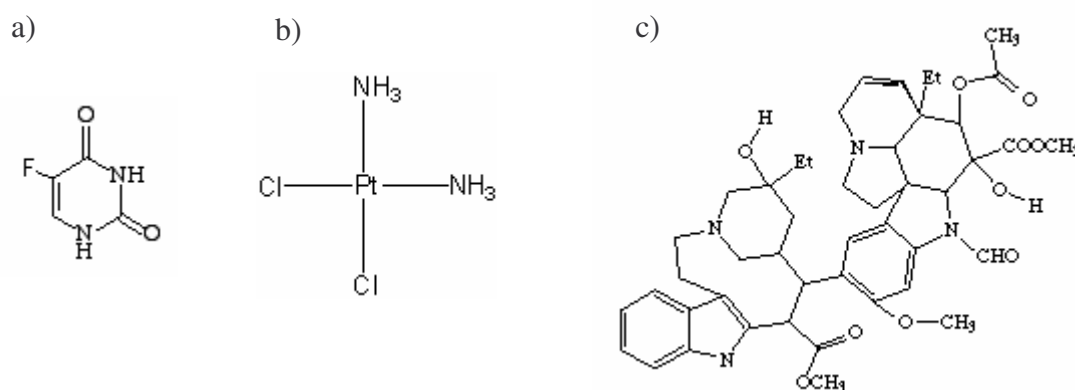


Figure 6 : Structure des principales molécules utilisées en chimiothérapie : Le 5-fluoro-uracile (a), le cis-platine (b), la vincristine (c)

Actuellement, les protocoles associent souvent différentes molécules afin d'obtenir une additivité ou une synergie des effets. Malheureusement, ces traitements sont peu sélectifs et l'on observe de nombreux effets secondaires tels que vomissements, douleurs intenses, perte des cheveux... Des phénomènes de résistance apparaissent également et limitent l'efficacité thérapeutique. Aussi, de nombreux laboratoires travaillent actuellement à la mise au point de composés ayant une activité ciblée. La lutte contre les cancers agressifs qui ont la propriété de métastaser est également intense, de par le mauvais pronostic vital de ces tumeurs.

1.4.2.3 La thérapie photodynamique (PDT)

La thérapie photodynamique est une photochimiothérapie. Cette technique, en plein essor, utilise une drogue, un photosensibilisant, qui va induire un stress oxydatif létal pour les cellules tumorales sous l'effet de l'irradiation lumineuse. Elle ne possède pas les inconvénients de la radiothérapie (utilisation de radioisotopes) et de la chimiothérapie (manque de sélectivité), car le traitement reste localisé. En revanche, le point faible de cette méthode, reste l'utilisation de la lumière et son faible degré de pénétration dans les tissus, ce qui en limite l'application à des tumeurs de petite taille. Dans la partie suivante, nous allons détailler cette technique.

2 La thérapie photodynamique

2.1 Principe de base

La PDT, encore appelée photochimiothérapie, est basée sur l'utilisation de photosensibilisants, en général des dérivés de porphyrines, rendus cytotoxiques par irradiation lumineuse en présence d'oxygène. Ces photosensibilisants ont comme double spécificité de se fixer préférentiellement au niveau des tissus néoplasiques et de n'être toxiques qu'en présence de lumière. Après injection par voie systémique et un délai allant de quelques minutes à plusieurs jours, les photosensibilisants sont activés (passage à l'état triplet excité des molécules par absorption photonique) ^[6], généralement à l'aide d'un laser à une longueur d'onde adéquate. Ils induisent des réactions oxydatives entraînant des altérations cellulaires irréversibles au niveau des lipides membranaires, des protéines ou encore des acides nucléiques induisant la mort cellulaire par nécrose et/ou apoptose ^[7, 8].

2.2 Rappels historiques

Le peuple égyptien traitait, il y a plus de 3000 ans, des personnes atteintes de vitiligo, une maladie de la peau, en appliquant des feuilles de persil broyées sur la zone à traiter. Après exposition au soleil, ils obtenaient une repigmentation de la zone traitée grâce aux psoralènes présents dans cette plante ^[9].

En 1900, Raab fut le premier à décrire l'effet photodynamique en observant l'impact de l'exposition lumineuse sur des paramécies en présence d'acridine orange ^[10]. Ce concept fut utilisé trois ans plus tard par son directeur de thèse, Tappeiner, qui traita des cancers de la peau à l'aide d'éosine et de lumière solaire ^[11]. Hausmann décrivit la première utilisation d'un macrocycle tétrapyrrolique, l'hématoporphyrine, en 1911 ^[12]. Celui-ci démontra que le degré de photosensibilisation de souris dépendait de la dose de photosensibilisant administrée et de la dose de lumière appliquée. En 1913, Meyer-Betz passa à l'étude de ce composé sur l'homme, en s'injectant 200 mg d'hématoporphyrine et en frôlant la mort par œdème ^[13]. En 1924, Policard détecta une fluorescence rouge lors de l'irradiation de tumeurs par une lampe ultraviolette et l'attribua à l'accumulation de porphyrines endogènes dans les cellules cancéreuses ^[14]. L'accumulation préférentielle de porphyrines dans les tumeurs fut décrite par Auler et Banzer en 1942 sur un modèle tumoral de rat ^[15]. En 1948, Figge et Weiland mirent en évidence l'émission de fluorescence de l'hématoporphyrine *in situ* ^[16]. Cette propriété fut utilisée treize ans plus tard, quand Lipson suggéra d'utiliser un dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) afin de détecter les tumeurs ^[17]. L'HpD est préparée en traitant l'hématoporphyrine par un mélange d'acide sulfurique et d'acide acétique, suivi d'une hydrolyse alcaline.

A partir des années 70, la thérapie photodynamique entre dans une nouvelle ère, en prenant un réel essor, tant au niveau expérimental qu'au niveau clinique. En effet, en 1975, Kelly et Snell traitent un carcinome de la vessie ^[18], mais ce sont les travaux de Dougherty qui eurent le plus d'impact. En 1975, il décrivit l'éradication totale de tumeurs mammaires murines ^[19] et, surtout, en 1978, la première série de patients traités par l'HpD à l'aide d'une lampe Xénon ^[20]. Il utilisa ensuite une source laser, permettant une plus grande pénétration de la lumière dans les tissus et identifia également la fraction active de l'HpD en 1983 comme étant l'éther ou l'ester de dihématoporphyrine ^[21]. La partie « purifiée » de l'HpD est commercialisée sous le nom de Photofrin® et reçoit l'autorisation de mise sur le marché en 1996 en France, pour le traitement des rechutes des cancers bronchiques et de l'œsophage. Depuis les années 70, la thérapie photodynamique a été utilisée sur des milliers de patients et montre de

bons résultats sur les tumeurs de petite taille de la peau, du poumon, de l'œsophage et de l'estomac.

Le nombre d'équipes scientifiques et de sociétés pharmaceutiques développant de nouveaux photosensibilisants, ainsi que de nouvelles méthodes d'irradiation ne cesse de croître. Des sources lumineuses adaptées aux divers usages cliniques et d'un coût réduit, en comparaison avec les sources lasers, sont mises sur le marché. Conjointement, la recherche de photosensibilisants d'une grande pureté, activés par la lumière rouge, non toxiques à l'obscurité et sélectifs, est très dynamique et devrait apporter, d'ici quelques années, des possibilités, jusqu'à présent inégalées, aux cliniciens et aux patients.

2.3 Mécanismes

La thérapie photodynamique ou photochimiothérapie est une technique à visée thérapeutique originale. En effet, pour être efficace, le traitement nécessite l'action de trois agents : un photosensibilisant, la lumière et l'oxygène. Le photosensibilisant a la propriété de s'incorporer préférentiellement au niveau des tissus cancéreux, en comparaison avec le tissu sain environnant. Ensuite, sous l'action d'une lumière de longueur d'onde appropriée, deux effets distincts sont observés :

- Un effet thérapeutique : lorsque le photosensibilisant est incorporé dans les cellules néoplasiques et activé par la lumière, il peut engendrer des réactions chimiques oxydatives qui vont conduire à la formation de radicaux et d'espèces réactives de l'oxygène. Ces différentes espèces entraînent des altérations cellulaires irréversibles, au niveau des membranes, des acides nucléiques ou encore des protéines, ce qui conduit à la nécrose du tissu.
- Un photodiagnostic : la majorité des photosensibilisants utilisés a la propriété de fluorescer. Ainsi, l'excitation d'un tissu, *a priori* sain, par une lumière de longueur d'onde appropriée, peut permettre de détecter les zones de plus forte incorporation des photosensibilisants. Ces zones peuvent être des lésions cancéreuses ou pré-cancéreuses qui sont

détectées avec une bonne sensibilité, parfois supérieure à d'autres techniques.

L'utilisation de la lumière comme source d'énergie en thérapie photodynamique limite son application à des tumeurs de petite taille et accessibles à la lumière. Ce traitement nécessite également une infrastructure médicale importante (source de lumière, dosimètre, diffuseur) et est définie par une posologie en photosensibilisant et par une fluence qui est l'énergie lumineuse absorbée par une unité de surface du tissu. De plus, l'optimisation du traitement nécessite une bonne compréhension des paramètres qui influent sur le traitement tels que la température, la répartition du photosensibilisant (au niveau tissulaire et intracellulaire), le pH ou encore le taux d'oxygène. Ces paramètres vont dépendre de la nature des tissus visés et du photosensibilisant utilisé par le clinicien.

2.3.1 Les processus photochimiques

Le photosensibilisant dans son état fondamental S_0 passe au niveau excité singulet S_n par absorption d'un photon d'énergie $h\nu$ suffisante. En un temps très court, de l'ordre de 10^{-12} secondes, il passe à l'état singulet S_1 par un processus de conversion interne (relaxations électroniques et vibrationnelles essentiellement).

Lorsque le photosensibilisant est à l'état S_1 , il peut revenir à l'état fondamental S_0 par émission de fluorescence, ou désactivation non radiative, ou passer à l'état excité T_1 par conversion intersystème (CIS) (Figure 7). La conversion intersystème, qui est une transition interdite, nécessite que le photosensibilisant à l'état singulet S_1 ait une durée de vie suffisamment longue afin d'augmenter la probabilité d'inversion de spin électronique. Les porphyrines et leurs dérivés possèdent cette propriété et passent à l'état triplet avec, généralement, un rendement élevé (de l'ordre de 50%). Dans ce cas, le retour à l'état fondamental S_0 est très lent car il s'agit, à nouveau, d'une transition interdite. La durée de vie de l'état triplet est par conséquent longue (de l'ordre de la milliseconde) et permet au photosensibilisant soit de se désactiver par phosphorescence soit de réagir avec d'autres molécules environnantes, suivant deux types de réactions, dites de type I et de type II ^[22].

Les photosensibilisants utilisés en photodiagnostic doivent avoir un bon rendement quantique de fluorescence. A l'opposé, les composés, à visée thérapeutique, requièrent un rendement quantique de formation de l'état triplet élevé ainsi qu'un état triplet de durée de vie longue [23]. Ces processus sont schématisés par le diagramme de Jablonski (Figure 7).

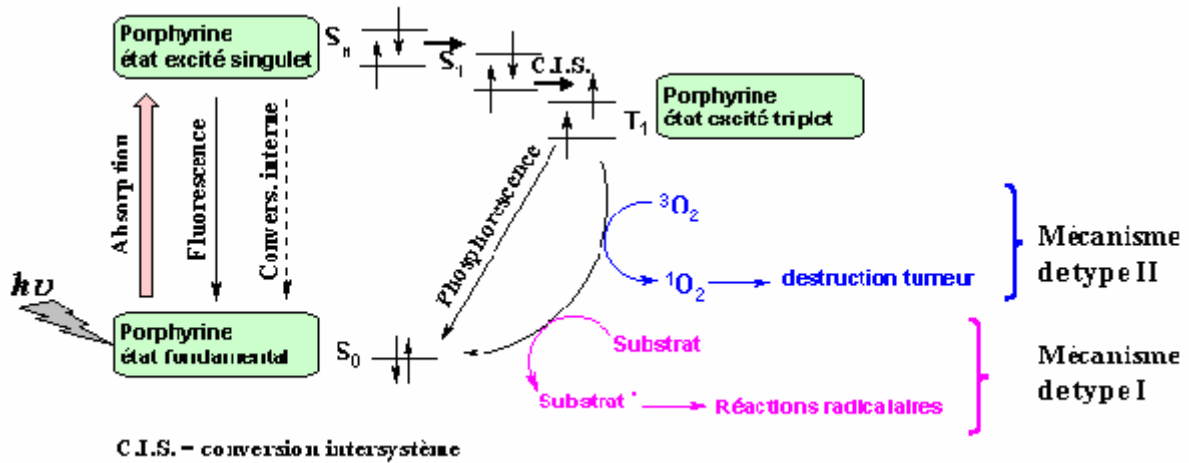
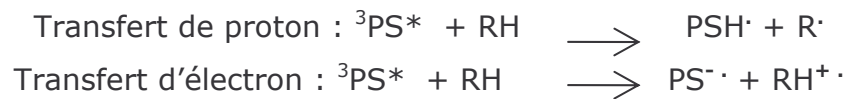


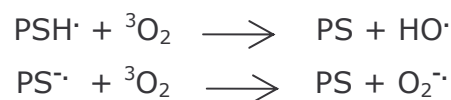
Figure 7 : Diagramme de Jablonski

2.3.1.1 Les photoréactions de Type I

Le mécanisme dit de type I implique un transfert d'électrons ou d'hydrogène entre le photosensibilisant à l'état excité et des substrats biologiques pour former des radicaux et des ions radicalaires, conduisant, finalement, à la formation d'espèces réactives de l'oxygène :



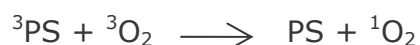
Les radicaux PSH[·] et PS^{·-} ainsi formés peuvent alors réagir sur un nouveau substrat RH ou sur l'oxygène moléculaire à l'état fondamental triplet (³O₂). Cette dernière réaction permet à la fois la formation d'agents oxydants (ROS) très toxiques pour la cellule et la régénération du photosensibilisant :



L'anion superoxyde peut conduire à la formation de radicaux hydroxyle OH[•] qui sont considérés comme les métabolites oxygénés les plus destructeurs au niveau cellulaire.

2.3.1.2 Les photoréactions de Type II

Ce mécanisme conduit à la production d'oxygène singulet (¹O₂) *via* un transfert de l'énergie d'excitation du photosensibilisant à l'état triplet vers l'oxygène moléculaire (également à l'état fondamental triplet) :



L'oxygène singulet ne peut être généré que par des photosensibilisants dont la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité triplet est supérieure à l'énergie nécessaire à l'oxygène pour passer à l'état singulet, soit 94 kJ mol⁻¹ [24]. L'oxygène singulet possède une durée de vie très courte (dépendante du solvant) mais est extrêmement réactif. Cette réactivité nous amène à penser que l'oxygène singulet réagit dans un environnement proche de son lieu de formation [25]. Ainsi, son action cytotoxique dépend uniquement de sa localisation intracellulaire. Les cibles de l'oxygène singulet sont les protéines et les membranes. Il peut également réagir avec le photosensibilisant, pour former des photoproduits et on parle alors de photoblanchiment.

Il est admis que l'oxygène singulet est l'agent toxique le plus important en PDT bien qu'il reste difficilement quantifiable, *via* sa luminescence à 1,27 μm, dans les milieux biologiques [26]. Cela dit, l'effet photodynamique est constitué par un ensemble de processus complexes qui vont induire l'inactivation des constituants cellulaires et, par la suite, la mort cellulaire grâce à la formation d'espèces radicalaires (RO[•]) et d'espèces réactives de l'oxygène (¹O₂, O₂²⁻). La destruction tumorale résulte de deux mécanismes d'action, cellulaires et vasculaires, qui s'influencent mutuellement.

2.3.2 Mécanismes directs : dommages cellulaires

La mort cellulaire peut intervenir selon deux processus très différents, la nécrose ou l'apoptose :

- La nécrose est observée lorsque les cellules sont exposées à des dommages cellulaires importants, dus, par exemple, à une forte concentration du photosensibilisant, à sa localisation membranaire ou encore à une dose de lumière élevée. La membrane cellulaire perd alors son intégrité, la cellule gonfle et libère son contenu. La libération de molécules toxiques et d'enzymes hydrolytiques induit alors une réaction inflammatoire [27].

- L'apoptose, ou mort cellulaire programmée, est un processus actif ordonné [28] et étroitement contrôlé par des signaux intra et extra-cellulaires. Ces signaux vont conduire à la condensation de la chromatine et à la formation de bourgeons contenant tous les composants cellulaires. Ces vésicules sont ensuite phagocytées par les cellules environnantes ou les monocytes. Il n'y a donc ni réaction inflammatoire ni formation de tissu cicatriciel. Un stress oxydatif léger sert de médiateur intracellulaire lors de l'apoptose. Il conduit à l'activation de nucléases qui clivent l'ADN en fragments de 200 paires de bases. On observe également la libération de cytochrome c mitochondrial. Ce dernier peut se lier à Apaf-1 (*Apoptosis proteas-activating factor-1*) qui active la procaspase 9 et forme ainsi l'apoptosome. Cet apoptosome active les caspases 3 et 7 (**Cystéine-Aspartate-protéases**) qui amplifient la dégradation des protéines cellulaires. La localisation subcellulaire du photosensibilisant influence donc fortement le mode de mort cellulaire et l'efficacité de la PDT [29].

Les photosensibilisants hydrophobes comme le Photofrin® [30] et amphiphiles comme le Foscan® possèdent une forte affinité pour les membranes cellulaires et peuvent présenter une accumulation préférentielle au niveau de certains organites tels que les mitochondries et lysosomes, produisant plutôt un effet apoptotique. Les photosensibilisants hydrophiles, tels que la chlorine e6 sont incorporés par endocytose et sont donc généralement retrouvés dans les lysosomes.

2.3.3 Mécanismes indirects : dommages vasculaires et immunitaires

La néo-angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est essentielle au développement tumoral. La formation de ces néo-vaisseaux est stimulée par des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, bFGF...) produits par les cellules tumorales. Ces néo-vaisseaux assurent le transport de l'oxygène, des nutriments et l'évacuation des déchets du métabolisme tumoral [31]. Ils présentent un aspect chaotique très différent du réseau vasculaire non pathologique et sont très fragiles et perméables, favorisant la dissémination métastatique. La PDT peut induire une altération du système vasculaire et la mort de la tumeur par ischémie [32] *via*, par exemple, l'adressage de photosensibilisants reconnaissant les cellules endothéliales vasculaires.

La PDT entraîne généralement une réaction inflammatoire intense autour des tissus nécrotiques. Celle-ci serait due à l'altération de l'endothélium [33], mais surtout à la libération de lipides membranaires photooxydés [34]. Une production massive de cytokines chimiotactiques est également souvent associée au traitement [35, 36]. Ces cytokines induisent le recrutement et l'activation des cellules effectrices de l'inflammation [37].

2.4 Les photosensibilisants

2.4.1 Le photosensibilisant idéal

Le photosensibilisant idéal doit être un composé pur ou, s'il s'agit d'un mélange, chimiquement parfaitement défini. Il doit être non toxique en absence de lumière et doit posséder une forte sélectivité vis-à-vis des cellules cancéreuses. Il doit absorber dans le domaine visible, si possible entre 630 et 750 nm. En effet, la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus humains est maximale à ces longueurs d'onde (Figure 8), due à la faible absorption de l'hémoglobine et de l'oxyhémoglobine dans cette zone du spectre. Au-delà de 800 nm, l'eau absorbe la lumière et les composés sont beaucoup plus sensibles à l'oxydation car ils sont hyper-conjugués.

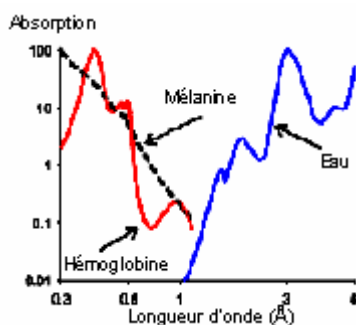


Figure 8 : Absorption de la lumière par les tissus humains et l'eau

L'état triplet doit avoir une énergie supérieure à 94 kJ mol^{-1} et doit, bien entendu, induire la formation d'oxygène singulet avec un rendement quantique élevé ($\Phi_{\Delta} \geq 0,3$). De plus, la durée de vie à l'état triplet doit être suffisamment longue ^[38]. Les porphyrines et leurs dérivés répondent à ces critères.

2.4.2 Structure chimique

Les porphyrines (du grec *porphura* = pourpre) sont des dérivés de la porphine qui est un macrocycle aromatique à 18 électrons π , dont les quatre noyaux pyrroliques sont liés les uns aux autres par des ponts méthényles (=CH-) (Figure 9).

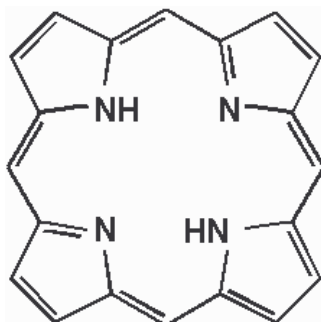


Figure 9 : Structure de la porphine

Les porphyrines se différencient de la porphine par la présence de divers substituants au niveau des pyrroles et/ou des ponts méthényles. On trouve des porphyrines chez tous les êtres vivants. Elles peuvent être utilisées aussi bien dans le métabolisme énergétique (chlorophylles), le métabolisme secondaire (vitamine B12) que dans un rôle de transport (associées à l'hémoglobine) (Figure 10).

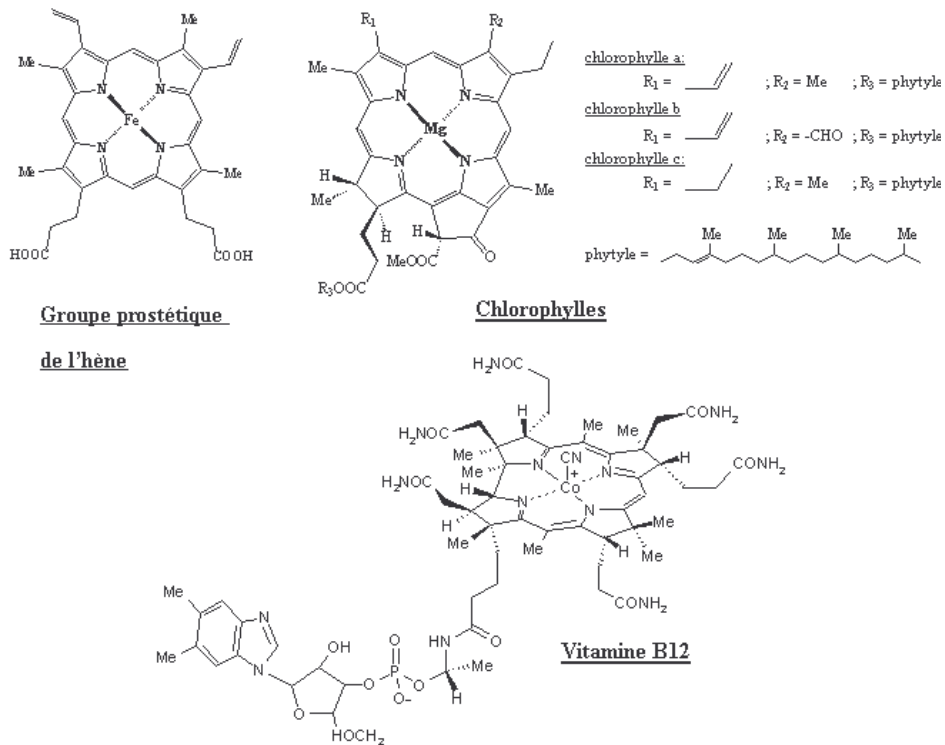


Figure 10 : Exemples de porphyrines naturelles

Ce sont des molécules qui sont liées à des cations (Mg^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+}) ou sous forme de base libre. Le degré d'oxydation de ces ions métalliques est une des caractéristiques déterminant le rôle physiologique des porphyrines (état redox de la cellule). Lorsqu'une double liaison du cycle tétrapyrrolique est réduite, on obtient une chlorine et lorsque deux doubles liaisons sont hydrogénées, on parle de bactérochlorine ou d'isobactérochlorine (Figure 11).

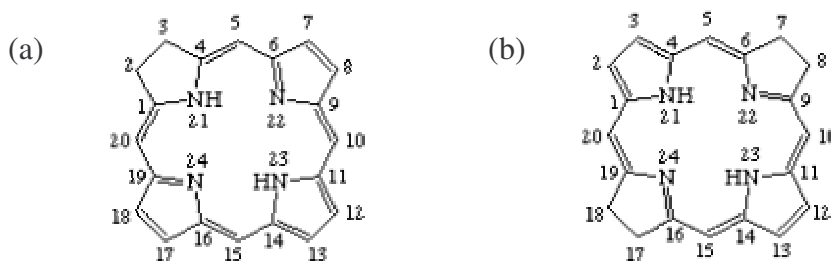


Figure 11 : Les autres classes de porphyrines : Chlorine (a), Bactérochlorine (b)

2.4.3 Caractérisation des porphyrines et de leurs dérivés

2.4.3.1 Spectroscopie UV-Visible

La coloration pourpre des porphyrines résulte de la conjugaison de leur système d'électrons π hyperconjugué. Ces molécules possèdent un spectre d'absorption très caractéristique. Classiquement, on observe la présence d'une forte bande d'absorption entre 390 et 430 nm ($\epsilon \geq 100\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) appelée bande de Soret et de quatre bandes d'absorptions beaucoup plus faibles, qui se trouvent dans une zone entre 480 et 700 nm, les bandes Q.

La position et l'intensité de ces bandes (notées de I à IV et d'énergie décroissante) renseignent sur la substitution du macrocycle [39]. On distingue ainsi quatre types de spectres majeurs, appelés : *étio*, *rhodo*, *oxorhodo* et *phyllo* (Figure 12) [40]. Le type *étio* est majoritairement rencontré dans le cas de porphyrines β -substituées. Le spectre de type *rhodo* est généralement observé en présence de groupements riches en électrons π en position β -pyrrolique. La présence de ces mêmes groupements, toujours en position β -pyrrolique, mais sur deux pyrroles opposés caractérise le type *oxorhodo*. Les *méso*-arylporphyrines, quant à elles, sont des porphyrines qui portent un substituant saturé et possèdent, fréquemment, un spectre de type *phyllo*.

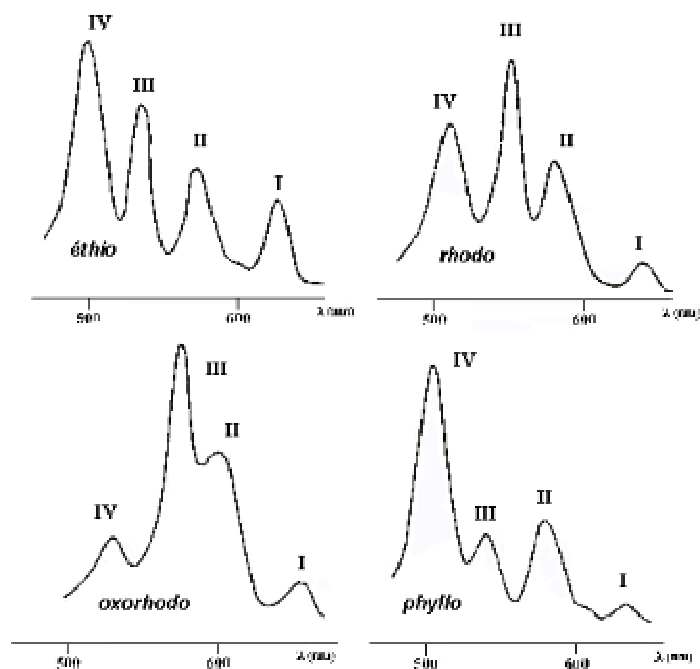


Figure 12 : Profil des bandes Q pour les quatre principaux types de spectres d'absorption de porphyrines bases libres

Dans le cas des porphyrines protonées ou métallées, on observe toujours la bande de Soret, mais le nombre de bandes Q est réduit à deux. Ces bandes sont nommées α et β , en partant des plus grandes longueurs d'onde (Figure 13).

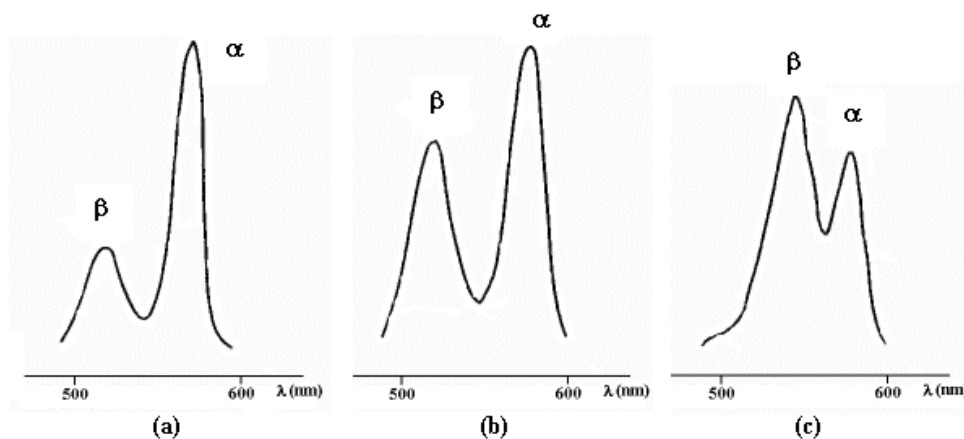


Figure 13 : Bandes Q de spectre d'absorption d'octaéthylporphyrines métallées par : Ni(II) (a), Zn(II) (b) et Cd(II) (c)

Inversement, la nature des substituants latéraux a peu d'effet sur les intensités relatives des deux bandes, en comparaison avec l'effet produit par l'ion central. En effet, la nature paramagnétique ou diamagnétique, modifie le rapport des intensités des deux bandes. Un rapport $\alpha/\beta < 1$ indique la présence d'un métal diamagnétique facilement remplacé par deux protons, comme le cadmium par exemple. Par contre, la présence d'un métal paramagnétique comme le nickel ou encore le zinc, qui forme un complexe plan stable avec le macrocycle, est indiqué par un rapport $\alpha/\beta > 1$.

Les chlorines, qui, rappelons-le, diffèrent uniquement des porphyrines par réduction d'une double liaison, arborent également des bandes d'absorption semblables à celles des porphyrines, exceptée la bande Q_I qui est beaucoup plus intense (Figure 14). Les chlorines ont donc un grand attrait pour les cliniciens, pour des raisons évidentes de dose de lumière absorbable dans le rouge.

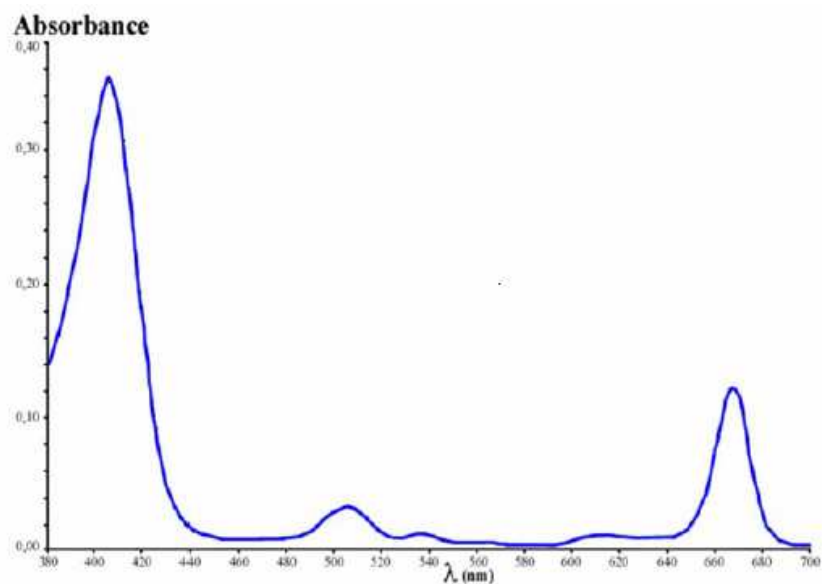


Figure 14 : Spectre UV-visible caractéristique d'une chlorine

L'intensité de la bande Q_I des bactériochlorines est encore plus élevée. De plus, la bande Q_I est très souvent décalée vers le rouge, aux alentours de 720 nm. Bien que ces propriétés soient attrayantes, ces composés sont très photolabiles, aussi bien *in vitro* ^[41] qu'*in vivo* ^[42], ce qui en réduit leur intérêt.

2.4.3.2 Spectroscopie d'émission de fluorescence

En plus d'un spectre d'absorption caractéristique, les porphyrines ont des propriétés d'émission lumineuse au-delà de 600 nm. Comme nous l'avons déjà vu, cette propriété permet la détection des zones de plus forte accumulation de photosensibilisants. Le photodiagnostic est un outil de dépistage précoce des tumeurs, à condition de mettre en place de puissantes méthodes de détection et d'amplification du signal ^[43]. Nous observons deux pics de fluorescence. La première bande se situe entre 620 et 700 nm avec un maximum vers 650 nm et la seconde, d'intensité plus faible, entre 700 et 750 nm avec un maximum vers 720 nm (Figure 15). Cette région d'émission, située dans le rouge lointain, se situe dans une fenêtre optique où les tissus biologiques absorbent peu et facilite l'observation de la localisation intracellulaire des photosensibilisants par microscopie confocale.

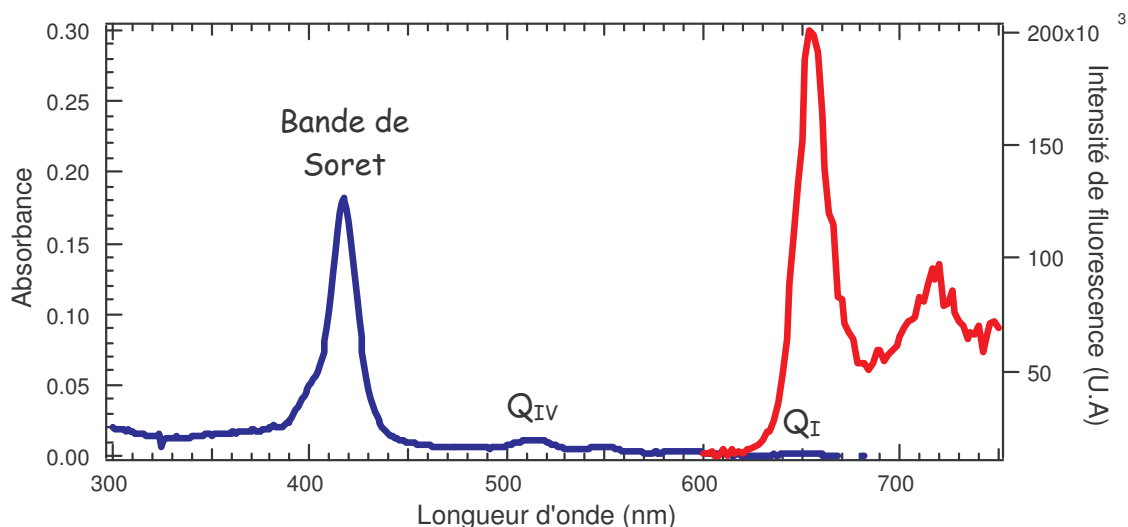


Figure 15 : Spectres d'absorption et de fluorescence typiques d'une porphyrine

2.4.3.3 La microscopie confocale, principe et appareil utilisé

Nous avons utilisé la microscopie confocale à balayage laser en mode fluorescence afin d'étudier la localisation intracellulaire des photosensibilisants. Cette technique représente une avancée technologique majeure dans l'imagerie biologique. La lumière d'excitation émise par la source laser passe par un diaphragme (« *pinhole* ») d'excitation qui réduit la source à un point lumineux. La source laser et la raie utilisée sont sélectionnées en fonction des longueurs d'onde choisies pour l'expérimentation. Le faisceau lumineux passe ensuite par un miroir dichroïque qui réfléchit la lumière d'excitation vers l'échantillon, en la focalisant en un seul plan focal. Les fluorochromes excités émettent à leur tour de la fluorescence, qui atteindra l'objectif *via* un *pinhole* d'émission. Grâce à ce second diaphragme, seule la lumière provenant du plan focal sera envoyée vers le photomultiplicateur ou la caméra CCD du détecteur. L'image de l'échantillon est construite point par point par balayage en X et en Y à l'aide de miroirs galvanométriques. Le déplacement selon l'axe Z est réalisé grâce à une surplatine *piézo*-électrique qui permet d'obtenir une série de coupes optiques empilables (Figure 16). Malgré ces qualités indéniables, l'observation de cellules vivantes en microscopie confocale pose quelques problèmes. En effet, la puissance laser entraîne une photodégradation rapide des fluorophores ainsi que l'apparition de photodommages cellulaires. Pour cette raison, la majorité des spécimens sont fixés et montés sur lame. La manipulation de cellules vivantes en

présence de photosensibilisants toxiques requiert donc la maîtrise de nombreux paramètres (concentration, puissance laser, durée d'incubation, toxicité...). Ces études ont été réalisées sur le microscope confocal Leica sp2 du service d'imagerie cellulaire de l'UMR CNRS 7563 de la Faculté de Médecine de Nancy (Pôle Bioingénierie, Nancy).

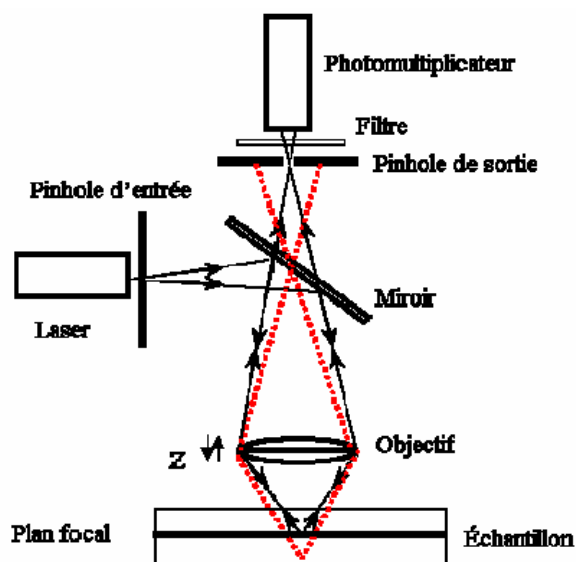


Figure 16 : Principe de la microscopie confocale

2.4.3.4 Spectroscopie de masse

Les porphyrines sont des molécules peu volatiles et de haut poids moléculaire. A ce jour, la méthode la plus satisfaisante pour leur étude en spectrométrie de masse est la technique MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*). Cette méthode douce permet de confirmer la structure et la masse molaire des porphyrines et, éventuellement, de fragmenter ces dernières ou encore d'observer la perte de groupements périphériques.

Brièvement, Le composé à étudier est mélangé avec une molécule en excès servant de matrice. Cette molécule est généralement l'acide α -cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA), mais une large gamme de molécules existe sur le marché, selon les porphyrines que l'on souhaite étudier et les sources lasers disponibles ^[44]. La matrice est ensuite adsorbée sur un support métallique puis

irradiée à l'aide d'un laser pulsé dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption de la matrice créant ainsi le phénomène de désorption/ionisation. Une petite partie de l'énergie créée au niveau du spot laser va être récupérée par le composé à analyser, provoquant son éjection sous forme intacte mais ionisée (Figure 17).

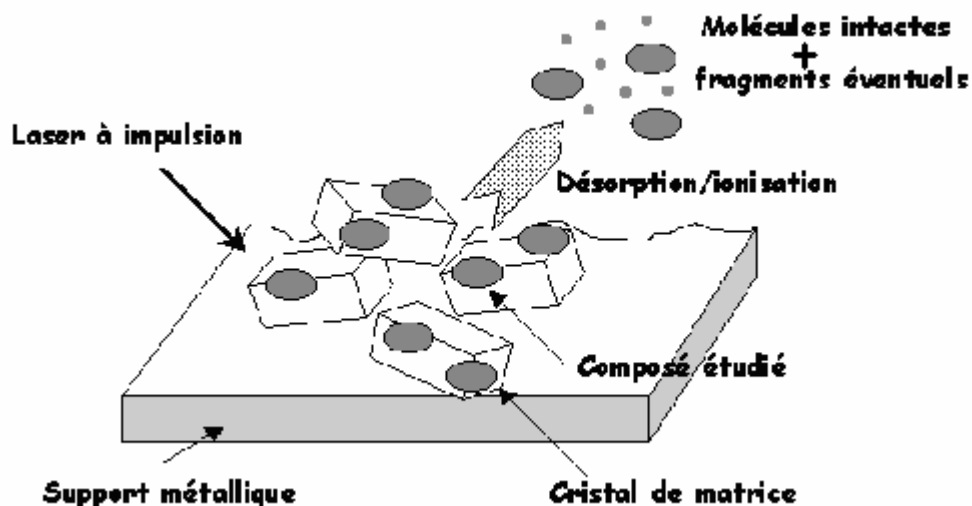


Figure 17 : Principe de la technique MALDI

2.4.3.5 Résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les macrocycles porphyriniques fournissent des spectres de résonance magnétique nucléaire du proton très caractéristiques. Brièvement, le champ magnétique (imposé par l'appareil) crée un courant qui induit un important cône d'anisotropie magnétique dont l'axe est perpendiculaire au plan du macrocycle (Figure 18). La RMN consiste à faire passer le moment magnétique nucléaire du niveau de plus basse énergie à celui de plus haute énergie par absorption d'un rayonnement magnétique. L'application classique de la RMN concerne la détermination de structures moléculaires qui seront décrites avec la stéréochimie exacte. Ainsi, les protons à l'intérieur de ce cône sont dits « blindés », alors que les protons situés à l'extérieur, dans le plan de la molécule, sont fortement « déblindés ». Le spectre RMN est alors étendu sur une large zone de plus de 15 ppm.

Dans le cas de porphyrines *méso*-substituées, les substituants affectent davantage les déplacements chimiques des protons du macrocycle que dans le cas de porphyrines β -substituées. Il y a un blindage des protons périphériques et un déblindage des protons internes dus à une diminution du courant de cycle. Dans le cas des chlorines, on observe une modification de l'allure du spectre. En effet, l'absence d'une double liaison conduit à l'apparition de signaux plus blindés ($\delta < 5$ ppm) correspondant aux protons du noyau pyrrolique réduit.

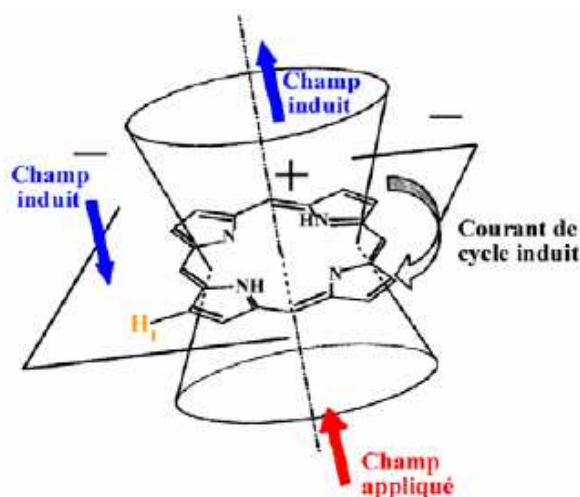


Figure 18 : Cône d'anisotropie magnétique d'une porphyrine

2.5 Méthode de synthèse des porphyrines

On distingue deux grandes catégories de substitutions des porphyrines. Les porphyrines substituées sur les positions β -pyrroliques, qui s'apparentent aux porphyrines naturelles et les porphyrines substituées sur les positions *méso*. Dans ce travail, nous nous sommes exclusivement intéressés aux porphyrines de type *méso*.

2.5.1 Les *méso*-porphyrines

De nombreuses stratégies de synthèse ont été mises au point depuis plus de 70 ans. On peut les classer en quatre grandes catégories.

2.5.1.1 La méthode de Rothmund

En 1935, Rothmund décrit la synthèse de la première porphyrine symétrique substituée en position *méso* ^[45]. Il obtient de la *méso*-

tétraméthylporphyrine en faisant réagir, sous atmosphère inerte, de l'acétaldéhyde et du pyrrole dans le méthanol à diverses températures. Il synthétise ensuite de nombreuses porphyrines portant comme substituants des groupes propyl, butyl et phényle en utilisant les aldéhydes correspondants. Ces synthèses se caractérisent toutes par des rendements très faibles. En 1941, Rothmund obtient un rendement de 5% lors de la synthèse de la *méso*-tétraphénylporphyrine en faisant réagir du pyrrole et du benzaldéhyde dans de la pyridine dans une ampoule scellée chauffée à 220°C (Figure 19) ^[46].

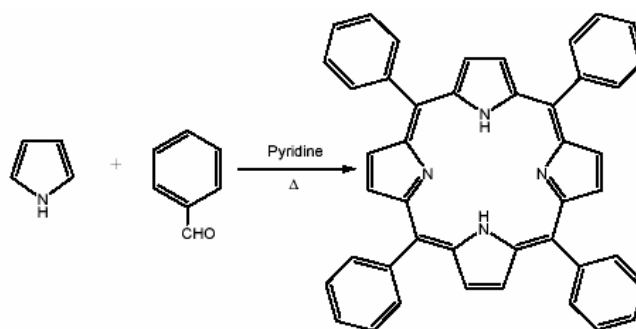


Figure 19 : Méthode de Rothmund appliquée à la synthèse de la *méso*-tétraphénylporphyrine

Ce type de composé présentant un fort intérêt, de nombreuses équipes ont ensuite cherché à en améliorer le rendement de synthèse. Calvin et *coll.* ont obtenu un rendement de 11% en ajoutant de l'acétate de zinc dans le milieu réactionnel utilisé par Rothmund obtenant, par l'occasion, de la *méso*-tétraphénylporphyrine métallée par du zinc ^[47].

Adler et Longo ont mis au point une méthode de condensation d'aldéhyde et de pyrrole en 1967 ^[48]. La méthode consiste à condenser le benzaldéhyde et le pyrrole dans de l'acide propionique porté à reflux. Cette technique permet d'obtenir un rendement de synthèse de la *méso*-tétraphénylporphyrine de l'ordre de 20%, mais également la synthèse de nombreuses autres *méso*-tétraarylporphyrines symétriques.

La possibilité d'utiliser ce type de synthèse pour développer des *méso*-arylporphyrines non symétriques a été décrite par Little en 1975 ^[49]. Cette méthode, dite des « aldéhydes mixtes », est similaire à celle d'Adler et Longo, mais cette fois-ci, deux aldéhydes différents sont condensés avec du pyrrole

dans de l'acide propionique à reflux (Figure 20). En fonction des proportions stœchiométriques utilisées, il est possible d'obtenir des porphyrines substituées par deux, trois ou quatre groupements identiques. L'inconvénient majeur de cette méthode est la présence de nombreuses réactions de polymérisation qui rendent la purification difficile.

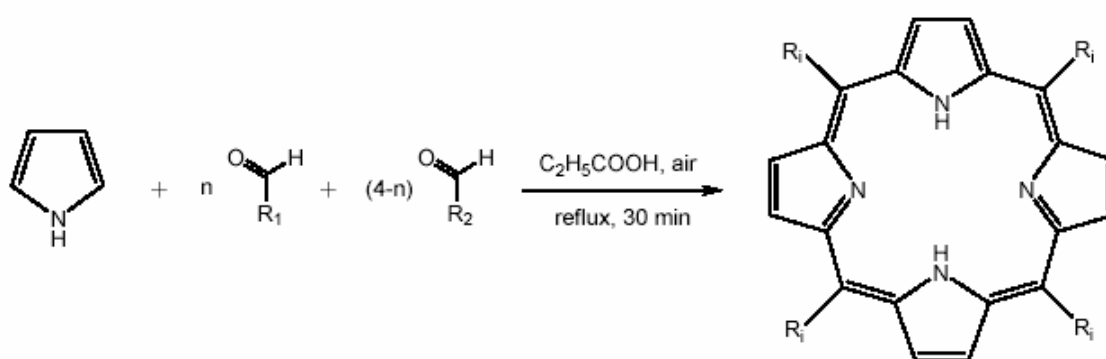


Figure 20 : Méthode dite des aldéhydes mixtes

Finalement, cinquante ans après la description de la première synthèse de *méso*-porphyrine, une méthode de synthèse réellement douce et à température ambiante a été décrite par Rocha-Gonsalvès et Pereira ^[50]. L'année suivante, Lindsey décrit la synthèse d'un grand nombre de *méso*-tétraalkylporphyrines (Figure 21) ^[51].

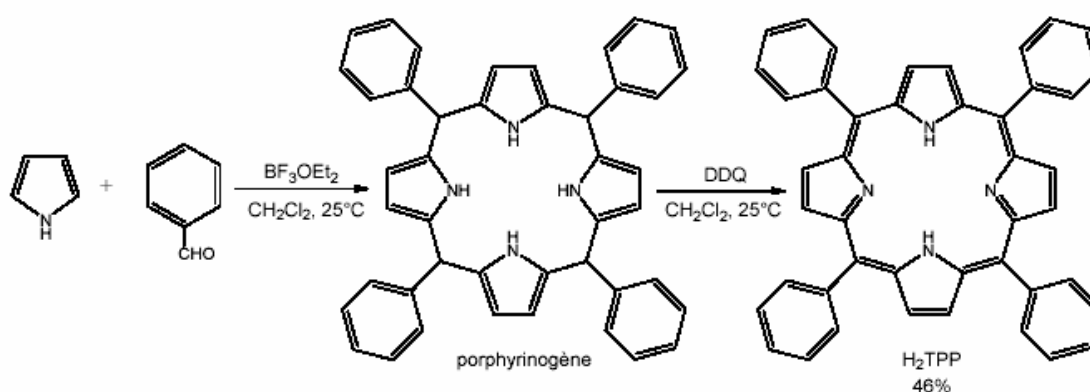


Figure 21 : Méthode de Lindsey

Depuis, la méthode porte son nom. La condensation du pyrrole et de l'aldéhyde est réalisée par catalyse acide (BF_3OEt_2 ou acide trifluoroacétique) sous atmosphère inerte. La molécule ainsi obtenue est le porphyrinogène, un

cycle tétrapyrrolique non conjugué. La conversion en porphyrine est réalisée dans un second temps, à l'aide d'un oxydant tel que le *p*-chloranil ou le DDQ (2,3-dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone). Le rendement de la réaction est significativement amélioré et atteint 46% pour la *méso*-tétraphénylporphyrine. Bien que compliquées à maîtriser, les conditions douces de cette réaction permettent l'utilisation d'aldéhydes peu stables. Cette méthode a également été adaptée pour la synthèse de porphyrines asymétriques ^[52].

2.5.1.2 La synthèse « 2+2 »

Cette approche, développée par Fisher en 1940 ^[53] consiste à condenser des unités dipyrrométhanés pendant plusieurs heures dans de l'acide succinique (Figure 22).

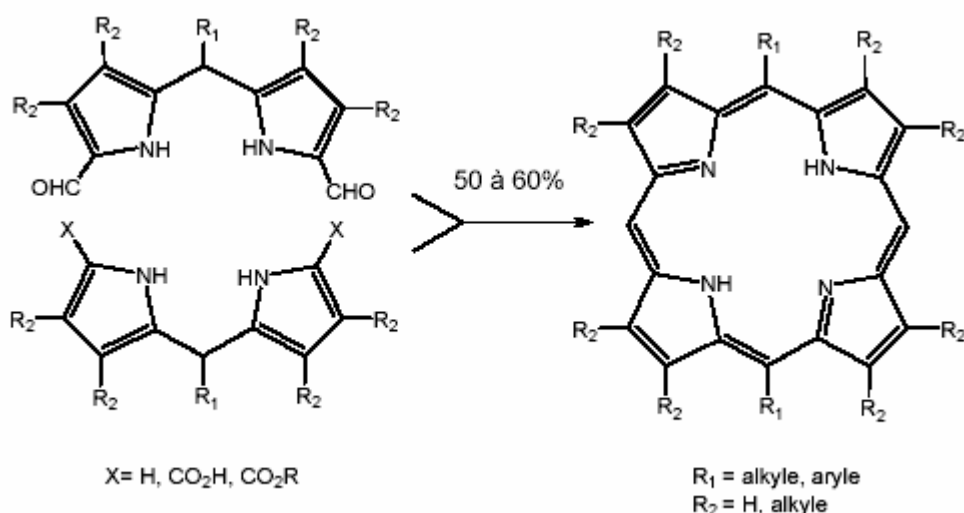


Figure 22 : Synthèse 2 + 2

Woodward et MacDonald, dans les années 60 ^[54, 55], ont condensé du 5,5'-diformyldipyrrométhane avec des dipyrrométhanés 5,5' non substitués et ont obtenu une seule porphyrine, avec un rendement de l'ordre de 50%. Il est intéressant de remarquer que cette méthode mène à la formation d'un intermédiaire porphyrinogène qui doit être ensuite réduit à l'aide d'une quinone. Cette stratégie a ensuite été très étudiée et améliorée par Lindsey ^[56] afin d'éviter les problèmes d'isomérisation tout en conservant de bons rendements. Dans nos travaux, nous avons utilisé la méthode décrite par Little en 1975 ^[49].

Brièvement, nous avons condensé 4 équivalents de pyrrole avec 3 équivalents de benzaldéhyde et 1 équivalent de carboxybenzaldéhyde dans l'acide propionique.

2.5.1.3 L'arylation de la porphine

Très récemment, Shi et Wheelhouse ont obtenu, avec des rendements allant jusqu'à 70%, une série de tétraarylporphyrines symétriques par *méso*-arylation de la porphine commerciale (Figure 23) [57]. Cette méthode, permettant de limiter l'utilisation d'aldéhydes coûteux, reste difficilement applicable à la synthèse de porphyrines asymétriques, car elle engendre la formation d'un mélange de porphyrines.

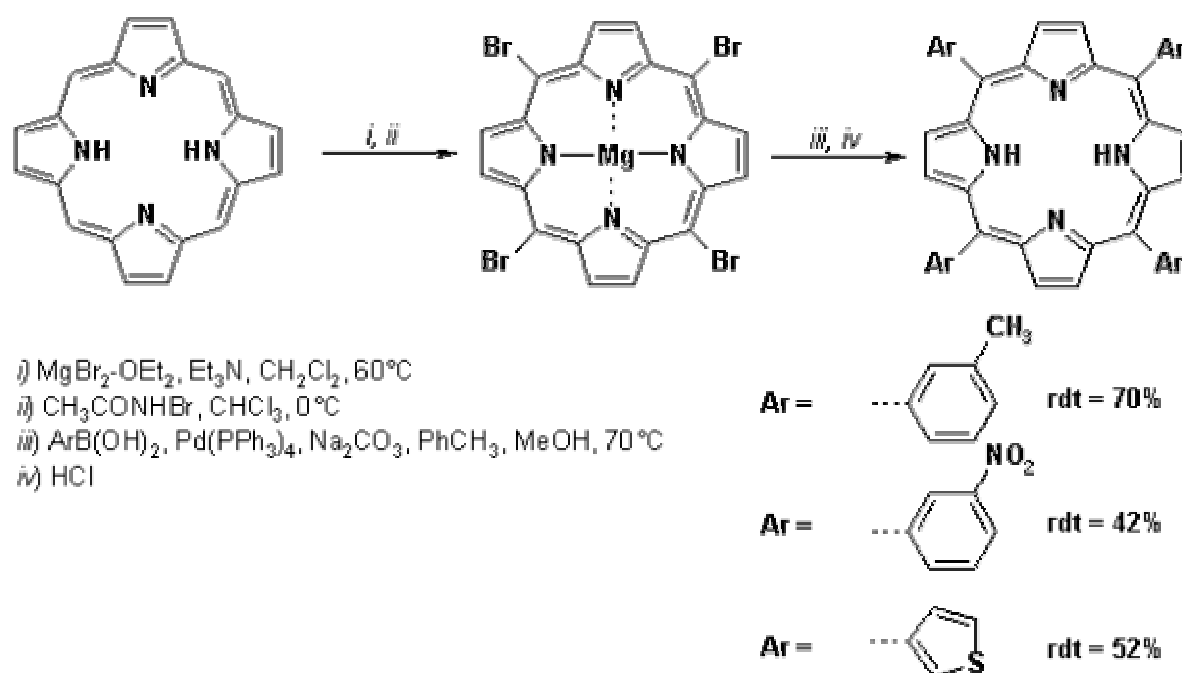


Figure 23 : Arylation de la porphine

2.5.1.4 La synthèse sur support solide

2.5.1.4.1 Historique

La chimie de base de la synthèse peptidique décrite par Emil Fisher au 19^{ème} siècle fournit les méthodes pour l'activation des groupes carboxyliques et pour la conjugaison et l'élimination des groupes protecteurs qui empêchent les réactions secondaires indésirables. En 1963, Bruce Merrifield révolutionne la synthèse peptidique en développant une technique de synthèse sur support solide pour laquelle il reçoit le prix Nobel en 1984 [58]. Cette technique,

automatisable, est à l'origine de la renaissance de la chimie des peptides. Les réalisations les plus spectaculaires de la technique de Merrifield ont été la synthèse des chaînes A et B de l'insuline et celle de la ribonucléase pancréatique. Depuis, de nombreuses améliorations ont réduit le temps de synthèse et augmenté, de manière significative, les rendements.

2.5.1.4.2 Principe général

Nous allons dresser un bref résumé des réactions nécessaires à la synthèse d'un peptide de n'importe quelle longueur (Figure 24). I :

- Bloquer les groupements amino-terminaux de l'acide aminé A et de l'acide aminé B avec, par exemple, un groupement t-butyloxycarbonyl (t-Boc) ou N-(9-fluorényl)méthoxycarbonyl (Fmoc). Cela conduit à la formation de t-Fmoc-A et t-Fmoc-B.
- Activer le groupement carboxylique de t-Fmoc-B au moyen du dicyclohexyl carbodiimide (DCC).
- Faire réagir le groupement carboxylique de l'acide aminé A avec une résine de polystyrène préalablement activée.
- Enlever le groupement protecteur de t-Fmoc-A par l'acide trifluoroacétique (TFA) à température ambiante.
- Condenser le groupement carboxylique activé de t-Fmoc-B avec le groupe amino libre de A déprotégé.
- Enlever le groupement protecteur Fmoc de B avec le TFA.
- Libérer le dipeptide A-B formé de la résine en le traitant, par exemple, par l'acide fluorhydrique (HF) dans le dichlorométhane.

Bien entendu, pour notre étude, ce protocole général a été modifié par notre équipe, afin de l'appliquer aux conditions particulières de synthèse sur support solide impliquant des photosensibilisants. Cela sera décrit en détails dans la troisième partie de ce travail.

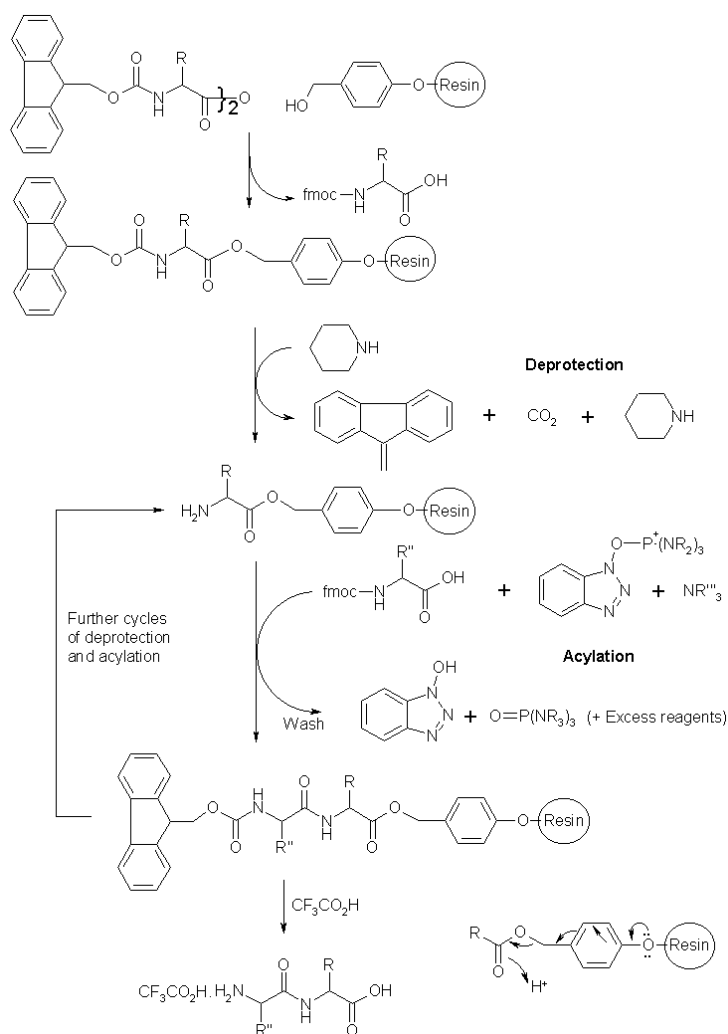


Figure 24 : Synthèse peptidique sur support solide

Remarques : Il existe de nombreux types de résines et de groupements protecteurs dans le commerce, permettant d'utiliser différentes conditions de synthèse. De plus, certaines étapes, telles que la fixation de l'acide aminé à la résine peuvent être omises du fait de l'existence de résines commerciales pré-greffées. Il faut ajouter à cette description que plusieurs cycles de lavages sont effectués entre chaque étape.

2.5.1.4.3 Avantages de la synthèse sur support solide

La synthèse sur support solide présente de nombreux avantages et inconvénients (coût plus élevé, utilisation de tests colorimétriques), tout comme la synthèse en solution. Cependant la synthèse sur support solide présente beaucoup d'avantages :

- Les traitements compliqués de purification en solution sont remplacés par de simples lavages en phase supportée.
- La réaction peut être complète grâce à l'utilisation d'un excès de réactifs. Elle peut également être accélérée dans certains cas.
- Les procédures sont facilement automatisables.

On peut malgré tout citer quatre avantages de la synthèse en solution :

- Elle ne requiert pas d'étape de greffage et de clivage de support supplémentaire.
- Il est inutile de s'intéresser à la stabilité de la liaison d'ancrage.
- Les conditions de synthèse utilisées sont classiques et ne nécessitent pas d'adaptation.
- Le passage à des quantités plus importantes est plus aisément réalisable.

Il est possible de combiner synthèse sur support solide et synthèse en solution dans une séquence réactionnelle.

2.5.1.4.4 Synthèse de porphyrine sur support solide

Afin de limiter les étapes de purification, Svirskaya et Leznoff ont décrit la synthèse de la 5-hydroxyphényl-10,15,20-tritolylporphyrine sur support solide [59]. Après fixation de l'hydroxybenzaldéhyde sur une résine polystyrène, le support est mis en contact avec du pyrrole et le *para*-benzaldéhyde dans l'acide propionique à reflux. Bien que les étapes de purification s'en trouvent simplifiées, cette méthode donne de très faibles rendements (5% maximum). Récemment, la synthèse de porphyrines asymétriques *via* la synthèse de MacDonald a été adaptée à la synthèse sur support solide, sans obtenir de meilleurs rendements [60].

2.5.2 Les porphyrines β -substituées

Ce type de porphyrine n'a pas été utilisé dans cette étude, donc seul un bref descriptif des principales méthodes de synthèse sera exposé.

2.5.2.1 La condensation d'unités monopyrroliques

Cette voie est surtout utilisée lorsque les substituants des positions β sont identiques. Classiquement, il s'agit de réaliser la tétramérisation de pyrroles en présence de composés assurant la formation de ponts méthines (figure 25).

Treibs et Haberle ont décrit la synthèse de l'octaméthylporphyrine en utilisant cette méthode ^[61]. Il est actuellement possible de synthétiser des porphyrines symétriques isomériquement pures possédant deux types de substituants différents ^[62].

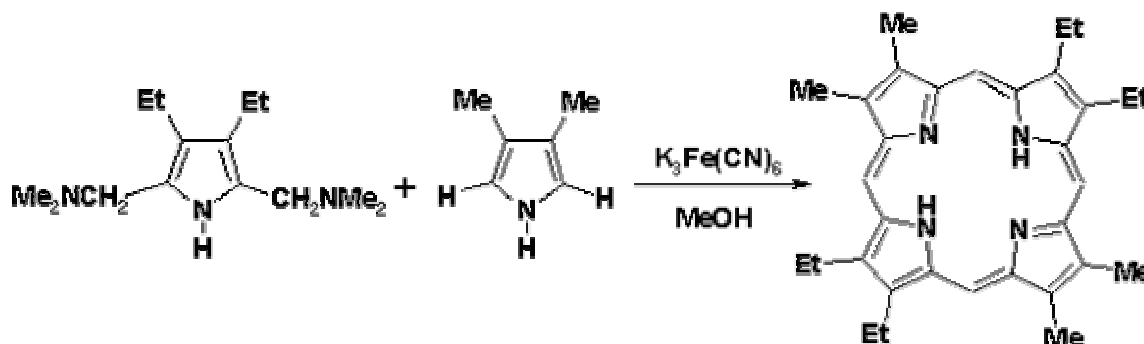


Figure 25 : Synthèse de la tétraéthyl-tétraméthylporphyrine

2.5.2.2 La synthèse « 2+2 »

Fisher a décrit la synthèse de nombreuses porphyrines β -substituées à partir de dipyrrométhènes bromés ^[63]. Cette technique est délaissée depuis 1960, date de la description de la technique 2+2 par MacDonald et Woodward.

2.5.2.3 La synthèse « 3+1 »

Un tripyrrane, non substitué au niveau des positions 1 et 14, est condensé avec un 2,5-diformylpyrrole. Cette méthode permet d'obtenir des porphyrines β -substituées monofonctionnalisées ou difonctionnalisées sur le même pyrrole (Figure 26) ^[64].

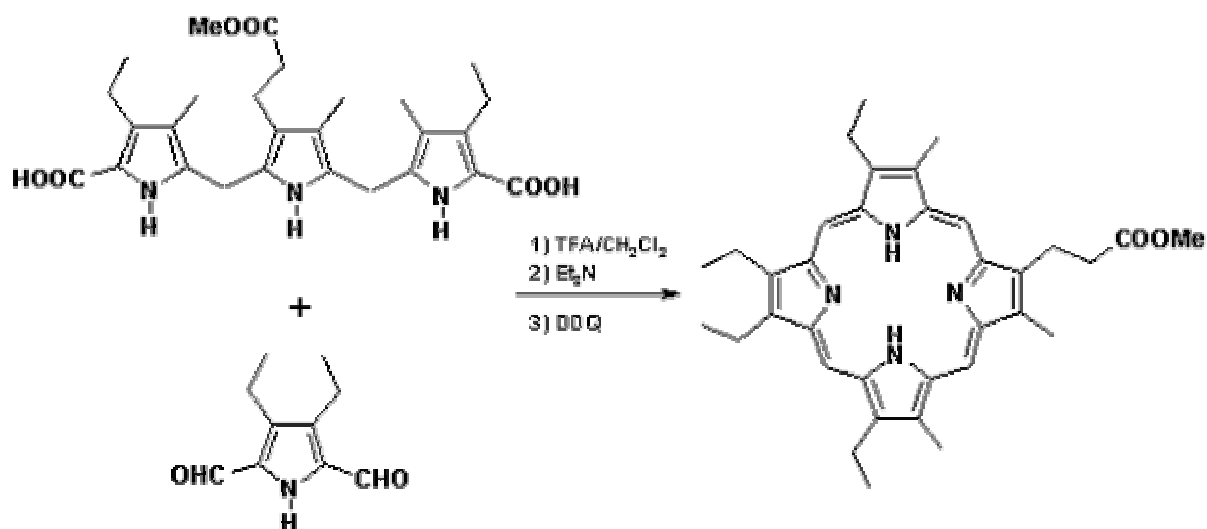


Figure 26 : Exemple de synthèse par la méthode 3 + 1

2.6 Méthode de synthèse des chlorines

Les chlorines représentent une avancée importante en ce qui concerne l'amélioration des propriétés photophysiques des macrocycles tétrapyrroliques. En effet, la recherche d'un photosensibilisant idéal passe par l'amélioration de l'absorption dans le rouge. Une méthode simple consiste à hydrogéner une des doubles liaisons d'une porphyrine, ce qui entraîne un fort effet hyperchrome au niveau de la bande Q_I .

En 1940, Fisher et Eckoldt ont décrit la réduction d'octa-alkylporphyrines par le tétraoxyde d'osmium (OsO_4), formant ainsi la chlorine correspondante [65]. Whitlock a mis au point une technique utilisant le *para*-toluènesulfonylhydrazine [66]. La porphyrine est, dans un premier temps, oxydée en bactériochlorine à l'aide de *para*-toluènesulfonylhydrazine, puis une double liaison est régénérée à l'aide de chloranil (Figure 27).

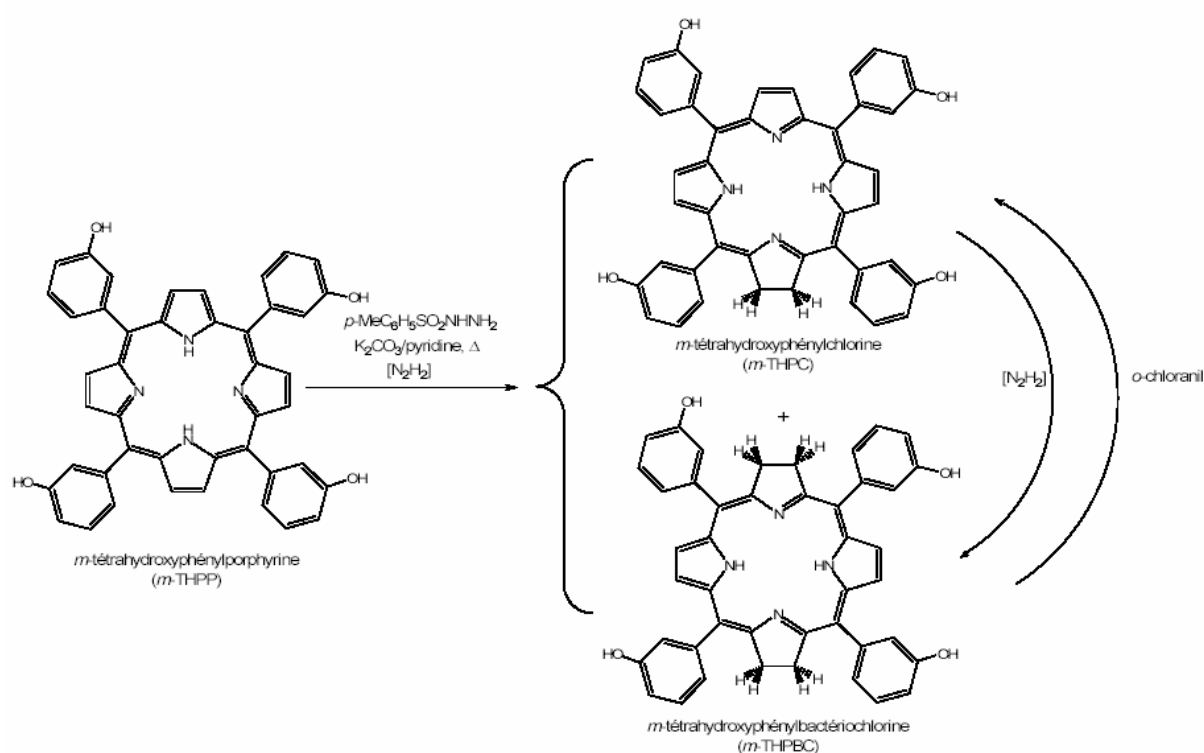


Figure 27 : Un exemple de synthèse de chlorine : Synthèse de la *méso*-tétrahydroxyphénylchlorine (*m*-THPC)

2.7 Les photosensibilisants de 1^{ère} génération

Bien que la PDT ne soit pas une thérapeutique récente, la recherche de nouveaux photosensibilisants est très active, car en France seuls deux composés ont actuellement l'AMM. Ces composés sont le Photofrin[®], un photosensibilisant complexe de 1^{ère} génération, et le Foscan[®], un photosensibilisant de 2^{ème} génération.

Le photofrin[®] est la version purifiée et enrichie en oligomères de l'hématoporphyrine dérivée (Figure 28). L'hématoporphyrine dérivée (HpD) est un mélange complexe de monomères et d'oligomères liés par des ponts éther, ester ou carbone-carbone d'hématoporphyrine, de monohydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine et de protoporphyrine [67]. Son obtention se fait par acétylation du dihydrochlorhydrate d'hématoporphyrine avec un mélange acide sulfurique 5% / acide acétique, suivi d'une neutralisation en milieu alcalin [68].

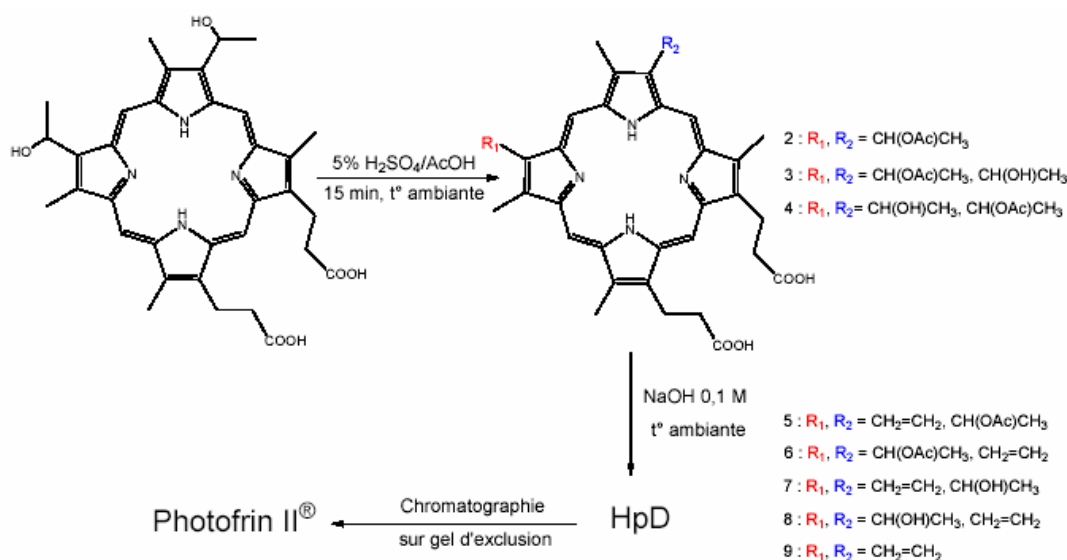


Figure 28 : Méthode de synthèse du Photofrin II[®]

Les oligomères ont été identifiés comme étant les seuls à avoir une activité antitumorale significative (Figure 29) [69].

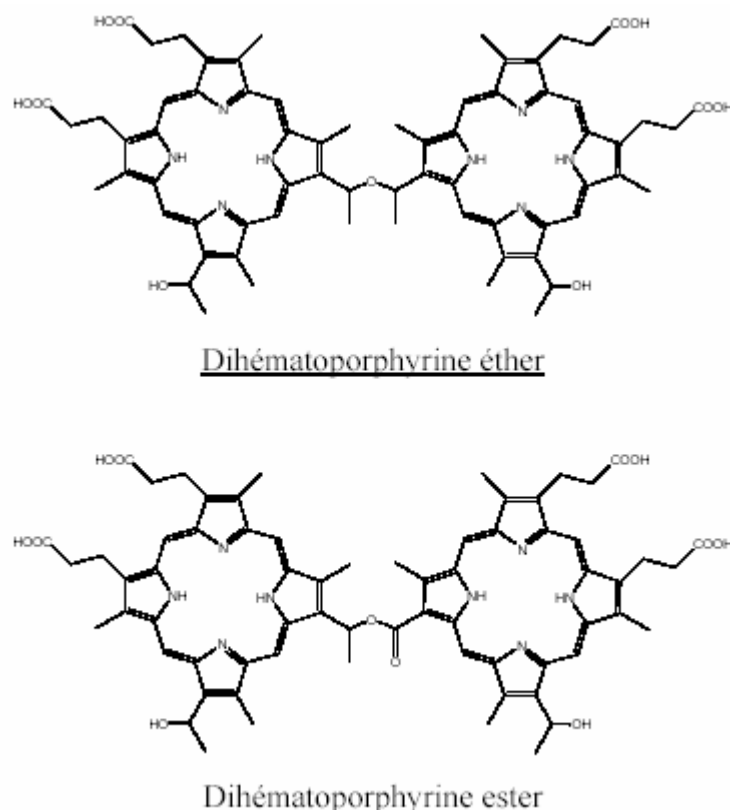


Figure 29 : Les deux oligomères actifs de la fraction purifiée de l'HpD

Ce produit est disponible pour les études cliniques ^[70]. C'est le premier photosensibilisant ayant obtenu l'AMM (en 1993 au Japon, 1996 aux USA et en Europe). Bien qu'efficace, la photofrin[®] présente certaines limites et effets indésirables :

- C'est un composé complexe, mal défini. La variabilité des lots rend les études pharmaceutiques ainsi que les traitements ardu.
- La bande Q_I possède un maximum à 630 nm et son coefficient d'extinction molaire est médiocre.
- L'accumulation préférentielle du photofrin[®] dans l'épiderme et sa lente élimination de l'organisme sont à l'origine d'une forte photosensibilité cutanée. Le port de vêtements de protection et de lunettes de soleil est conseillé durant au moins deux mois après le traitement.

Ces limites ont amené les chercheurs à synthétiser de nouvelles molécules, dites de 2^{ème} génération, et dénuées de ces inconvénients.

2.8 Les photosensibilisants de 2^{ème} génération

Les composés de 2^{ème} génération ont été développés de manière à se rapprocher le plus possible du photosensibilisant idéal. Ce sont des composés chimiquement purs et activés par des longueurs d'onde entre 600 et 800 nm, la fenêtre de transparence optique des tissus et de la peau en particulier [71]. Rappelons que cette propriété permet une augmentation de la profondeur de pénétration de la lumière dans le tissu. Ils sont faiblement toxiques en absence de lumière et sont rapidement éliminés des tissus sains, limitant ainsi la période de photosensibilisation cutanée.

2.8.1 Les porphyrines

Parmi les porphyrines de 2^{ème} génération, deux composés ont été particulièrement étudiés : la *mé*ta-tétra-(hydroxyphényl)porphyrine (Figure 30), ou *m*-THPP et la *para*-tétra-(sulfonatophényl)porphyrine ou *p*-TPPS4.

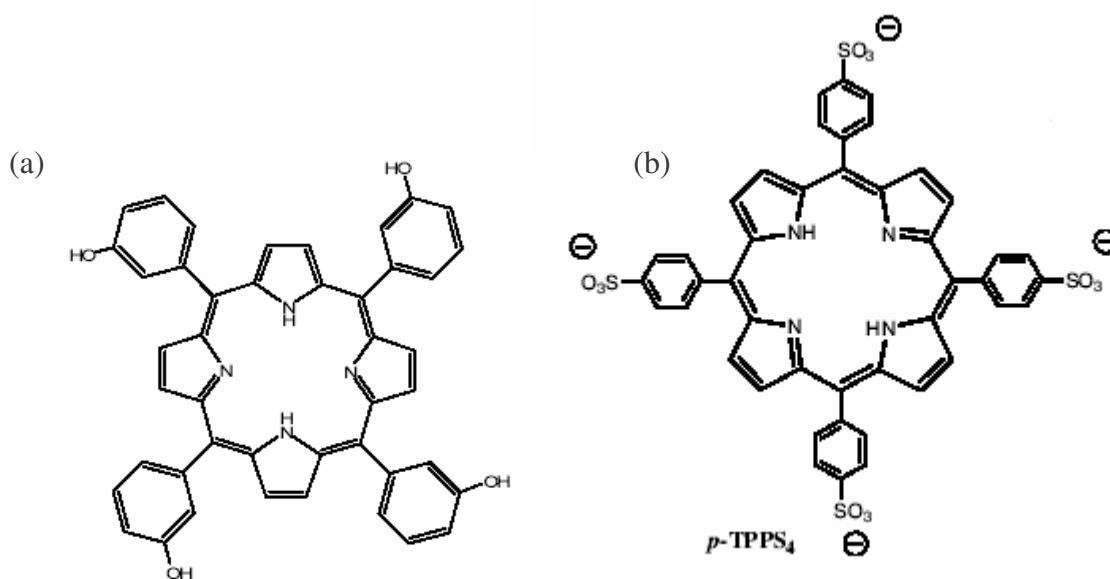


Figure 30 : Structures de la *m*-THPP (a) et de la *p*-TPPS4 (b)

Les groupements latéraux greffés aux porphyrines les rendent plus solubles en milieu aqueux et augmentent leur capacité à absorber dans le rouge. L'isomère *mé*ta de la tétra-hydroxyphénylporphyrine est décrit comme plus actif, *in vitro*, que les isomères *ortho* et *para* [72].

2.8.2 Les chlorines et les bactériochlorines

Ces composés sont issus, respectivement, de la simple ou de la double réduction de liaison(s) présente(s) sur le noyau tétrapyrrolique des porphyrines correspondantes. Les chlorines font partie des photosensibilisants les plus actifs. Les plus connues sont la *méso*-tétra(hydroxyphényl)chlorine, appelée *m*-THPC ou Foscan[®] et la chlorine e6 et ses dérivés.

2.8.2.1 La *m*-THPC

Egalement appelée témoporphyne, elle a été développée par la société Scotia Pharmaceuticals sous le nom de Foscan[®] car cet isomère a été identifié comme étant le plus actif des trois tétrahydroxyphénylchlorines possibles (Figure 31) [73].

La *m*-THPC fait l'objet d'essais cliniques pour le traitement des tumeurs des voies aérodigestives supérieures, de l'œsophage, des bronches et de l'estomac. Grâce à sa forte absorption à 650 nm, sa grande pureté et un rendement de formation en oxygène singulet élevé, cette molécule est utilisée à de très faibles doses (de drogue et de lumière). Bien que le phénomène de photosensibilisation cutanée soit restreint par l'utilisation de faibles doses, l'utilisation du Foscan[®] entraîne généralement l'apparition d'un tissu nécrotique important et douloureux au niveau de la zone traitée.

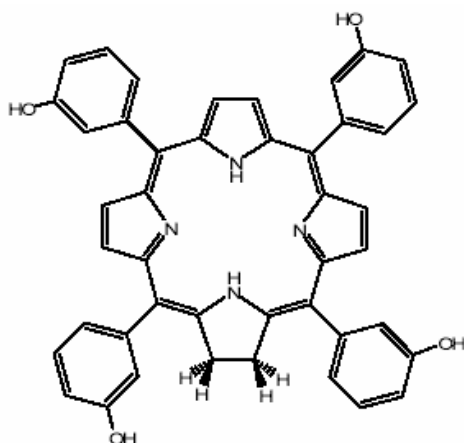


Figure 31 : Structure de la *m*-THPC

2.8.2.2 La chlorine e6

La chlorine e6, ou phytochlorine, est un dérivé hydrophile de la chlorophylle a (Figure 32). L'hydrophilie de la molécule varie en fonction du pH du fait de la présence de groupements carboxyliques.

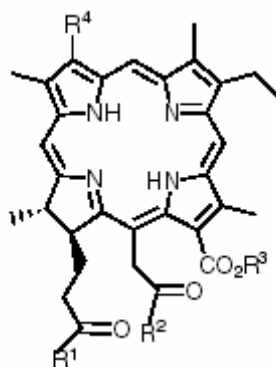


Figure 32 : Structure de la chlorine e6

La pureté de la molécule, son rendement quantique de formation en oxygène singulet élevé (de l'ordre de 0,8) et sa forte absorption à 660 nm en font un photosensibilisant relativement efficace. Ainsi, la chlorine e6 a été conjuguée à de nombreux composés. La Npe6 ou MACE ou encore mono-L-aspartylchlorine e6 est une des chlorines dérivées de la chlorine e6 (Figure 33).

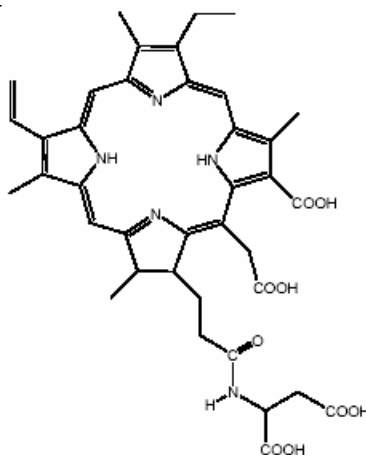


Figure 33 : Structure de la mono-L-aspartylchlorine e6

Cette chlorine possède une sélectivité variable pour les tumeurs, en fonction des concentrations utilisées ^[74]. Ce composé est éliminé rapidement des tissus et est testé afin de détruire la néovascularisation, par exemple au niveau de la rétine.

2.8.3 L'acide 5-amino-lévulinique (5-ALA)

Ce composé, commercialisé sous le nom de Levulan[®] par la société DUSA Pharmaceuticals, n'est pas un photosensibilisant proprement dit, mais est en fait un précurseur dans la biosynthèse de l'hème (Figure 34) [75].

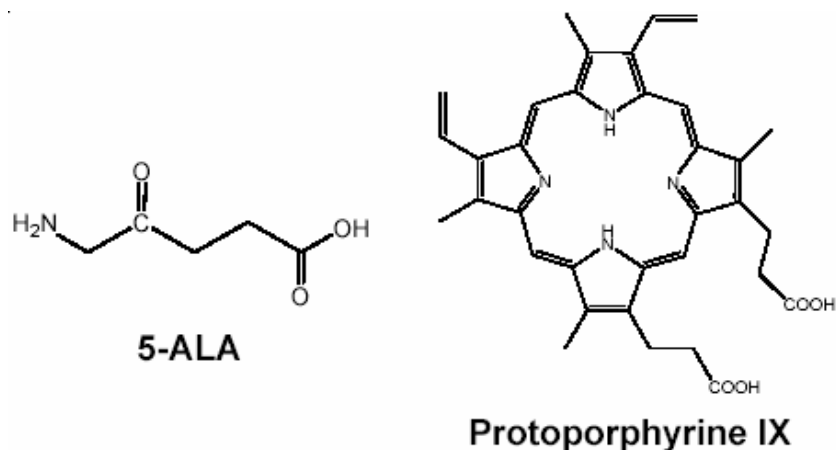


Figure 34 : Structures de l'acide 5-amino-lévulinique et de la protoporphyrine IX

Lors de cette synthèse, le taux de Protoporphyrine IX (PpIX) est régulé afin d'éviter les problèmes d'autophotosensibilisation. L'étape limitante est la synthèse du 5-ALA à partir du succinyl-CoA et de la glycine. Il existe un système de rétro-contrôle qui limite la formation du 5-ALA (Figure 35).

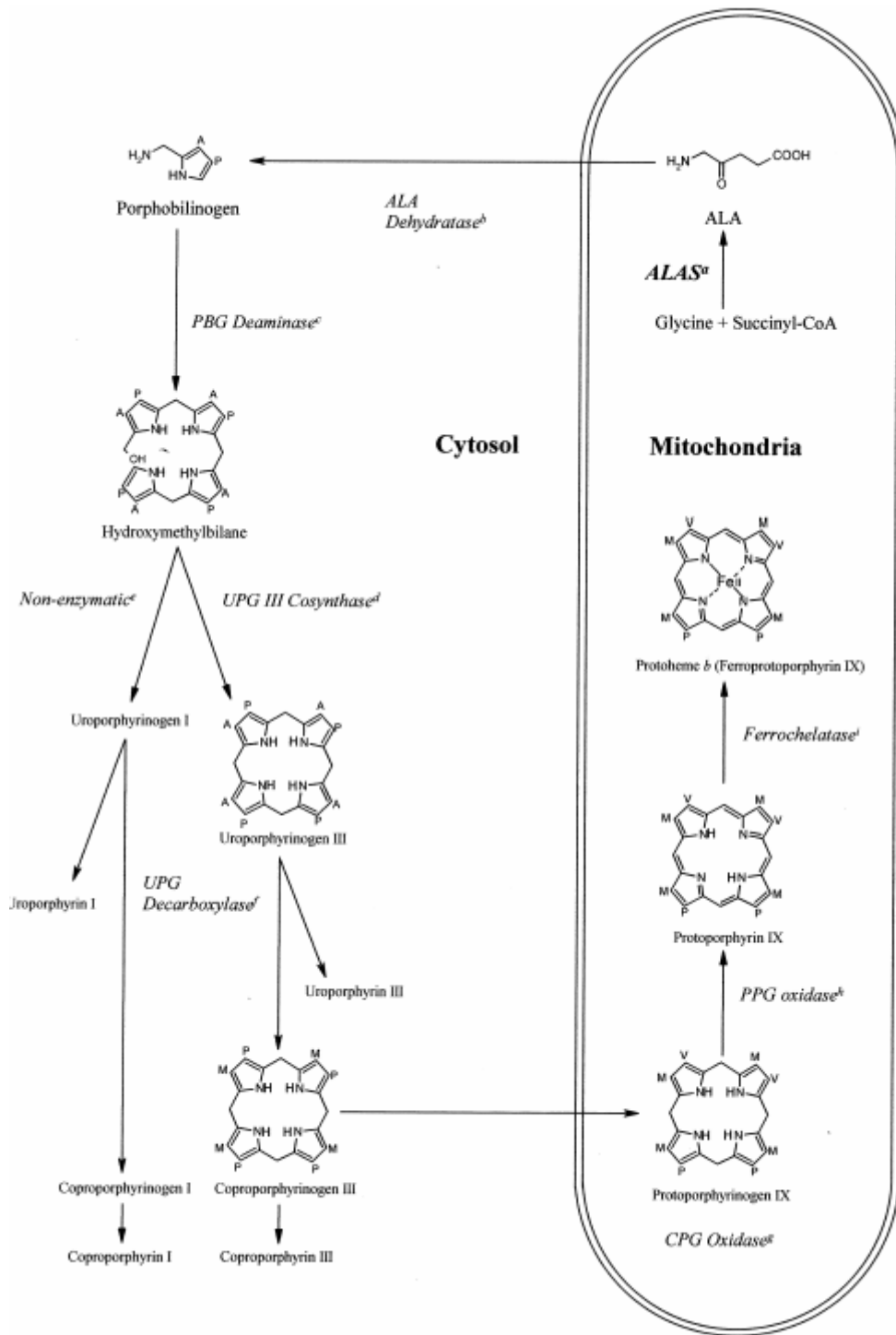


Figure 35 : Schéma de biosynthèse de l'hème

Ainsi, si l'on introduit des quantités importantes de 5-ALA exogène par voie topique dans les cellules tumorales, on observe la rapide transformation de ce dernier en PpIX. L'administration de 5-ALA par voie intraveineuse est aussi possible et n'entraîne qu'une photosensibilisation cutanée de 24 heures, l'excédent de PpIX étant métabolisé rapidement en hème et en bilirubine. Le

Metvix[®] ou méthyl ester de l'ALA présente une meilleure sélectivité tumorale et diffuse moins dans les tissus sains. Il est commercialisé par la société PhotoCure et son efficacité contre les carcinomes basocellulaires est actuellement testée [76].

2.8.4 Les dérivés de la benzoporphyrine (BPD-MA)

Le dérivé monoacide de la benzoporphyrine a été développé par QLT et commercialisé sous le nom de Visudyne[®] (Figure 36). En 1990, Richter décrit la synthèse de dérivés de la benzoporphyrine (BPD) à partir de la PpIX [77]. De tous les composés étudiés, le dérivé monoacide (BPD-MA) montre la plus forte phototoxicité. Cette chlorine relativement hydrophobe présente une forte bande d'absorption à 690 nm et possède un bon rendement de formation d'état triplet. Elle s'accumule rapidement dans les tissus tumoraux, ce qui permet d'irradier environ 30 minutes après injection. Elle est également rapidement éliminée par voie hépatique et la photosensibilisation de la peau dure généralement moins d'une semaine.

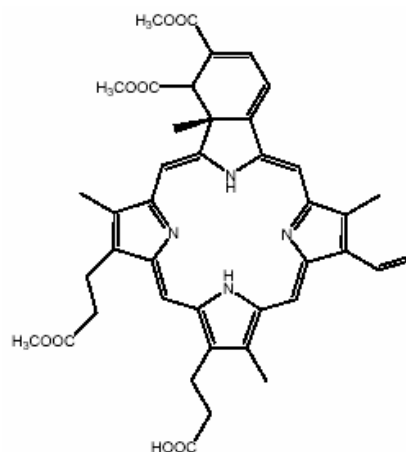


Figure 36 : Structure du dérivé monoacide de la benzoporphyrine

Ce composé est essentiellement utilisé dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Cette maladie de la rétine, qui peut mener à la cécité, atteint principalement les personnes âgées [78]. La DMLA est caractérisée par la prolifération de vaisseaux sanguins anormaux sous la rétine, ce qui entraîne l'apparition d'une tache centrale dans le champ visuel. L'administration intraveineuse de la visudyne[®] suivi d'un traitement laser permet de détruire sélectivement les cellules endothéliales des néocapillaires. En général, plus aucune croissance des néovaisseaux n'est constatée après cinq ou six traitements.

2.8.5 Les phtalocyanines et les naphthalocyanines

Les phtalocyanines (Pcs) sont des porphyrines de synthèse (tétrabenz[5,10,15,20] tétraazaporphyrines), qui n'existent que sous forme de traces à l'état naturel. Il s'agit de macrocycles aromatiques plans de 18 électrons π comprenant 4 groupements indoles liés en position 1-3 par des ponts azones : macrocycle tétraazaisoindole. La remarquable délocalisation bidimensionnelle des électrons π sur ces macrocycles conduit à une augmentation drastique de l'absorption de ces composés à des longueurs d'onde oscillant entre 700 et 800 nm ^[79].

Elles sont très peu toxiques à l'obscurité, présentent une forte sélectivité tumorale et des propriétés photocytotoxiques intéressantes. Elles peuvent être chélatées par de nombreux ions métalliques comme l'aluminium et le zinc qui augmentent leur photocytotoxicité ^[80, 81]. La phtalocyanine chloroaluminium sulfonée (Figure 37) est un des rares photosensibilisants à être très soluble dans l'eau. Ce composé conduit à des dommages vasculaires importants au niveau de la tumeur *in vivo* ^[82].

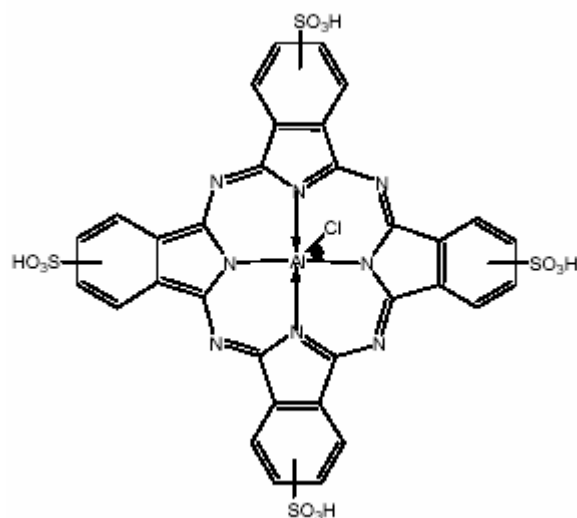


Figure 37 : Un exemple de phtalocyanine : la phtalocyanine chloroaluminium tétrasulfonée

2.8.6 La texaphyrine de luténium

Le Lutrin[®] est également très soluble dans l'eau. La texaphyrine de luténium (Figure 38) possède une très forte spécificité vis-à-vis des tissus tumoraux ainsi qu'une large bande d'absorption centrée à 732 nm.

Ce photosensibilisant, élaboré à l'Université du Texas ^[83], est actuellement en phase II d'essai clinique pour le traitement du cancer du sein et des mélanomes. Il ressemble à une porphyrine dont un des pyrroles a été substitué par un noyau phényle.

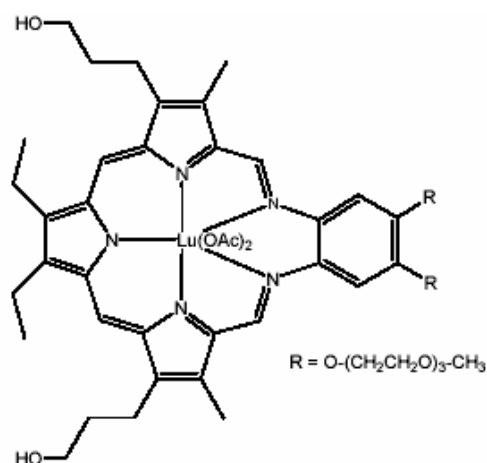


Figure 38 : La texaphyrine de luthénium

2.8.7 Les purpurines

Bien que les purpurines soient connues depuis les années 40 comme des produits de dégradation de la chlorophylle, la synthèse de purpurine n'a été décrite pour la première fois qu'en 1960. Les travaux de Morgan et Metel ont ensuite mené à l'étude de l'étiopurpurine d'étain, dont le nom commercial est Purlytin[®] (Figure 39) ^[84].

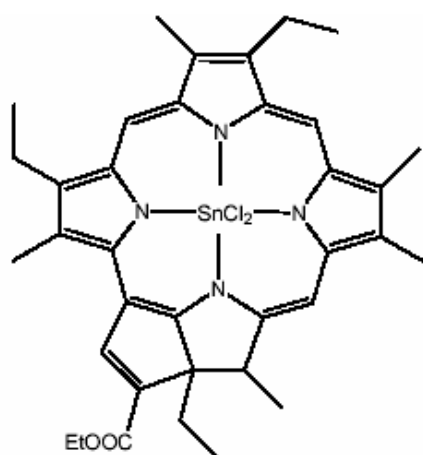


Figure 39 : Structure de l'étiopurpurine d'étain

Sa longueur d'onde d'absorption est proche de 650 nm et il est évalué pour la photothérapie de la néovascularisation cornéenne. Bien qu'induisant une

photosensibilisation cutanée assez longue, ce composé se localise au niveau mitochondrial et provoque une réponse intéressante car majoritairement apoptotique ^[85].

2.9 Les photosensibilisants de 3^{ème} génération

Bien qu'arborant d'indéniables qualités, les photosensibilisants cités précédemment ne manifestent pas de réelle sélectivité tumorale. Pour pallier ce problème, ces composés sont véhiculés dans, par exemple, des liposomes afin de les vectoriser vers leurs cibles ^[86]. L'adressage moléculaire est une autre méthode dans laquelle des composés cytotoxiques sont greffés à des acides aminés, des protéines, des polymères, des sucres ou encore des anticorps.

Cette dernière stratégie consiste à réaliser un ciblage tumoral direct afin d'agir le plus efficacement possible au niveau tumoral et de diminuer les doses de photosensibilisant à injecter en ciblant directement les tissus visés ^[87]. Bien que les anticorps aient été largement utilisés dans un premier temps, le nombre d'altérations cellulaires découvertes ces dernières années permet d'envisager de nouvelles cibles. Outre l'augmentation du taux d'incorporation par les tissus visés, les sites de localisation intracellulaire sont également cruciaux et dépendent du vecteur utilisé.

La vectorisation, ou adressage, permet d'augmenter le taux d'incorporation dans les tissus visés et également de diminuer les effets secondaires dus à l'incorporation des photosensibilisants de première et deuxième génération dans les tissus sains, dont la peau. Outre les facilités de synthèse, de purification et une bonne stabilité des interactions photosensibilisant/ligand, cette démarche permet une forte incorporation intracellulaire des photosensibilisants ainsi qu'un ciblage des organites intracellulaires ^[88]. Dans la suite de ce chapitre, nous allons énumérer quelques stratégies développées en PDT, avant de nous intéresser plus particulièrement à celles mises en place au sein de notre équipe.

Les protéines sériques sont majoritairement responsables du transport des photosensibilisants injectés ^[89, 90, 91, 92]. Les composés les plus hydrophiles s'associent à l'albumine alors que les composés plus hydrophobes ont tendance à

s'associer aux LDL (*Low Density Lipoprotein*). Ces protéines se fixant à des récepteurs, elles peuvent permettre une augmentation du taux intracellulaire du photosensibilisant.

Grâce à sa structure flexible, l'albumine peut fixer de manière covalente, ou non, de nombreux composés endogènes ou exogènes avec une forte affinité [93]. Les premières études ont été menées sur la ZnPc couplée de manière non covalente à l'albumine, ce qui entraînait une redistribution vers les HDL [94]. Pour limiter ce phénomène, de nombreux photosensibilisants ont été couplés de manière covalente à l'albumine. Mise à part pour la chlorine e6 [95], les résultats étaient moins bons pour les composés liés à l'albumine en comparaison avec la molécule libre [96].

De toutes les lipoprotéines, les LDL sont connues pour jouer un rôle très important dans le transport de médicaments vers les cellules tumorales et endothéliales en raison d'une sur-expression des récepteurs aux LDL. C'est donc un vecteur idéal pour les photosensibilisants les plus hydrophobes, comme la ZnPc [97], mais également pour des molécules amphiphiles (Hpd). Les résultats obtenus dépendent fortement de l'impact de la liaison du photosensibilisant sur la structure des LDL et donc de leur reconnaissance par les récepteurs aux LDL. De part ce fait, les photosensibilisants couplés par liaisons non covalentes ont montré une plus grande efficacité photodynamique. L'activité photodynamique des composés dépend également fortement de leur taux d'incorporation dans les LDL. Celui-ci peut-être considérablement augmenté par la présence de longues chaînes lipidiques [98]. Autre avantage des LDL : elles favorisent le ciblage intracellulaire des lysosomes [99].

La transferrine est la protéine qui assure la majorité du transport du fer dans l'organisme et les cellules se divisant rapidement sur-expriment les récepteurs de la transferrine et ce taux peut être corrélé à l'agressivité tumorale [100]. L'Hpd et la chlorine e6 ont été liées de manière covalente à la transferrine tout en conservant les propriétés structurales essentielles à la reconnaissance de cette dernière par son récepteur [96], en donnant des résultats concluants.

Les stéroïdes sont également des ligands intéressants pour leur rôle vital dans les cellules à prolifération rapide. Des photosensibilisants couplés à des dérivés de cholestérol ont ainsi été synthétisés afin de maximiser leurs interactions avec les LDL ^[101, 102]. De plus, les caractéristiques physicochimiques de ces composés, comme leur bon rendement de formation d'oxygène singulet et leur amphiphilie, permettant une forte incorporation intracellulaire, en font de bons candidats pour la PDT. A cela, on peut rajouter la fixation de ces composés aux récepteurs intracellulaire des stéroïdes qui permet de cibler directement le noyau *via* leurs séquences de translocation.

De nombreux essais ont été menés dans cette direction, avec comme soucis majeur, la perte de la spécificité de reconnaissance des stéroïdes pour leurs récepteurs ^[103]. Cette baisse d'affinité est dépendante du site de fixation aux stéroïdes et peut être, dans une certaine mesure, limitée ^[104, 105, 106, 107]. Ces études n'ont pas pu démontrer de corrélation entre le taux d'incorporation intracellulaire des photosensibilisants et leur efficacité photodynamique ^[108].

L'EGF (*Epithelial Growth Factor*) est également un adresseur potentiel car ce polypeptide possède un récepteur sur-exprimé par certains cancers ovariens. L'efficacité de plusieurs photosensibilisants couplés à l'EGF étant jusqu'à 100 fois celle du composé non greffé ^[109], de gros efforts ont été menés dans cette direction en utilisant, par exemple, des bras espaceurs ^[110].

Un autre ligand souvent cité est l'insuline. Ce ligand permet d'endocyter les photosensibilisants et le couplage semble peu affecter la reconnaissance de l'insuline par son récepteur. D'autres équipes ont travaillé sur l'utilisation de vecteurs spécifiques de sites cellulaires comme les séquences NLS (Nuclear Localization sequence) qui, en visant l'ADN nucléaire, permet d'augmenter l'efficacité photodynamique de la chlorine e6 d'un facteur 1000 ^[111].

Actuellement, les principales stratégies utilisées sont le greffage de substituants osidiques, reconnus par des récepteurs de type lectines, le greffage de peptides reconnus spécifiquement par certains récepteurs cellulaires surexprimés par les cellules tumorales et/ou impliquée dans la néo-angiogénèse tumorale. Avant de développer ces deux points, il est intéressant de s'intéresser à la sélectivité de tous les photosensibilisants pour les tumeurs.

Le principe de la PDT repose sur une affinité relative du photosensibilisant pour la tumeur vis-à-vis du tissu sain. Cette affinité relative peut s'expliquer par des facteurs physiologiques propres aux tumeurs. En effet, le pH tumoral est souvent plus faible que celui des tissus environnants, ce qui pourrait entraîner une rétention du photosensibilisant ionisé ^[112]. En outre, l'accumulation des photosensibilisants hydrophobes peut s'expliquer par la présence de gouttelettes lipidiques en plus grande quantité dans les tumeurs. De plus, les cellules tumorales ont des capacités accrues de pinocytose et de phagocytose des porphyrines, car leur métabolisme est accéléré en raison de leur vitesse de prolifération rapide. La prolifération tumorale induit également une biosynthèse membranaire accélérée, et donc, une surexpression des récepteurs aux LDL, des transporteurs bien connus de photosensibilisants *in vivo*, comme nous l'avons déjà vu ^[113].

2.9.1 La vectorisation par des groupements osidiques

Les lectines sont des glycoprotéines membranaires surexprimées par les cellules tumorales, qui reconnaissent spécifiquement les groupements osidiques ^[114, 115]. Des études ont montré que le couplage d'une porphyrine avec un groupement osidique augmentait leur durée de vie plasmatique ^[113] et engendrait une sélectivité de rétention envers certaines tumeurs ^[116]. De plus, la modulation du nombre de groupements glycosylés permet de contrôler l'hydrophobie de ces nouvelles molécules ^[117, 118, 119]. En plus du ciblage et des modifications des propriétés physicochimiques, la glucoconjugaison entraîne une augmentation de l'activité photodynamique par rapport aux molécules mères ^[120], les composés possédant un nombre impair de motifs glycosylés étant souvent les plus actifs ^[121].

2.9.1.1 Porphyrines O-glycoconjuguées

La première génération de gluco-porphyrines ^[122] a été préparée par condensation d'hélicine (produit naturel issu de l'écorce de saule) acétylé ou de O- β -D-2,3,5,6-tétraacétyl-O-glucosyloxy-2-benzaldéhyde, benzaldéhyde glycosylé naturel, avec le pyrrole, soit selon la méthode de Treibs et Häberlé ^[61], soit selon Van der Made *et al* ^[123] (Figure 40).

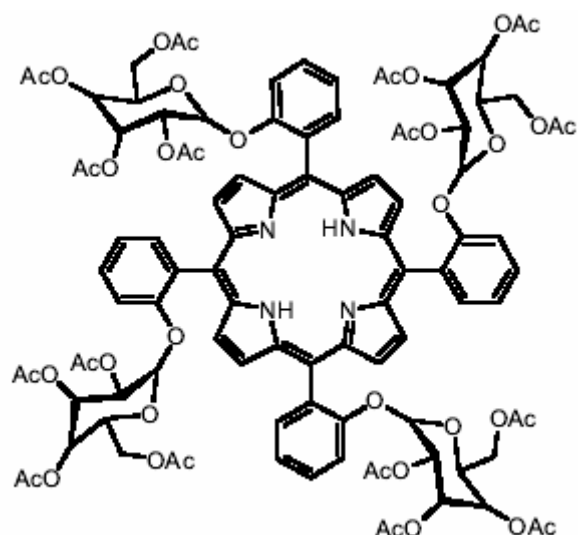


Figure 40 : Porphyrine glycoconjuguées à partir de l'hélicine

De même, les porphyrines glycoconjuguées en position *ortho*, *méta* ou *para* des groupes phényles ^[124] sont obtenues par condensation de différents benzaldéhydes glycosylés de pyrrole par la méthode décrite par Lindsey ^[125] (Figure 41).

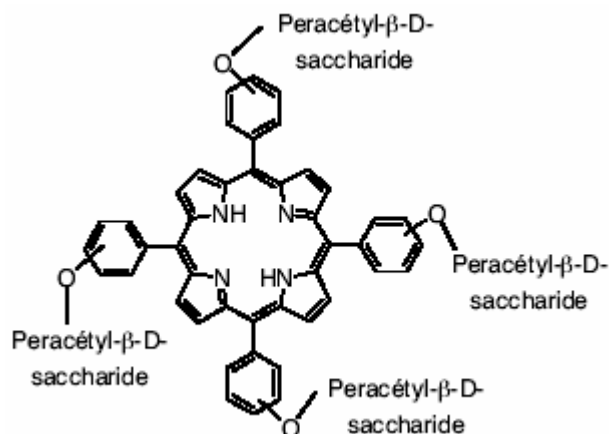


Figure 41 : Structure des porphyrines glycoconjuguées selon Lindsey ^[125]

Par condensation de pyrrole avec un benzaldéhyde glycosylé et un aldéhyde non glycosylé selon Lindsey, il est possible d'obtenir des porphyrines partiellement glycosylées et ainsi de contrôler l'hydrophilie de la molécule après déprotection des peracétylsaccharides ^[118, 126] (Figure 42).

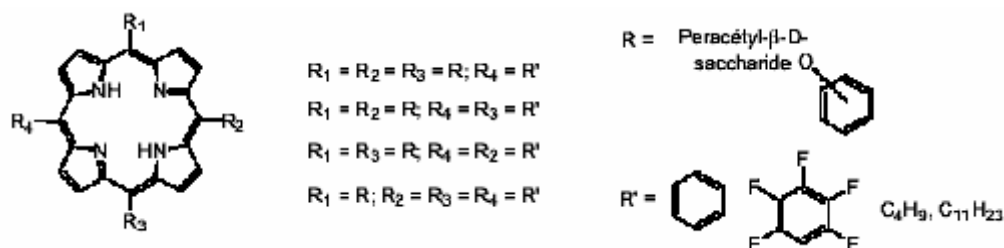
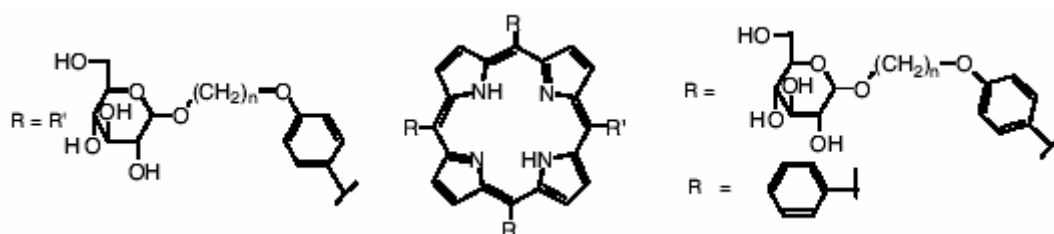


Figure 42 : Exemples de porphyrines multi glycoconjuguées

2.9.1.2 Porphyrine-espaceur-O- et S-glycoconjuguées

Dans le but de simplifier la synthèse des porphyrines glycoconjuguées et de donner une plus grande flexibilité aux saccharides pouvant favoriser de possibles interactions avec des récepteurs membranaires des cellules tumorales, des sucres ont été fixés aux *méso*-phényles, par un bras espaceur, à partir d'un précurseur unique ^[121].

La synthèse des porphyrines glycoconjuguées mixtes requiert la condensation d'un aldéhyde glycosylé, de benzaldéhyde et de pyrrole, dans les conditions de Lindsey. Ces conditions conduisent à la formation de six composés fastidieux à séparer et à purifier (Figure 43).

Figure 43 : Exemples de porphyrines glycosylées *via* un bras espaceur

Little ^[127] a décrit la condensation selon Williamson de bromo-alkanes sur des *méso*-(hydroxyphényl) porphyrines. Cette méthode permet de préparer les porphyrines α -mannosylées, impossibles à obtenir sans groupe espaceur.

2.9.1.3 Synthèse des chlorines glycoconjuguées

Les *méso*-5,10,15,20-tétra(aryl) chlorines possédant un spectre optique identique à celui du Foscan[®] ^[119] sont préparées par réduction sélective d'une double liaison β -pyrrolique du cœur tétrapyrrolique, par le 4-toluène-

sulfonohydrizide, générateur de diimide, selon la méthode de Whitlock [66, 128] (Figure 44).

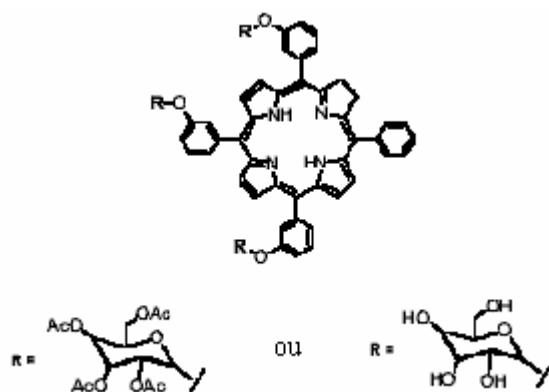


Figure 44 : Exemple de *méso*-aryl chlorines glycoconjuguées

Afin de pallier à l'oxydation rapide des *méso*-5,10,15,20-tétra(aryl) chlorines, des benzochlorines glycoconjuguées, moins sensibles à l'oxydation, ont également été synthétisées (Figure 45).

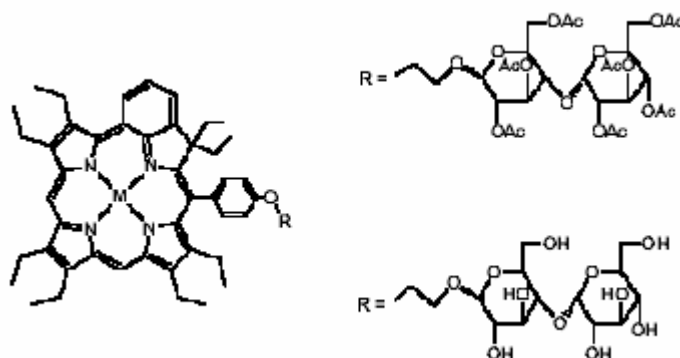


Figure 45 : Structure d'une benzochlorine glycoconjuguée

Le macrocycle est stabilisé sur l'un des pyrroles par la présence d'un groupe *gem*-diéthylé et d'un cycle "benzo" condensé. Cette molécule est issue du complexe de nickel(II) de la 5-*méso*-(*paraméthoxyphényl*)-octaéthylporphyrine après une substitution nucléophile par la 3-(diméthylamino) acroléine et, en présence d'acide trifluoroacétique, le groupement 2"-formylvinyl se cyclise [129].

2.9.1.4 Azaporphyrines glycoconjuguées

L'exaltation de l'absorption dans le rouge d'un macrocycle tétrapyrrolique peut être obtenue par substitution d'un pont *méso* par un atome d'azote [127] en monoazaporphyrines avec un rendement de 8-9%. La monoazaporphyrine est

glycosylée par un sucre α -bromo-peracétylé en présence de triéthylamine (Figure 46).

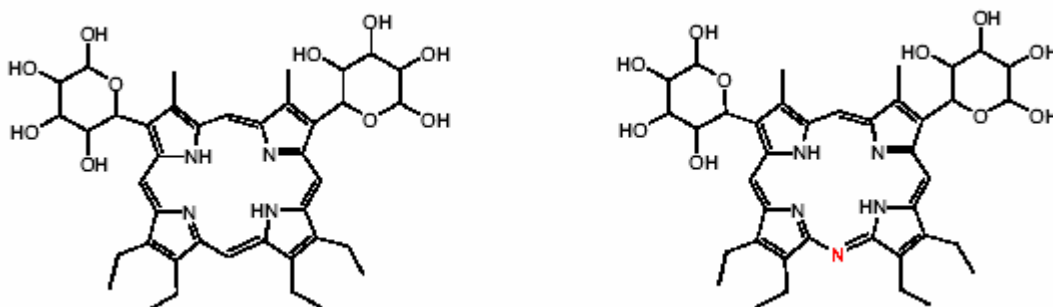


Figure 46 : Exemples d'azaporphyrines

Des porphyrines analogues sont obtenues par cyclisation de dipyrrométhane et du 1,9-diformyl-2,3,7,8-tétraéthylidipyrrométhane selon Mac Donald ^[130] ou cyclisation du biladiène en présence de formaldéhyde et d'acide bromhydrique dans le méthanol, suivie d'une glycosylation et d'une déprotection par le glucose ou le maltose (Figure 47).

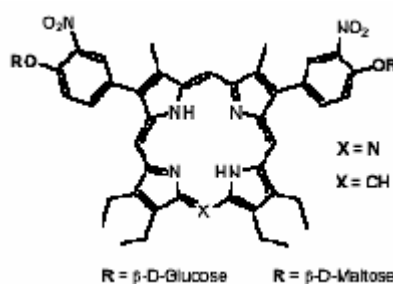


Figure 47 : Exemple d'azaporphyrines glycoconjuguées

Dans la partie suivante, nous allons nous intéresser aux substances anti-angiogéniques et à leur couplage avec des photosensibilisants.

2.9.2 Les substances anti-angiogéniques et la stratégie de couplage *via* RGD pour cibler l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Goldman a décrit la néovascularisation tumorale pour la première fois en 1907 ^[131]. Ce n'est que bien plus tard, au début des années 70, qu'elle a été désignée comme cible thérapeutique pour le traitement du cancer ^[132, 133]. En 2004, l'Avastatine[®], un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF, est le premier médicament à recevoir l'AMM aux Etats-Unis.

2.9.2.1 La néo-angiogenèse tumorale

2.9.2.1.1 Mécanisme de formation des vaisseaux sanguins

L'angiogénèse, définie comme l'initiation et le contrôle de la croissance des vaisseaux sanguins, est une cible potentielle intéressante. C'est un processus de croissance et de réorganisation du réseau vasculaire pré-existant par la production de nouvelles ramifications nécessitant plusieurs étapes ^[134] (Figure 48).

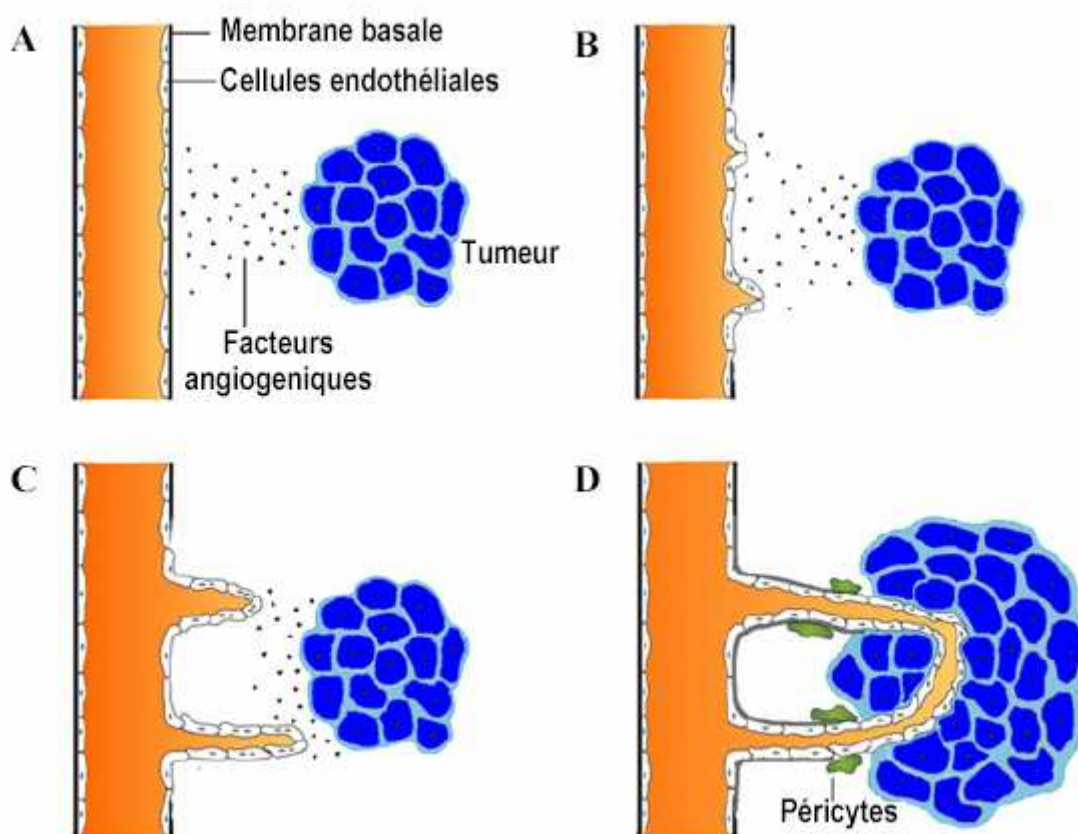


Figure 48 : Les principales étapes de la formation des vaisseaux sanguins tumoraux. (A) Relargage des facteurs pro-angiogéniques et activation des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, (B) Dégradation de la membrane basale du vaisseau par les enzymes protéolytiques, (C) Migration et prolifération des cellules endothéliales en direction de la source de la tumeur, (D) Régénération de la membrane basale

2.9.2.1.2 Dérégulation de l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques

De nombreux signaux pro- et anti-angiogéniques contrôlent l'initiation du processus, appelé « *angiogenic switch* »^[135]. Dans les conditions normales, ainsi que dans les tumeurs quiescentes, les facteurs inhibiteurs sont dominants. En présence de facteurs stimulant l'angiogenèse, tels que l'hypoxie, un stress mécanique, l'inflammation ou encore la dérégulation génétique des facteurs régulateurs de l'angiogenèse^[136], la balance peut être inversée. Parmi ces facteurs, le VEGF, le TNF α (*tumor necrosis factor*), le PDGF (*platelet-derived growth factor*) et les FGFs (*fibroblast growth factors*) jouent un rôle central lors de l'initiation. L'inhibition des facteurs anti-angiogéniques comme l'angiostatine, l'endostatine ou encore les inhibiteurs des métalloprotéases est également un facteur non négligeable.

2.9.2.1.3 Activation des cellules endothéliales

L'activation des cellules endothéliales est caractérisée par la surexpression de récepteurs de facteurs de croissance et des molécules d'adhésion à leur surface, accompagnée, dans certains cas, par un changement morphologique.

2.9.2.1.4 Libération d'enzymes protéolytiques

La sécrétion d'enzymes protéolytiques permet la dégradation de la matrice extracellulaire et de la membrane basale de l'endothélium. Ces enzymes sont les métalloprotéases, les collagénases, les cathepsines ou encore l'activateur du plasminogène^[137]. L'action de ces protéases conduit également à la libération ou à l'activation de facteurs de croissance piégés dans la matrice extracellulaire (MEC)^[138].

2.9.2.1.5 Morphogenèse des capillaires par migration et multiplication des cellules endothéliales

Une fois détruite la matrice située entre le vaisseau et le foyer angiogénique, on observe une migration des cellules endothéliales orientée par chimiotactisme à l'aide des molécules d'adhésion, telles que les intégrines. La formation du néovaisseau est ensuite assurée par une rapide prolifération des cellules endothéliales. Par la suite, la membrane basale est régénérée, ce qui permet une consolidation du néovaisseau.

2.9.2.1.6 Caractéristiques des néo-vaisseaux

Les vaisseaux formés lors de l'angiogenèse tumorale possèdent une architecture chaotique et sont aussi fragiles que perméables. En effet, les vaisseaux sont anormalement ramifiés, désorganisés et irrégulièrement dilatés. La circulation sanguine est donc faible et irrégulière. La perméabilité est due à la présence irrégulière de la membrane basale et à la présence de jonctions intercellulaires non adhérentes ^[139]. Cette caractéristique est un atout pour le clinicien, car elle favorise le relargage des drogues au niveau de la tumeur.

2.9.3 Les stratégies anti-angiogéniques

Depuis que Folkman a proposé d'utiliser l'inhibition de l'angiogenèse comme stratégie anti-tumorale en 1971, de nombreux composés ciblant différentes étapes de l'angiogenèse ont été créés et plus d'une soixantaine d'entre eux sont aujourd'hui en cours d'essais cliniques en cancérologie.

2.9.3.1 Inhibition des activateurs de l'angiogenèse

Il est possible d'inactiver ou de séquestrer les facteurs pro-angiogéniques (tels le FGF ou le VEGF) ou leurs récepteurs cellulaires. Le bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé contre le VEGF, a reçu l'AMM par la FDA en 2004 sous le nom commercial d'Avastatine[®] dans le cadre d'une utilisation en combinaison avec le 5-Fluorouracil, pour le traitement de cancers colo-rectaux métastatiques. D'autres composés sont également étudiés. Le SU-5416 inhibe la phosphorylation de KDR (un des récepteurs du VEGF) ^[140]. Le SU-6668, quant à lui, inhibe plusieurs récepteurs, dont ceux du VEGF, du bFGF et du PDGF ^[141]. On pourra encore citer l'Iressa (ZD1839), un inhibiteur du récepteur de l'EGF ^[142].

2.9.3.2 Inhibition de la protéolyse de la matrice extracellulaire

Le Batimastat et le Prinomastat sont des exemples d'inhibiteurs synthétiques des métalloprotéases, qui sont responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire. Des inhibiteurs naturels, comme la forme recombinante du PEX (un sous-produit de la dégradation d'une métalloprotéase) sont efficaces *in vivo* ^[143].

2.9.3.3 Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales

L'O-chloroacétylcarbamoyle fumagillol, un analogue synthétique de la fumagilline (un antifongique) est un des premiers composés anti-prolifératifs à avoir été identifié [144]. Ce composé inhiberait l'entrée des cellules endothéliales en phase G1 du cycle cellulaire [145]. L'angiostatine [146], l'endostatine [147] ou encore le facteur plaquettaire-4 [148] sont d'autres composés angiostatiques connus.

2.9.3.4 Inhibition des interactions cellules endothéliales-MEC

Les phénomènes d'adhésion et de migration des cellules endothéliales sont déterminants dans la formation des néo-vaisseaux. La Vitaxin, un anticorps monoclonal humanisé, se lie à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et permet de moduler l'angiogenèse [149, 150]. Le Cilengitide (MD121974) est un pentapeptide cyclique synthétique qui est reconnu d'une manière très spécifique par les intégrines $\alpha_v\beta_3$ [151]. Nos travaux s'inspirent directement de ce peptide, qui sera décrit plus loin dans ce manuscrit.

2.9.4 Les récepteurs de la famille des intégrines

Les intégrines constituent une famille de récepteurs transmembranaires hétérodimères composés de chaînes α (150 à 200 kDa) et β (90 à 110 kDa) liées de façon non covalente et impliquées dans les interactions cellule-matrice extracellulaire (MEC) et cellule-cellule [152]. Chaque sous-unité possède un important domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un domaine intra-cytoplasmique de 20 à 60 acides aminés [153]. La chaîne α possède des séquences répétées permettant la fixation de cations divalents (Ca^{2+} essentiellement) et la formation d'un dimère activé, lorsque celui-ci ne l'est pas de manière constitutive. La chaîne β , quant à elle, a surtout un rôle dans la fixation de ligands de la matrice extracellulaire ou d'autres molécules d'adhésion cellulaire (Figure 49).

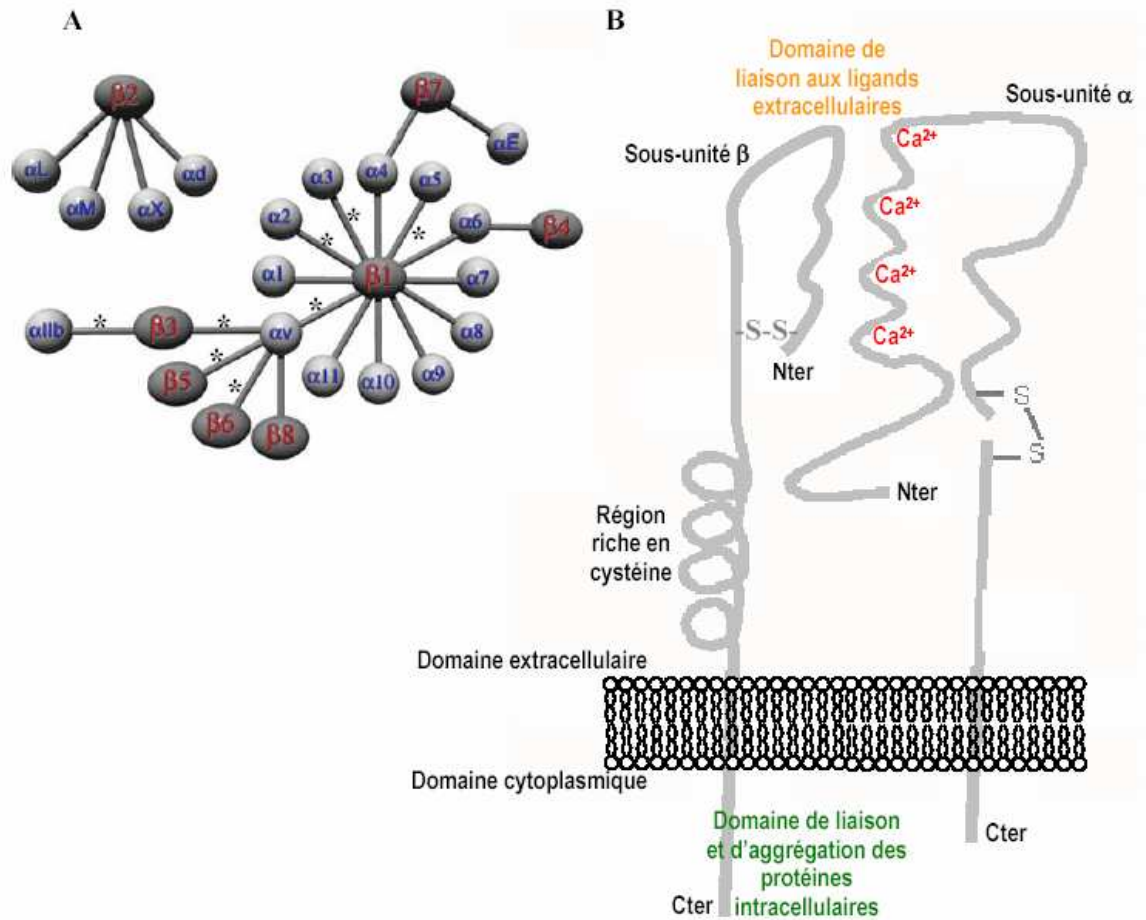


Figure 49 : Récepteurs de la famille des intégrines. (A) Les différentes associations entre les sous-unités α et β . Les intégrines de la famille βA se liant à leur substrat *via* le motif RGD sont indiquées par une étoile, (B) Représentation schématique d'une intégrine

Les intégrines participent à la transmission de signaux issus de l'environnement cellulaire et interviennent dans la régulation des fonctions cellulaires fondamentales, comme la prolifération et la survie, et dans le développement tumoral car elles sont liées au cytosquelette et permettent donc la transduction de signaux venus de la matrice ^[154]. Chaque combinaison α - β détermine la spécificité du récepteur avec son ligand, sachant qu'une vingtaine de combinaisons sont connues à ce jour et que chaque souche cancéreuse possède un « pattern » particulier d'expression des intégrines, ce qui permet de les cibler en utilisant des ligands spécifiques ^[155]. Leurs principaux ligands extracellulaires sont la laminine, la vitronectine, la fibronectine, le fibrinogène et

les collagènes I et IV. Les interactions intégrine-ligand sont gouvernées essentiellement par quatre facteurs :

- La présence ou non d'un domaine αA sur la chaîne α du récepteur ^[156].
- La présence sur le ligand de séquences reconnues par un type d'intégrine ^[157].
- La formation de complexes ternaires avec des cations divalents (Mg^{2+} et Ca^{2+} , essentiellement).
- La transition vers une conformation active de l'intégrine ^[158].

2.9.4.1 Intégrine $\alpha_v\beta_3$

La formation de ramifications vasculaires nécessite la migration et l'adhésion des cellules endothéliales vasculaires dans la matrice extracellulaire. Des molécules d'adhésion spécialisées, dont l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ interviennent lors de ces deux phénomènes. Bien qu'essentiel, le rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et le mécanisme d'action de ses antagonistes sont, à ce jour, non élucidés. L'intérêt pour ce récepteur provient du fait qu'il est surexprimé par les cellules endothéliales et par de nombreuses lignées tumorales, mais son implication dans la néovascularisation et dans l'agressivité tumorale reste mal comprise.

2.9.4.2 Rôle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ dans la néo-angiogenèse

Historiquement, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été décrite comme un marqueur de la néo-angiogenèse ^[159]. L'équipe de Brooks a observé des niveaux d'expression de ce marqueur dans différents modèles d'angiogenèse. La même équipe a démontré l'inhibition de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par l'anticorps LM609. Cette inhibition bloque l'angiogenèse tumorale induite par le $TNF\alpha$ et le $bFGF$. Ces résultats ont suscité un vif intérêt pour l'identification et la synthèse d'inhibiteurs spécifiques.

Récemment, Reynolds et ses collaborateurs ont remis en cause l'implication de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ^[160]. En effet, ils ont observé une angiogenèse accrue sur des souris β_3 et β_5 KO (*Knock-out*). Dans un autre papier, la même équipe suggère que l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pourrait avoir un rôle beaucoup plus complexe que celui d'inducteur de l'angiogenèse ^[161]. Elle pourrait avoir un rôle central dans la régulation de l'angiogenèse, pro- ou anti-angiogénique, selon les conditions (Figure 50). Cette hypothèse est basée sur trois observations :

- L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ régule négativement le récepteur du VEGF flk-1.

- L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ lie des facteurs anti-angiogéniques comme la trombospondine.
- L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ inhibe d'autres intégrines impliquées dans l'angiogenèse.

Ce nouveau modèle suggère un mécanisme d'action des molécules anti-angiogéniques de type agoniste et pas forcément antagoniste.

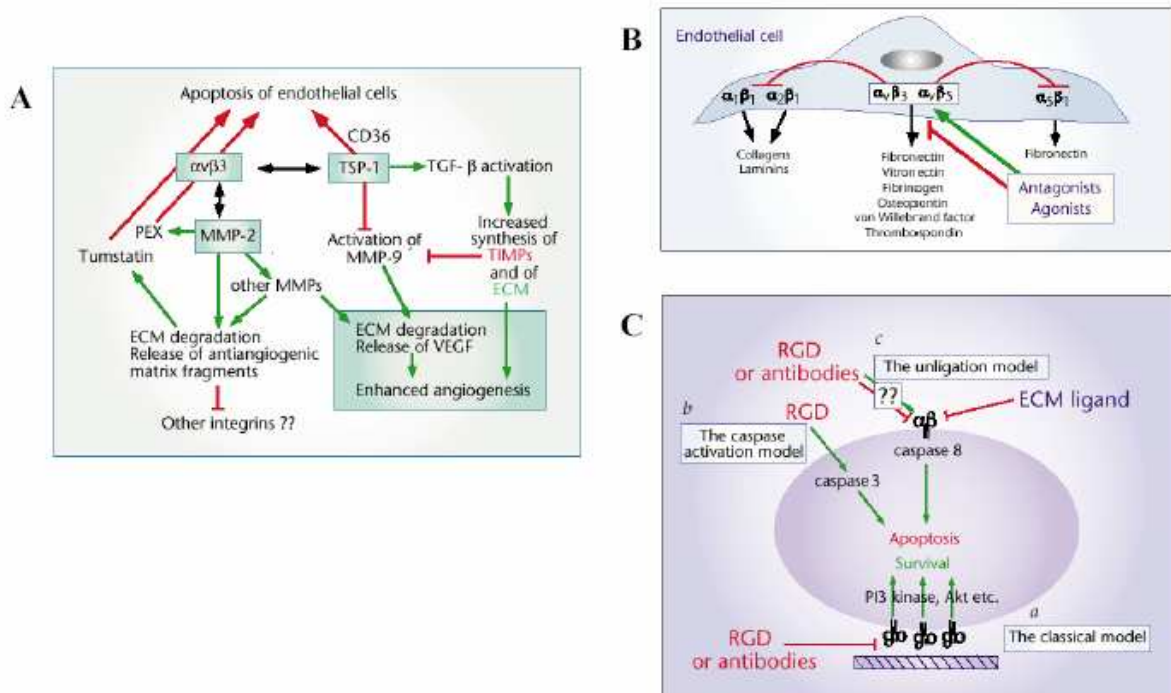


Figure 50 : Les grandes fonctions de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. (A) Modulation d'activités cellulaires inductrices ou inhibitrices de l'angiogenèse. (B) Inhibition d'intégrines pro-angiogéniques. (C) Intervention dans les cascades de signalisation de l'apoptose

2.9.4.3 Structure de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'équipe de Xiong a publié en 2001 la structure cristallographique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec une résolution proche de 0,3 nm (Figure 51) [162]. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comprend 12 domaines répartis entre une région supérieure ovoïde et deux fragments allongés. Elle est recourbée au niveau du site « Genu » ce qui, selon les auteurs, suggère une grande flexibilité conformationnelle du récepteur qui serait à l'origine de ses fonctions de régulation. L'interface principale entre les deux sous-unités se situe au niveau de la tête ovoïde.

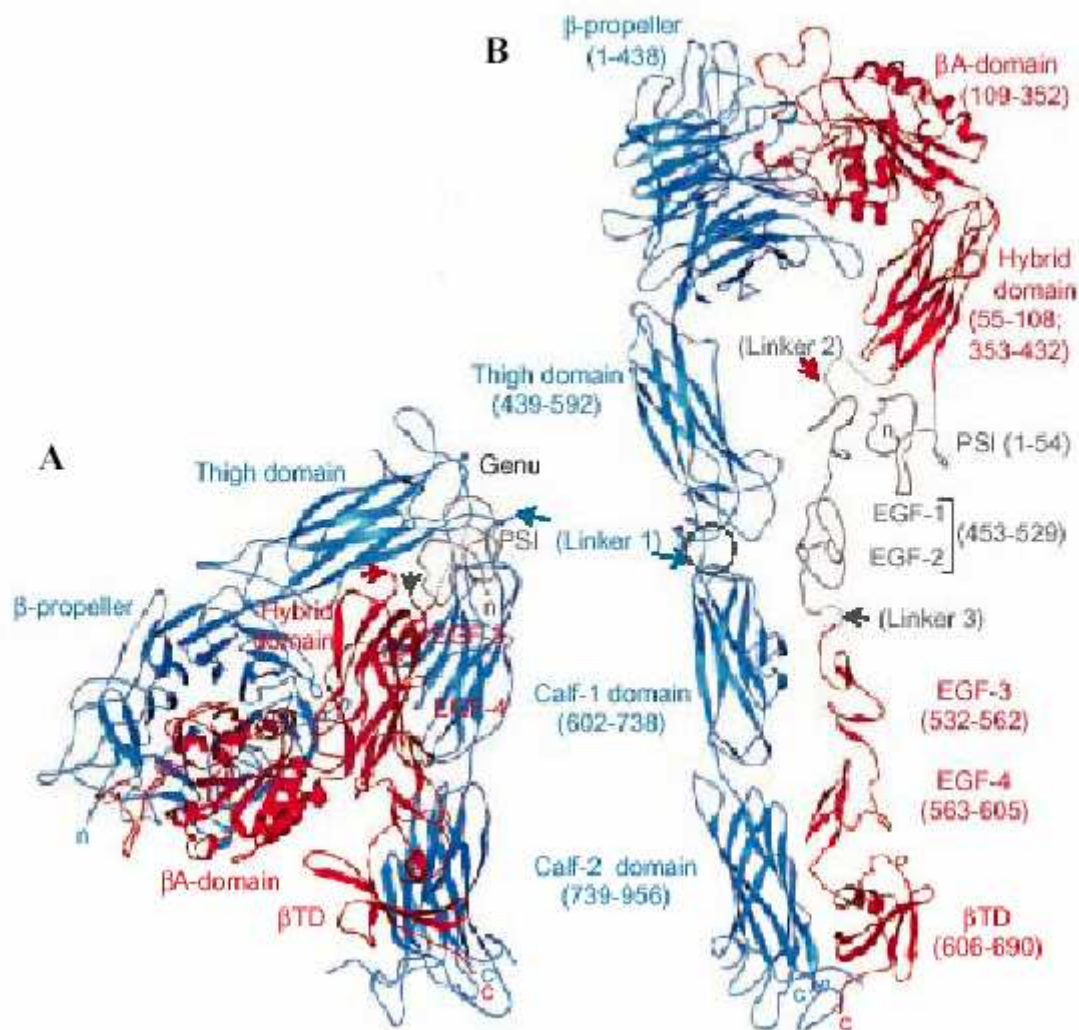


Figure 51 : Représentation en ruban de la partie extracellulaire cristallisée de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (sous-unité α_v , sous-unité β_3). (A) Structure cristalline du récepteur, (B) Modèle du récepteur déployé

2.9.4.4 Ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Certaines intégrines semblent lier uniquement une macromolécule de la matrice extracellulaire, telle que la laminine ou la fibronectine, alors que d'autres en reconnaissent plusieurs. De nombreuses intégrines (environ la moitié des hétérodimères) reconnaissent la séquence tripeptidique RGD (H-Arg-Gly-Asp-OH) alors que d'autres reconnaissent des séquences et des domaines variés. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ fait partie de la première catégorie. La séquence RGD est un motif commun présent sur la plupart des protéines de la matrice extracellulaire mais aussi sur d'autres protéines. Toutefois, la conformation de ce motif et les séquences adjacentes modulent l'affinité de la liaison pour ces protéines. Dans

le cas de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, le ligand privilégié semble être la vitronectine. La fibronectine, le fibrinogène, les collagènes I et IV, la laminine, la thrombine, la thrombospondine et l'ostéopontine sont également reconnus, mais dans une moindre mesure ^[163]. Le développement de peptides synthétiques RGD spécifiques de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est directement issu de ces observations.

2.9.4.5 Les stratégies thérapeutiques utilisant les peptides de type RGD

Les intégrines et les ligands de type RGD sont actuellement au centre d'intenses recherches. De nombreuses thérapies utilisent des composés liés directement à des peptides de type RGD ou intégrés dans des transporteurs couplés à ces motifs.

De nombreux motifs dérivés du peptide RGD ont été synthétisés, car il a été démontré que les séquences flanquant ce tripeptide jouent un rôle majeur dans la spécificité de reconnaissance par les différents types d'intégrines. En effet, ces séquences influencent la conformation du peptide. Dans cette optique, la cyclisation est communément utilisée pour améliorer les propriétés de liaison des peptides RGD. De plus, il a été démontré que les peptides linéaires étaient très sensibles à une dégradation chimique *via* la réaction du résidu d'acide aspartique avec le squelette peptidique ^[164]. Cette dégradation est rendue impossible par la cyclisation qui rigidifie l'ensemble, et donc, stabilise le peptide. Enfin, l'introduction d'acides aminés non naturels (comme la *D*-Phénylalanine) ou l'utilisation de pseudopeptides permet d'augmenter la spécificité et l'affinité de ces peptides ^[165].

Un des peptides RGD les plus étudiés pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est le Cilengitide. Ce composé, grâce à ses propriétés conformationnelles, possède une très forte affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, en comparaison avec la vitronectine, ainsi qu'une bonne spécificité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, en comparaison avec l'intégrine $\alpha_{IIb}\beta_3$ ^[143]. Parmi les nombreux dérivés du Cilengitide, c[-RGDfK-] est souvent utilisé grâce à la chaîne latérale de la lysine qui favorise les réactions de conjugaison avec d'autres composés.

Un autre peptide très efficace, ACDCRGDCFCG ou RGD4C, a été isolé par phage display ^[166]. Bien qu'efficace, ce peptide est peu soluble et difficile à synthétiser. c[-RGDfK-] lui est donc souvent préféré, également pour des raisons de stabilité et de facilité de conjugaison. Il est à noter que de nombreux pseudopeptides, très stables et possédant une forte affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ont également été développés ^[165]. Malheureusement, ces composés sont peu utilisés en raison de leur manque de sites de couplages à d'autres molécules.

L'affinité et les propriétés pharmacocinétiques des ligands RGD peuvent être également améliorées en les couplant à des structures de transport. On peut citer l'exemple des conjugués protéiques multivalents utilisés par Kok *et al.* ^[167].

Les peptides RGD ont également souvent été modifiés, par PEGylation par exemple, afin d'améliorer leurs propriétés pharmacocinétiques en diminuant la clairance et en limitant leur dégradation ^[168].

Lors des premières expériences, le motif RGD n'a pas été utilisé seul, comme composé anti-angiogénique, mais couplé à la doxorubicine ^[144]. Plusieurs motifs ont été utilisés, mais de nombreux problèmes de stabilité et de solubilité ont été rencontrés, sauf dans le cas du peptide c[-RGDfK-]. Malgré tout, RGD4C, de par sa linéarité, est facilement conjugable à des pseudopeptides ou à des protéines en phase solide, ce que l'étape de cyclisation de c[-RGDfK-] ne permet pas.

Ces motifs ont également été utilisés couplés à des séquences nucléotidiques à visée thérapeutique afin d'améliorer leur incorporation intracellulaire ^[169, 170] ou encore à des agents contrastants, pour la détection de métastases ou le suivi de thérapies anti-angiogéniques ^[171].

2.9.4.6 Pentapeptide cyclique c[-RGDfK]

Au début des années 1990, l'équipe de H. Kessler a initié l'étude de l'impact de contraintes stériques sur l'incorporation de penta- et d'hexapeptides cycliques contenant le motif RGD. Pour ce faire, ils ont mené des tests d'affinité pour les récepteurs purifiés ^[172] ainsi que des tests de compétition avec les

substrats naturels ^[173]. Ces études de *screening* ont conduit à la sélection d'un pentapeptide cyclique c[-RGDfV-] sélectif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. En effet, ce ligand possède une affinité (IC₅₀ 50 nM) proche de celle de la vitronectine (IC₅₀ 25 nM) pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ soluble ou immobilisée. Cette affinité est 1000 fois supérieure à celle obtenue sur d'autres récepteurs de la même famille, tels $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$. Afin d'augmenter la contrainte conformationnelle des composés cycliques, la même équipe a synthétisé des peptides méthylés sur le N α de chaque liaison peptidique de c[-RGDfV-] afin d'améliorer l'affinité du ligand ^[174]. Sur les cinq composés étudiés, le composé méthylé sur le résidu valine a montré la plus forte affinité et la meilleure sélectivité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en compétition avec la vitronectine. Le composé c[-RGDfV(N-Me)-] est testé en protocoles d'essais cliniques de phases II et III comme agent anti-angiogénique sous le nom de Cilengitide par la société Merck (Figure 52).

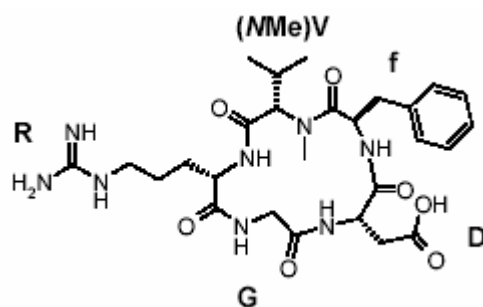


Figure 52 : Structure du Cilengitide

En 1998, l'équipe de Ruoslahti a démontré que le motif RGD pouvait également servir à adresser certains composés sélectivement vers les tumeurs. Dans leur étude, ils ont couplé la Doxorubicine à un nonapeptide de séquence CDCRGDCFC. Ils ont ainsi amélioré significativement la survie de souris ^[175]. Par la suite, un composé synthétisé par Kessler ^[176], c[-RGDfK-], est devenu un transporteur modèle grâce à la présence de la lysine. En effet, la chaîne latérale de la lysine est fonctionnalisée et permet de coupler aisément le peptide à de nombreuses molécules, comme les photosensibilisants monocarboxyliques, par exemple.

2.9.4.7 Bases structurales des interactions du cyclopeptide avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'équipe de Xiong a réalisé, en 2002, l'exploit de cristalliser l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en présence du ligand c[-RGDfV(N-Me)-] et de manganèse [177]. Ils ont comparé la structure du domaine extracellulaire du dimère en présence et en absence du ligand afin d'appréhender les changements structuraux provoqués par ce dernier (Figures 53 et 54).

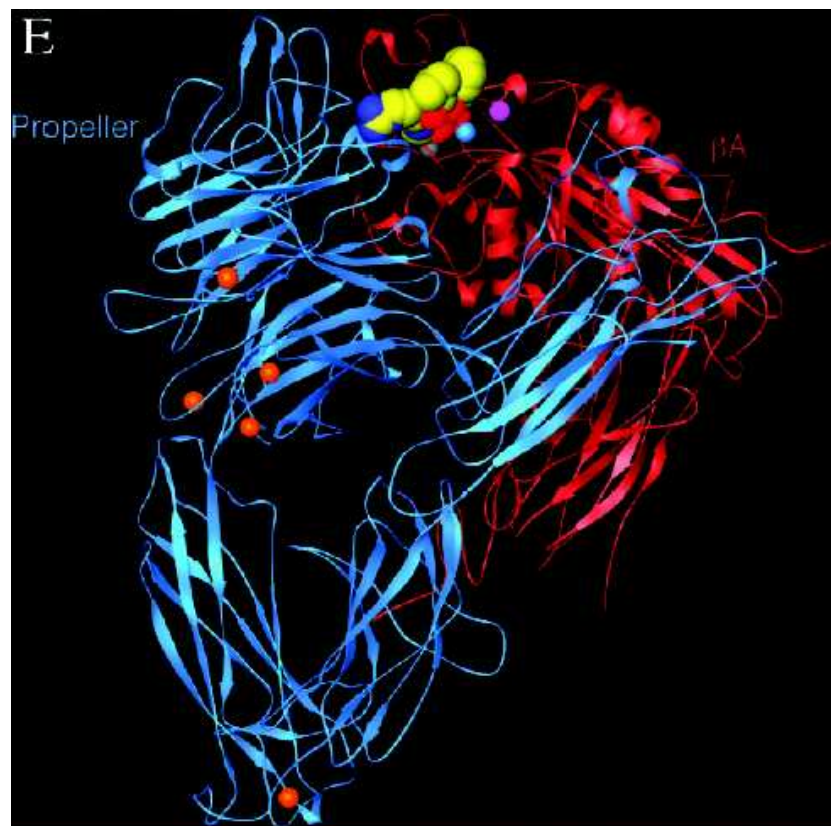


Figure 53 : Représentation du complexe ternaire $\alpha_v\beta_3$ -RGD- Mn^{2+} . Les positions des cations Mn^{2+} des sites MIDAS, LIMBS et ADMIDAS (adjacent au site MIDAS) sont précisées par les boules bleues, grises et violettes respectivement, celles des cinq autres cations par des boules oranges. Le cyclopentapeptide est représenté par une structure en boules.

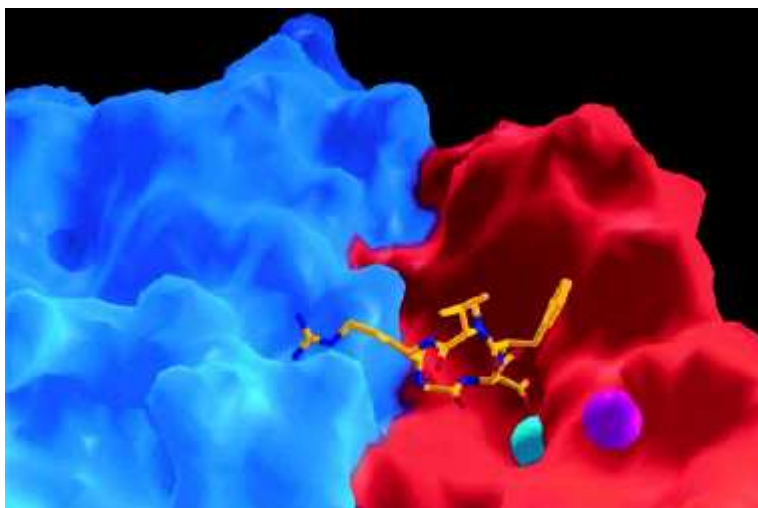


Figure 54 : Représentation de la surface du site de fixation du cyclopentapeptide

Il existe deux catégories d'intégrines, si l'on s'intéresse au domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance du ligand. Les intégrines αA reconnaissent le ligand *via* la séquence A de la chaîne α . Cette liaison requiert la coordination d'un cation divalent au niveau du site MIDAS (*metal ion-dependent adhesion site*) du domaine αA . Les intégrines appartenant à la catégorie βA , dont l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, reconnaissent les ligands possédant un résidu d'acide aspartique à l'aide d'un domaine βA (αA -like) localisé sur la chaîne β . En absence de ligand, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ interagit avec six cations, mais l'interaction avec le ligand requiert deux cations Mn^{2+} supplémentaires. Un des cations interagit avec le motif MIDAS du domaine βA et l'autre avec le site LIMBS (*Ligand-associated metal binding site*) du domaine βA , ce qui stabilise l'interaction ligand/récepteur. L'approche du ligand provoque, pour l'essentiel, des modifications dans la structure III du domaine βA de la sous-unité β_3 de l'intégrine, mais on observe une légère modification de l'orientation du domaine Propeller de la chaîne α_v . Une légère distorsion du squelette peptidique du ligand est également observée.

2.9.5 Photosensibilisants vectorisés ciblant les récepteurs aux intégrines

L'utilisation de photosensibilisants créant une occlusion a été récemment décrite pour le Pd-bactériophéophorbide ^[178, 179]. L'idée est de potentialiser l'effet photodynamique en induisant une hypoxie au niveau tumoral. Nous pouvons également citer le ciblage du récepteur au VEGF (*Vascular endothelial Growth*

Factor), KDR qui intervient dans la croissance de l'endothélium vasculaire, nécessaire au développement tumoral. Une approche consiste à greffer un peptide reconnu spécifiquement par KDR à une chlorine, afin de détruire la tumeur (Figure 55) [180, 181].

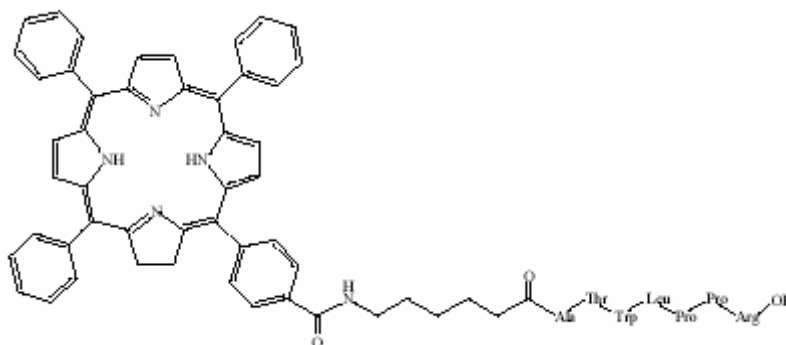


Figure 55 : Structure chimique du conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR

Cette même approche a été utilisée par l'équipe d'Allen qui a utilisé des phtalocyanines couplées à des protéines de type 2 de la capsid d'adénovirus *via* un bras espaceur de type acide caproïque [182]. Ces protéines ont une forte affinité pour les intégrines de certains cancers (cellules de poumon par exemple), grâce à plusieurs répétitions (cinq ou six) de la séquence H-Arg-Gly-Asp-OH. Certains de ces photosensibilisants ont montré une plus grande affinité, *in vitro*, pour les souches cellulaires exprimant les intégrines et, au contraire, une faible affinité pour les cellules sous-exprimant ces récepteurs. De plus, l'adressage des phtalocyanines par ces protéines a permis de diminuer sensiblement les doses de photosensibilisants nécessaires à une cure complète de tumeurs greffées sur des souris Balb/c. Plus récemment, une approche similaire, utilisant un pentapeptide cyclique a été publiée (Figure 56) [183]. Le peptide linéaire synthétisé sur support solide a été couplé au photosensibilisant, puis cyclisé par métathèse. Ces résultats nous ont encouragé dans notre choix d'un système simple avec fixation d'une seule séquence de type H-Arg-Gly-Asp-OH.

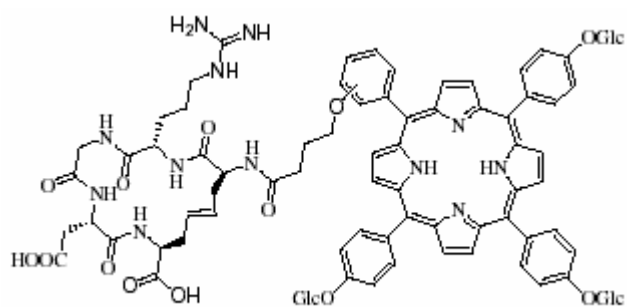


Figure 56 : Structure de la porphyrine couplée au pentapeptide cyclisé par métathèse ^[183]

Objectifs de l'étude

L'effet curatif de la thérapie photodynamique en cancérologie est dû, soit à destruction directe des cellules cancéreuses, soit à leur destruction indirecte, conséquence de la destruction de la vascularisation. Dans cette double optique, nous avons synthétisé et étudié de nouveaux photosensibilisants conjugués avec des motifs osidiques ou peptidiques.

Il a été démontré par plusieurs équipes que l'adjonction de motifs glycosylés améliorerait l'efficacité des porphyrines *in vitro* et *in vivo*. Des composés mono et bi-glycosylés (chlorines et porphyrines) ont été synthétisés, afin de vérifier l'impact du nombre de motifs glycosylés et de l'asymétrie du couplage sur la solubilisation, les propriétés photophysiques, la rétention sélective et la phototoxicité de ces produits.

Le même type d'étude a été conduit sur des composés greffés avec un motif peptidique de type H-Arg-Gly-Asp-OH permettant de cibler les intégrines qui sont surexprimées sur certains types tumoraux et les néo-vaisseaux, permettant une double approche thérapeutique, comme celle utilisée par l'équipe du Pr. Van Lier relatant le ciblage par ce segment tripeptidique en thérapie photodynamique. Dans un premier temps, nous avons synthétisé et étudié deux photosensibilisants couplés directement à un tripeptide RGD. Ensuite, nous avons synthétisé un photosensibilisant lié à un pentapeptide cyclique de formule c[RGDfK], ce nouveau vecteur étant un inhibiteur très sélectif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de l'angiogénèse grâce à la contrainte due à la cyclisation. Ce peptide semble avoir des caractéristiques idéales pour la vectorisation de photosensibilisants. Outre la spécificité de fixation sur un type cellulaire donné, un faible encombrement stérique limitant l'impact sur la formation d'oxygène singulet, ce peptide induit l'endocytose dans un compartiment cellulaire (lysosome) sensible. De plus, sa faible taille permet une clairance rapide des organes non visés et la présence de charges permet une meilleure solubilisation.

Parallèlement, dans le cadre d'un programme européen Cost-Chemistry intitulé "*New molecular systems with therapeutic applications in photodynamic therapy of cancer and microbial infections*", les propriétés photophysiques de nombreux photosensibilisants synthétisés par l'équipe roumaine du Dr R.M. Ion ont été étudiées lors d'un stage de 3 mois effectué à l'Université d'Amsterdam dans le cadre d'un échange européen Marie Curie.

Partie II

Etude de composés glycosylés pour des applications en thérapie photodynamique

1 Contexte de l'étude

Un bon photosensibilisant pour la PDT doit être sélectif et rapidement éliminé des tissus sains. De plus, il doit absorber fortement la lumière rouge et transférer le maximum de l'énergie reçue à l'oxygène moléculaire, afin de produire de l'oxygène singulet. De nombreux photosensibilisants de 2^{ème} génération (porphyrines, chlorines, bactériochlorines) ont été modifiés de façon à améliorer leurs propriétés selon ces critères, mais seuls quelques uns ont reçu l'approbation des agences gouvernementales de régulation.

Une des manières d'augmenter la sélectivité d'un photosensibilisant est de l'adresser *via* un vecteur. Dans ce cadre, les porphyrines glycosylées présentent un grand intérêt. En effet, les motifs glycosylés augmentent la durée de vie plasmatique et la solubilité des porphyrines. De plus, certaines souches tumorales présentent une forte affinité pour les sucres. En effet, l'impact de la glycoconjugaison sur l'hydrophobie des composés tétrapyrroliques varie selon le nombre de substituants et la symétrie des composés. Il est ainsi possible de moduler l'amphiphilicité des composés obtenus ainsi que leur solubilité ^[184]. En outre, cette approche permet d'inverser la tendance naturelle qu'ont les photosensibilisants à s'agréger en milieu aqueux. Il a en effet été démontré que la forme monomère (non agrégée) est plus efficace, *in vitro*, car l'agrégation tend à diminuer la biodistribution et les propriétés photophysiques des macrocycles ^[185].

L'équipe de Moser a observé une augmentation de près d'un facteur 100 de la photocytotoxicité de porphyrinoïdes diglucosaminés en comparaison avec les analogues non substitués ^[186]. La position du motif glucosylé est également très importante ^[187].

Si des porphyrines O-glycosylées et S-glycosylées ont déjà été synthétisées, nous n'avons pas connaissance de l'existence de porphyrines aminoglycosylées en dehors de l'étude menée par Furhop sur une PpIX

glucosamidée ^[188]. La liaison amino doit permettre une meilleure résistance à l'hydrolyse par les glycosylases endogènes ^[189].

2 Objectif

Notre objectif était d'effectuer la synthèse et de rapporter les propriétés photophysiques (absorption, fluorescence, rendements quantiques de formation d'oxygène singulet) de nouvelles porphyrines glycosylées. Nous avons également évalué leurs propriétés photocytotoxiques sur une lignée humaine d'adénocarcinome colique (HT29).

3 Résultats

Dans une première étape, nous avons évalué des tétraphénylporphyrines tétra-N-glucosylées dont les sucres étaient méthylés, acétylés ou laissés sous forme libre. Bien que possédant des propriétés photophysiques proches de la porphyrine témoin (la TPP) et un taux d'incorporation plus élevé (dans le cas des sucres acétylés), ces composés n'ont pas démontré d'efficacité thérapeutique *in vitro*. Les résultats de cette étude sont présentés dans la publication *New glycosylated porphyrins for PDT applications* ^[190]

Dans un deuxième temps, nous avons envisagé une nouvelle approche du problème dans cette publication en nous intéressant au degré de glycosylation des porphyrines ainsi qu'à la synthèse de chlorines correspondantes. Nous avons étudié l'influence des modifications structurales induites par un glycosylation symétrique ou asymétrique sur les propriétés photophysiques ainsi que sur l'efficacité thérapeutique sur la lignée tumorale HT29.

Cette étude a démontré que les cellules de la lignée d'adénocarcinome colique étaient significativement plus sensibles aux composés asymétriques et moins hydrophobes par comparaison aux composés bi-glucosylés et à la TPP. Cette étude est présentée dans *The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin* ^[191]

4 Conclusion

De nombreux photosensibilisants de 2^{ème} génération ont été modifiés afin d'améliorer leur sélectivité envers les cellules tumorales ainsi que leurs caractéristiques photophysiques. Une des méthodes utilisée est le couplage des photosensibilisants à des vecteurs. Dans cette étude, nous avons choisi de coupler des porphyrines à des motifs glycosamines afin d'améliorer leur solubilité, leur durée de vie plasmatique et de tester leur affinité pour les récepteurs aux sucres, de type lectine, exprimés par certaines souches cancéreuses.

La synthèse de plusieurs porphyrines tétraglycosylées a été effectuée avec succès. Afin de modifier la balance hydrophyle/hydrophobe de ces composés, nous avons utilisé des motifs glucosamines simples, méthylés ou acétylés. Nous avons ensuite étudié leurs principales caractéristiques photophysiques afin de vérifier l'impact du couplage sur celles-ci. Cela nous a permis de prouver que la glycosylation modifiait très peu les propriétés photophysiques des porphyrines. De plus, dans le cas du composé tétraglycosylé, une légère augmentation du transfert d'énergie lumineuse pour la production d'oxygène singulet a été observée.

Par la suite, l'incorporation intracellulaire des photosensibilisants a été mesurée sur des cellules d'adénocarcinome colique (HT29). Tous les composés glycosylés ont présenté un meilleur taux d'incorporation intracellulaire que notre porphyrine témoin, la TPP. Suite aux publications, des essais de cytotoxicité à l'obscurité et en présence de lumière ont été effectués. Malheureusement, ces essais n'ont pas été concluants, car aucun des composés glycosylés n'a montré l'efficacité photodynamique attendue, contrairement à la TPP.

Cela nous a conduit à revoir notre approche concernant la vectorisation *via* le motif glucosamine. Nous avons conservé le motif glucosamine acétylé, qui montrait le plus fort potentiel dans cette étude, et avons choisi de synthétiser et de tester des composés asymétriques possédant des propriétés amphiphiles, favorisant ainsi l'incorporation intracellulaire des porphyrines.

Nos résultats démontrent que la glycoconjugaison permet de modifier aisément certaines propriétés physicochimiques, telles que l'hydrophilie et

l'hydrophobie ou encore la solubilité de cycles tétrapyrroliques. Ces caractéristiques sont, comme nous l'avons déjà vu, essentielles afin d'obtenir un effet photodynamique important. En effet, le nombre de résidus glycosylés, et l'asymétrie de la molécule, semblent jouer un rôle central dans l'augmentation du taux d'incorporation intracellulaire (jusqu'à 11 fois plus que notre témoin, la TPP) des photosensibilisants ainsi modifiés.

Dans un premier temps, nous avons pu corrélérer l'incorporation intracellulaire de ces composés à leur amphiphilie, *via* leur comportement migratoire en HPLC. Ce phénomène a entraîné, dans un deuxième temps, une plus grande efficacité photodynamique. En effet, les mesures de cytotoxicité cellulaire en présence de lumière sur les cellules issues d'adénocarcinome colique (HT29) ont montré que les cellules étaient beaucoup plus sensibles aux composés glycosylés. De plus, nous avons observé une meilleure efficacité photodynamique avec les composés asymétriques, monoglycosylés. Comme attendu, la réduction d'une double liaison du cycle tétrapyrrolique (soit l'utilisation de chlorines) diminue également la DL₅₀ (Dose de lumière induisant 50% de mort cellulaire).

Les expériences de microscopie confocale ont montré que l'une des raisons de la faible efficacité photodynamique de la TPP, dans nos conditions expérimentales, était certainement une agrégation intra ou extracellulaire trop importante. Ce phénomène n'a pas été observé lors des expériences impliquant les composés glycosylés. De plus, l'utilisation de sondes marquant spécifiquement les principaux organites intracellulaires, tels que le réticulum endoplasmique, les lysosomes ou encore les mitochondries, montre une incorporation intracellulaire massive, essentiellement au niveau du réticulum endoplasmique. Cette étude nous a donc permis de synthétiser de nouvelles porphyrines et chlorines glycosylées ayant les caractéristiques requises (*in vitro*) pour une utilisation en thérapie photodynamique.

Partie III

Etude de composés liés au peptide RGD pour des applications en thérapie photodynamique

1 Contexte de l'étude

Toujours dans l'optique d'augmenter la spécificité et l'élimination rapide des photosensibilisants, nous nous sommes intéressés au couplage de peptides de type RGD possédant des propriétés anti-angiogéniques, une des cibles thérapeutiques pour le traitement du cancer ^[109, 110].

Rappelons que ces peptides sont reconnus d'une manière très spécifique par l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ^[128] et que chaque souche cancéreuse possède un « pattern » particulier d'expression des intégrines. L'intérêt pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ provient du fait qu'elle est surexprimée par les cellules endothéliales, impliquées dans la néo-vascularisation, et par de nombreuses lignées tumorales ^[136], comme nous l'avons déjà vu dans la première partie.

Cette approche a été utilisée par l'équipe d'Allen qui a considéré des phthalocyanines couplées à des protéines de type 2 de la capsid d'adénovirus *via* un bras espaceur de type acide caproïque ^[151]. Ces protéines ont une forte affinité pour les intégrines de certains cancers (cellules de poumon par exemple), grâce à plusieurs répétitions (cinq ou six) de la séquence -RGD-. Certains de ces photosensibilisants ont montré une plus grande affinité, *in vitro*, pour les souches cellulaires exprimant les intégrines et a permis de diminuer les doses de photosensibilisants nécessaires à une cure complète de tumeurs greffées sur des souris Balb/c. Plus récemment, une approche similaire, utilisant un pentapeptide cyclisé par métathèse a été publiée ^[183].

2 Objectif

L'idée est de potentialiser l'effet photodynamique en induisant une hypoxie au niveau tumoral. Pour ce faire, nous avons couplé des porphyrines et des chlorines à des peptides linéaires ou cycliques, de type -RGD-, *via* une synthèse sur support solide.

3 Résultats

Nous avons reporté la synthèse et étudié les propriétés photophysiques (absorption, fluorescence, rendements quantiques de formation d'oxygène singulet) de nouvelles porphyrines et chlorines couplées au motif -RGD-. Nous avons également évalué leurs propriétés photocytotoxiques sur deux lignées cellulaires possédant divers taux d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. L'évaluation de l'efficacité thérapeutique anti-angiogénique a été effectuée sur des cellules endothéliales issues de la veine de cordon ombilical humain (HUVEC). Concernant l'approche directe, c'est-à-dire la destruction des cellules tumorales par le photosensibilisant, nous avons utilisé la seule lignée qui, à notre connaissance, n'exprime pas l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, il s'agit de cellules issues de tumeurs mammaires murines, les EMT6. Nous avons donc utilisé cette lignée comme témoin négatif, afin d'évaluer la spécificité de la vectorisation *via* -RGD-.

Les résultats de cette étude sont soumis dans la publication : *Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity* ^[192]

4 Conclusion

Dans cette partie du travail, nous avons étudié des composés greffés avec un motif peptidique de type H-Arg-Gly-Asp-OH, connu comme étant un des motifs de reconnaissance spécifique des intégrines qui sont surexprimées sur certains types tumoraux et les néo-vaisseaux, permettant une double approche thérapeutique, directe et indirecte.

Nous avons présenté la synthèse du précurseur, effectuée en phase liquide, suivie du greffage au peptide réalisée sur support solide. Dans cette étude, deux peptides ont été sélectionnés. Le tripeptide linéaire H-Arg-Gly-Asp-OH a été sélectionné car il s'agit du motif de base reconnu par les intégrines. De plus, nous avons couplé le même précurseur tétrapyrrolique au pentapeptide cyclique c[Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys]. En effet, comme nous l'avons déjà vu, la contrainte imposée par la cyclisation améliore fortement la spécificité de reconnaissance par les intégrines $\alpha_v\beta_3$.

Etude de composés liés au peptide RGD pour des applications en
thérapie photodynamique

Bien que leurs propriétés photophysiques (production d'oxygène singulet, essentiellement) soient inférieures à la moyenne des composés de type TPP, ces composés présentent une activité photodynamique intéressante *in vitro*. En effet, nous avons observé une amélioration du taux d'incorporation intracellulaire très significative sur les différentes lignées tumorales testées. Il y a une différence notable entre les lignées cancéreuses (de statut $\alpha_v\beta_3$ différent) testées, quel que soit le peptide. Malgré tout, nos résultats semblent démontrer que le peptide RGD, fixé de cette manière au photosensibilisant, n'adresse pas ce dernier uniquement *via* les intégrines mais également par des voies aspécifiques.

Par contre, ces composés montrent un effet photodynamique plus important sur les cellules endothéliales. Leur efficacité semble liée à une augmentation de l'incorporation intracellulaire *via* des mécanismes spécifiques et non spécifiques, tout comme pour les composés glycosylés présentés précédemment. Malgré tout, nos résultats démontrent que nos composés sont très efficaces, quelle que soit la lignée testée. Ils peuvent donc être utilisés dans une approche visant à potentialiser les effets directs et indirects de la PDT, *in vivo*.

Partie IV

Etude photophysique de nouveaux composés pour des applications en thérapie photodynamique

1 Contexte de l'étude

Une des étapes fondamentales lors de l'étude de photosensibilisants consiste à comparer leurs caractéristiques photophysiques à celle de composés connus. Comme nous l'avons déjà vu précédemment, un bon photosensibilisant doit posséder plusieurs caractéristiques photophysiques avant d'envisager une application thérapeutique ou de l'utiliser comme composé modèle afin d'étudier les aspects théoriques et instrumentaux de la PDT. En particulier, il y a production, *via* un transfert d'énergie, d'oxygène dans sa forme singulet, forme très réactive et très phototoxique. Il était donc nécessaire, dans cette partie spectroscopique, d'établir les caractéristiques de l'état triplet des molécules étudiées afin d'évaluer leur efficacité clinique. Pour atteindre les temps de vie des états triplets des photosensibilisants et les rendements quantiques de transfert d'énergie à l'oxygène, nous avons eu recours à des techniques photophysiques spécifiques (spectroscopie d'émission et d'absorption résolues dans le temps notamment), techniques disponibles à l'Institute of Molecular chemistry de l'Université d'Amsterdam et mises à disposition par le Docteur Albert Manfred Brouwer.

2 Objectif

Le but de cette étude est de mieux caractériser différents photosensibilisants avant d'envisager une application pratique en PDT. En effet, l'effet curatif de la PDT est uniquement dû à l'interaction entre la lumière visible et un photosensibilisant et il est maintenant généralement admis que l'oxygène singulet est l'espèce réactive qui joue un rôle majeur en PDT.

Selon le procédé de transfert d'énergie d'excitation de type II, le photosensibilisant à l'état triplet interagit avec l'oxygène moléculaire qui est également à l'état fondamental triplet. Les réactions de type II conduisent à la formation d'oxygène singulet. Ce dernier oxyde alors d'importantes biomolécules cellulaires produisant ainsi des dommages cellulaires létaux au niveau des tissus tumoraux.

Pour une application en PDT, l'état triplet du photosensibilisant doit posséder une énergie suffisante (\geq à 94 kJ mol^{-1}) afin d'interagir avec l'oxygène à l'état fondamental. Le taux de conversion intersystème menant à l'état triplet du photosensibilisant doit être élevé et la durée de vie de cette espèce doit être

longue afin de favoriser le transfert d'énergie vers l'oxygène moléculaire. Cette dernière caractéristique est essentielle pour obtenir de bons rendements de formation d'oxygène singulet. De plus, l'utilisation de lumière rouge en PDT due à l'absorption caractéristique des tissus humains requiert l'utilisation de composés possédant une forte absorption au-delà de 650 nm.

Dans cette partie du travail, nous avons mesuré les caractéristiques photophysiques importantes de 11 photosensibilisants dont la majeure partie a été synthétisée par l'équipe roumaine du Dr R.M. Ion de l'ICECHIM, à Bucarest. Seront donc abordés successivement :

- L'étude de l'état singulet (absorbance et fluorescence)
- Le rendement quantique de formation d'oxygène singulet
- L'étude de la durée de vie de l'état triplet

3 Matériels et méthodes

3.1 Composés étudiés

Les photosensibilisants utilisés lors de cette étude sont des dérivés métallés de la tétra-naphtalo-porphyrine (TNP), de la tétra-méthoxyphényl-porphyrine (TMPP) et de la TPP. La structure de ces composés est présentée dans la figure 57.

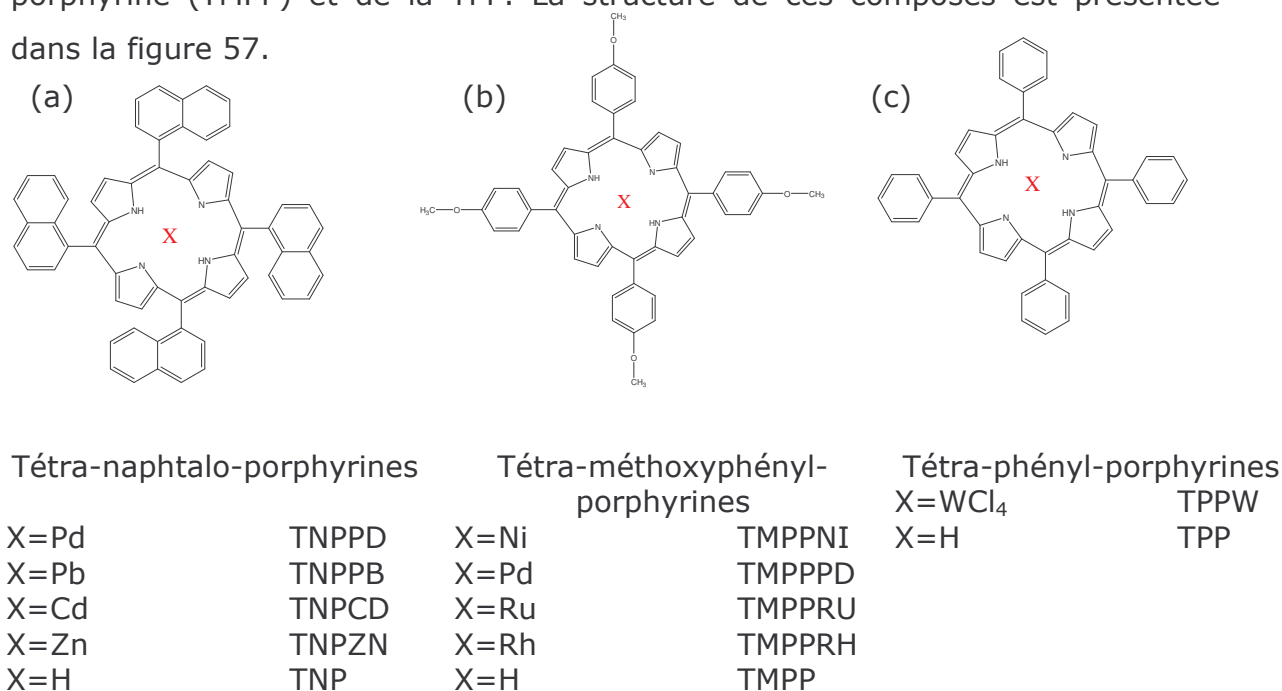


Figure 57 : Structure des dérivés de la TNP (a), de la TMPP (b) et de la TPP (c)

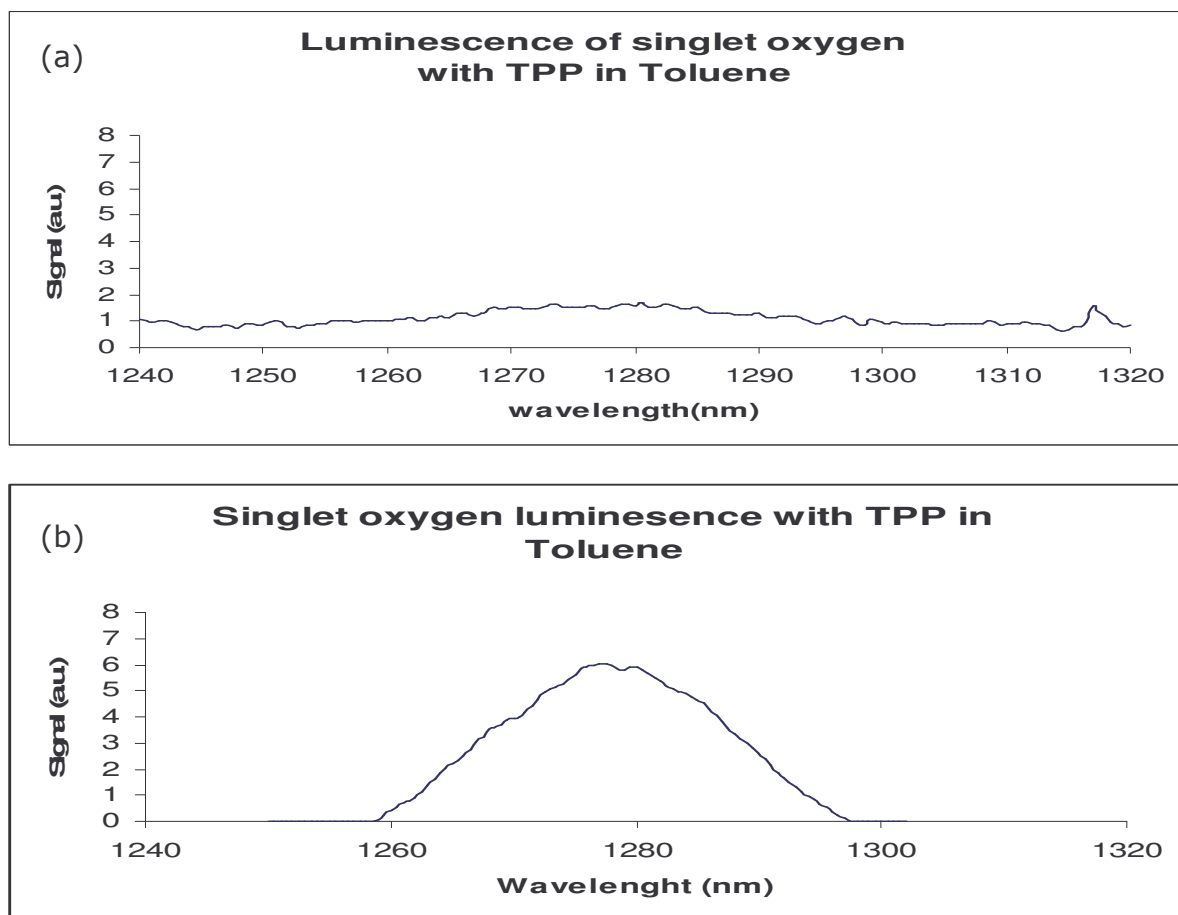


Figure 58 : Spectres bruts obtenus avant (a) et après (b) amélioration des conditions expérimentales

Brièvement, les photosensibilisants étudiés ont été excités à l'aide d'une lampe Xénon à arc placée sur un SPEX 1680 possédant un double monochromateur de 0,22 μm . La luminescence de l'oxygène singulet 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 refroidit à l'azote liquide (modèle EO-817L). La TPP a, à nouveau, été utilisée comme molécule de référence afin de calculer les rendements quantiques de formation d'oxygène singulet $\Phi^1\text{O}_2$. L'absorbance de la TPP ainsi que celle des composés étudiés a été maintenue proche de 0,2 ($\pm 10\%$) et ce, quelle que soit la longueur d'onde d'excitation utilisée. Les composés de type porphyrine ont été excités dans la bande de Soret (afin de minimiser les inconvénients dus aux problèmes d'agrégation).

3.2.4 Détermination de la durée de vie de l'état triplet (τ)

Les expériences de photolyse laser (permettant de déterminer τ , la durée de vie de l'état triplet) ont été réalisées à 275 K à l'aide d'un laser YAG Coherent Infinity équipé d'un oscillateur optique paramétrique (OPO). La durée et l'énergie de l'impulsion étant respectivement de 5 ns et 4 mJ. L'aire de la surface illuminée était de 0,1 cm². Afin de mesurer les changements de spectre d'absorption, nous avons utilisé une lampe Xénon flash basse pression (G FX 504) permettant une illumination de l'échantillon à un angle de 90° par rapport au rayon laser. La lumière reçue a ensuite été dirigée, *via* un spectrographe (Acton Research Spectra pro 150) vers une caméra CCD intensifiée (ICCD-576-G/RB-EM de Princeton Instrument) dont la largeur de fenêtre temporelle est de 5 ns. Les composés étudiés ont été excités à 515 nm, dans la bande Q_{IV}, à cause d'un trou dans le spectre d'utilisation du laser YAG Coherent Infinity entre 400 nm et 435 nm (soit dans la bande de Soret). La durée de vie de l'état triplet a été mesurée dans des solutions de DMSO saturées, ou non, en argon.

4 Résultats et discussion

4.1 Détermination des coefficients d'extinction moléculaires et des rendements quantiques de fluorescence

Les résultats concernant l'absorption UV-Visible sont résumés dans le tableau 1 et ceux obtenus en fluorescence dans le tableau 2. Les spectres normalisés sont présentés sur la figure 59.

Etude photophysique de nouveaux composés pour des applications en
thérapie photodynamique

Tableau 1 : Principales caractéristiques d'absorption UV-Visible des composés étudiés dans l'éthanol

Composés	$\lambda_{\text{Soret}} (\alpha)$ $\epsilon (e^{-3})$	$\lambda_{\text{QIV}} (\beta)$ $\epsilon (e^{-3})$	λ_{QIII} $\epsilon (e^{-3})$	λ_{QII} $\epsilon (e^{-4})$	λ_{QI} $\epsilon (e^{-3})$
TMPP	417 / 153	515 / 15,6	585 / 3,8	N.D.	652 / 3
TMPPNI	417 / 14,5	540 / 8,1	N.A.	N.A.	N.A.
TNPPPD	417/ 127,4	524 / 10,9	N.A.	N.A.	N.A.
TNPPRH	423 / 66,2	535 / 7	571 / 4,2	N.D.	N.D.
TNPPRU	417 / 59,1	516 / 4,1	552 / 3,2	592 / 2,6	650 / 2,5
TNP	419 / 75,5	514 / 8,6	588 / 4,4	N.D.	654 / 3,4
TNPCD	430 / 1000	569 / 69,3	610 / 38,3	N.D.	N.D.
TNPPB	420 / 19	470 / 11,6	548 / 1,8	650 / 1,7	N.D.
TNPPD	419 / 35	518 / 7	N.A.	N.A.	N.A.
TNPZN	427 / 79	558 / 4,9	586 / 2,4	614 / 2	N.D.
TPPW	413 / 174	511 / 9,1	545 / 4,5	589 / 4	645 / 3,1

Il est à noter que les différents substituants latéraux des photosensibilisants influencent peu les propriétés d'absorption des composés, contrairement à la présence de métaux, sauf dans le cas du tungstène. Concernant la bande de

Etude photophysique de nouveaux composés pour des applications en
thérapie photodynamique

Soret, on observe majoritairement un décalage de l'absorption vers le rouge. On observe également la disparition de la bande Q_T pour tous les composés métallés, à l'exception du ruthénium et, à nouveau, du tungstène. Les autres bandes d'absorption, lorsqu'elles existent, sont pratiquement identiques à celles des composés non métallés, avec, dans le cas du cadmium, un fort effet hyperchrome à 430 nm. De plus, on peut observer que l'influence du palladium est fortement dépendante du photosensibilisant utilisé

Tableau 2 : Rendements quantiques de fluorescence des composés étudiés dans l'éthanol

Composés	λ Fluorescence	% Φ Fluorescence
TMPP	655 / 718	$7,1 \pm 0,5$
TMPPNI	656	$0,23 \pm 0,05$
TNPPPD	615 / 655	$0,36 \pm 0,03$
TNPPRH	653 / 718	$1,0 \pm 0,3$
TNPPRU	654 / 717	$8,8 \pm 0,5$
TNP	652 / 714	$6,9 \pm 0,4$
TNPCD	621 / 652	$1,13 \pm 0,06$
TNPPB	653 / 714	$5,0 \pm 0,04$
TNPPD	653 / 714	$4,1 \pm 0,1$
TNPZN	600 / 655	$6,2 \pm 0,3$
TPPW	646 / 714	$3,6 \pm 0,3$

On observe la présence de deux bandes d'émission de fluorescence entre 600 et 750 nm, sauf dans le cas du nickel. Ce dernier, ainsi que le ruthénium, le cadmium et, dans un cas, le palladium inhibent fortement la fluorescence.

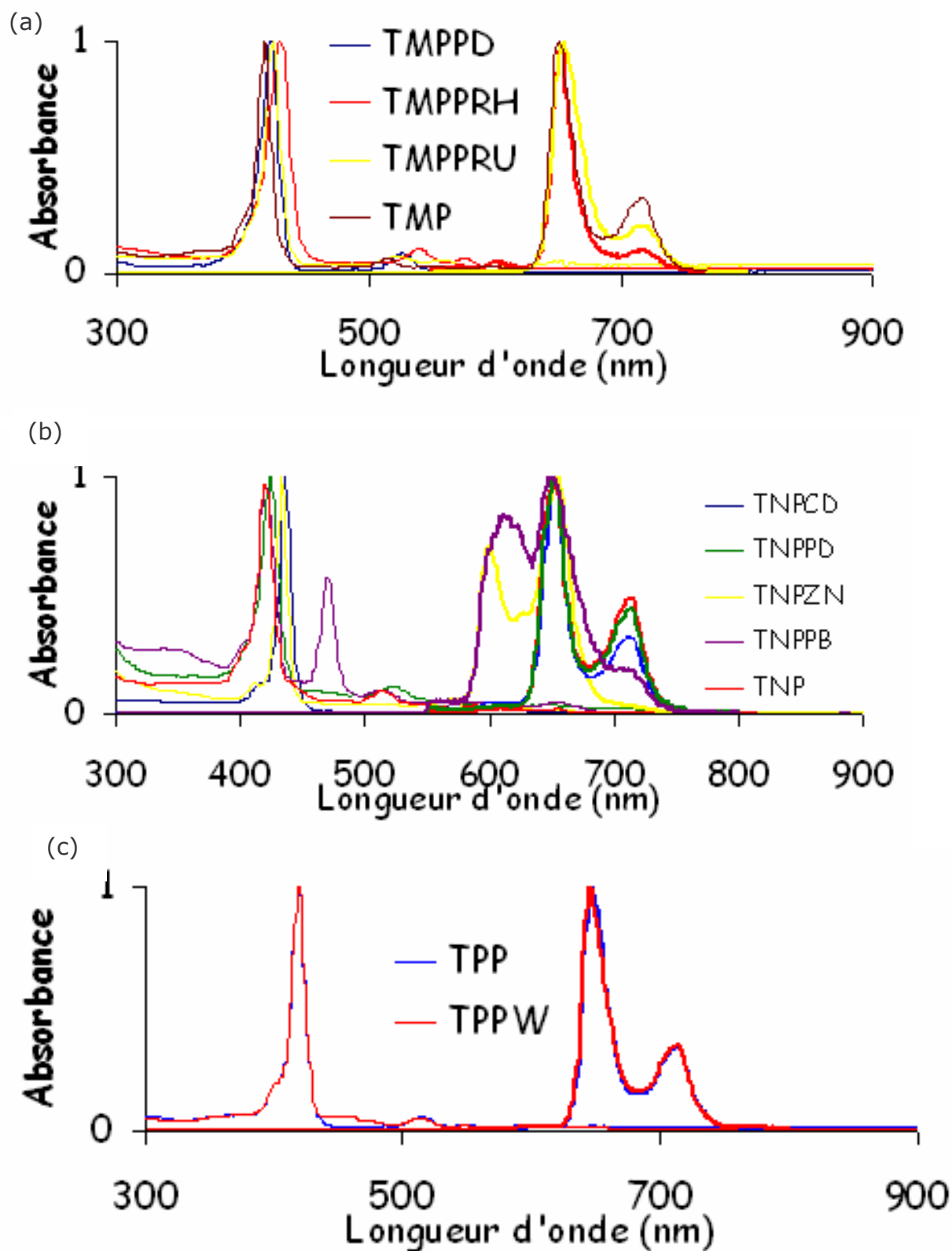


Figure 59 : Spectres d'absorption et de fluorescence des composés étudiés dans l'éthanol. Dérivés de la TMPP (a), de la TNP (b) et de la TPP (c)

4.2 Détermination des rendements quantiques de formation d'oxygène singulet (Φ^1O_2)

Les résultats obtenus dans le toluène sont résumés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Rendements quantiques de formation d'oxygène singulet (Φ^1O_2) dans le toluène

Composés	$\Phi\Delta^1O_2$
TMPP	Non détecté
TMPPNI	Non détecté
TNPPPD	0,79 \pm 0,22
TNPPRH	0,40 \pm 0,06
TNPPRU	0,60 \pm 0,27
TNP	0,50 \pm 0,02
TNPCD	0,77 \pm 0,06
TNPPB	0,43 \pm 0,05
TNPPD	0,63 \pm 0,05
TNPZN	0,28 \pm 0,03
TPP	0,69
TPPW	0,54 \pm 0,04

La majorité des composés étudiés ont un rendement de formation d'oxygène singulet proche de 0,5 bien que pour certains composés, aucune luminescence n'ait été détectée. Afin d'éviter les problèmes de *photobleaching* et d'agrégation et ainsi obtenir des résultats reproductibles et fiables nous avons dû utiliser le toluène (bien qu'il soit également possible de travailler dans le chloroforme). Le toluène permet l'étude des composés très hydrophobes. Afin d'éviter les problèmes d'agrégation, nous avons utilisé des solutions à une concentration de l'ordre de 10^{-6} M et pour les problèmes de *photobleaching*, nous avons veillé à utiliser la quantité minimale requise de lumière. Cela a nécessité d'augmenter significativement la sensibilité du montage instrumental par rapport aux résultats présentés dans la publication ^[191]. Un exemple des résultats obtenus avant et après l'amélioration des paramètres instrumentaux est présenté ci-après.

4.3 Limite de la méthode utilisée

La reproductibilité de la technique utilisée, un SPEX 1680 couplé à un détecteur IR (modèle EO-817L) refroidit à l'azote liquide, est extrêmement dépendante du détecteur ainsi que des solutions utilisées. En effet, comme nous l'avons déjà mentionné, il est nécessaire d'utiliser des concentrations très faibles en photosensibilisant afin de limiter le phénomène d'agrégation. Cela implique d'augmenter la sensibilité du détecteur. Pour se faire, il est nécessaire d'augmenter considérablement le refroidissement de ce dernier. D'un autre côté, l'utilisation d'azote liquide perturbe le système et il est nécessaire d'attendre que le détecteur se stabilise car les microbulles de gaz créent un bruit artificiel. En respectant un temps de stabilisation avant et entre chaque mesure il a été possible d'améliorer la sensibilité de la technique d'un facteur 20 en comparaison avec les mesures effectuées précédemment. Cela nous a permis d'étudier les composés dans des conditions où les phénomènes d'agrégation sont minimisés.

4.4 Détermination de la durée de vie de l'état triplet (τ) et de la constante de quenching K_q

Tous les résultats présentés dans cette partie ont été effectués dans le DMSO. En effet, cette technique nécessite d'utiliser des solutions dont l'absorbance est proche de 0,5 et, seul le DMSO permet d'éviter l'agrégation à de telles concentrations. De plus, les études conduites dans le chloroforme et le toluène ont systématiquement conduit à la formation de photoproduits absorbant dans la même zone que l'état triplet. Afin de calculer la constante de quenching (K_q) de l'état triplet par l'oxygène, les expériences ont été menées dans des solutions aérées ou saturées d'argon. La constante de quenching de chaque photosensibilisant a été déterminée via la relation linéaire de Stern Volmer :

$$1/\tau_T = K_q [O_2] + 1/\tau_0$$

avec τ_T la durée de vie de l'état triplet en présence d'oxygène, τ_0 la durée de vie de l'état triplet en absence d'oxygène et K_q la constante d'inhibition (ou de quenching).

Les résultats sont résumés dans le tableau 4.

Etude photophysique de nouveaux composés pour des applications en
thérapie photodynamique

Tableau 4 : Durée de vie de l'état triplet (τ) en présence et en absence d'oxygène et constante de quenching K_q

Composés	τ triplet en solution équilibrée à l'air (ns)	τ triplet en solution saturée en argon (μ s)	K_q (e^{-6}) ($L.mol^{-1}.s^{-1}$)
TMPP	N.D.	N.D.	N.D.
TMPPNI	N.D.	N.D.	N.D.
TNPPPD	1100 ± 50	50 ± 7	108
TNPPRH	1530 ± 90	29 ± 4	73
TNPPRU	1150 ± 70	86 ± 10	104
TNP	1700 ± 100	500 ± 50	68
TNPCD	1550 ± 120	63 ± 7	76
TNPPB	N.D.	N.D.	N.D.
TNPPD	1200 ± 100	20 ± 1	91
TNPZN	2400 ± 210	29 ± 2	44
TPP	1450 ± 80	66 ± 12	83
TPPW	1060 ± 70	120 ± 17	116

Comme attendus, les durées de vie de l'état triplet sont de l'ordre de la microseconde en présence d'oxygène et de l'ordre de la seconde en solution saturée en argon. Dans nos conditions expérimentales, nous n'avons pu détecter de formation de l'état triplet pour la TMPP, TMPPNI et TNPPB. Les constantes de quenching sont similaires pour tous les autres composés.

La figure 62 présente un exemple typique de formation du triplet d'une porphyrine dans le DMSO entre 435 nm et 505 nm.

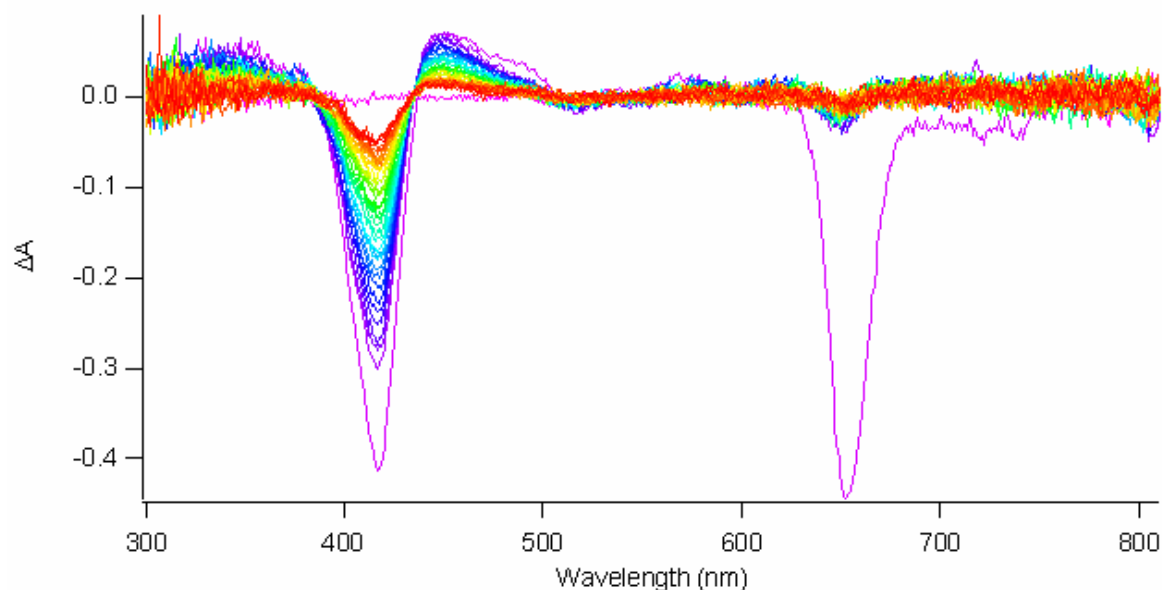


Figure 62 : Formation du triplet de la TPP dans le DMSO et en absence d'oxygène entre 435 nm et 505 nm (λ_{exc} : 515 nm, Incrément: 50 ns)

5 Conclusion

Les principales propriétés photophysiques de 11 nouvelles métallo-porphyrines ont été mesurées (absorption, fluorescence, production d'oxygène singulet et durée de vie de l'état triplet).

Nous avons constaté que :

- Le cadmium de TNPCD augmente fortement les propriétés d'absorption (13 fois) et la formation d'oxygène singulet (0,77) de la porphyrine.
- Le palladium améliore le transfert d'énergie vers l'oxygène dans TNPPD et TMPPPD (respectivement Φ^1O_2 de 0,63 et 0,79).
- Les durées de vie triplet de TNP (500 μ s) et de TMPPRU (86 μ s) en absence d'oxygène sont exceptionnellement longues.
- Le zinc, quant à lui, diminue Φ^1O_2 de 50%. Le nickel empêche toute formation d'oxygène singulet, ce qui est certainement dû à l'impossibilité de passer à l'état triplet.
- Le ruthénium et le tungstène n'ont pas d'impact sur la formation d'oxygène singulet.

Etude photophysique de nouveaux composés pour des applications en
thérapie photodynamique

Ces composés peuvent être utilisés comme modèles de référence pour l'étude des principales caractéristiques photophysiques de futurs composés métallés.

Nous avons également clairement établi que ces techniques d'études des propriétés photophysiques des photosensibilisants trouvent leur place lors de l'évaluation préliminaire de l'activité photodynamique de nouveaux composés avant une exploration plus poussée *in vitro*.

Conclusion Générale & Perspectives

En conclusion de notre travail et grâce aux expertises complémentaires des différents laboratoires impliqués dans cette étude, des composés glycosylés efficaces ont été synthétisés. Dans un premier temps, leurs principales caractéristiques photophysiques ont été mesurées (absorbance, rendements quantiques de fluorescence, rendements quantiques de formation d'oxygène singulet et durée de vie de l'état triplet), afin de vérifier l'impact du couplage d'un ou de plusieurs motifs glucosamines sur celles-ci. Nous avons démontré que le couplage n'induisait pas de modifications importantes à ce niveau. Ensuite, nous avons testé leur efficacité photodynamique *in vitro* sur des cellules HT29. Nous avons observé une augmentation de l'incorporation cellulaire de ces composés, en comparaison avec notre photosensibilisant témoin, la TPP. Il semble que seules les modifications des propriétés physico-chimiques des porphyrines glycosylées, induisant une variation de la balance hydrophile/hydrophobe, soient responsables de ce phénomène. Cela a également permis d'augmenter leur phototoxicité qui reste, malgré tout, faible en comparaison avec d'autres photosensibilisants existants sur le marché, telle que la *m*-THPC, par exemple.

Par la suite, les composés liés au peptide RGD linéaire ont été étudiés (méthode de synthèse originale et étude photophysique). Ils présentent une activité photodynamique intéressante *in vitro* bien que leurs propriétés photophysiques (production d'oxygène singulet, essentiellement) soient, contrairement à précédemment, inférieures à la moyenne des composés de type TPP. Cela est néanmoins compensé par une forte amélioration de l'incorporation cellulaire. Malheureusement, nous n'avons pas observé de différence notable entre les lignées de statut $\alpha_v\beta_3$ différent testées. Il semblerait que le peptide RGD, fixé de cette manière au photosensibilisant, n'adresse pas ce dernier *via* les intégrines. C'est pourquoi nous nous sommes ensuite intéressés au couplage d'un pentapeptide cyclique possédant le motif RGD, car il a été démontré que la contrainte imposée par la cyclisation permet d'améliorer la reconnaissance de ce dernier par les intégrines. A nouveau, aucune spécificité d'incorporation n'a pu être observée, dans nos conditions expérimentales. Malgré tout, ce dernier composé semble extrêmement efficace sur les cellules endothéliales, grâce à l'amélioration de ses caractéristiques physiques (augmentation de l'absorption

dans le rouge) d'une part, et grâce à un fort taux d'incorporation intracellulaire, d'autre part.

Enfin, dans le cadre d'un projet Européen, une étude photophysique complète a été menée sur de nombreux composés synthétisés par l'équipe roumaine du Docteur R. Ion, permettant de déterminer certains paramètres photophysiques clés afin d'effectuer une pré-sélection des composés possédant les caractéristiques adéquates pour des applications en thérapie photodynamique. Ce projet a également permis d'obtenir l'expertise nécessaire à l'installation et à la validation de nouveaux dispositifs de détection de signaux lumineux au DCPR, une étape décisive pour l'avancée des futurs travaux de recherche dans ce domaine au laboratoire. En effet, une lampe pulsée nF900 couplée à une photodiode à avalanche ont été acquises par le laboratoire. Ce dispositif permet une excitation dans une zone de 200 à 800 nm et une détection dans le rouge et le proche infra-rouge en comptage monophotonique, permettant de mesurer une large gamme de durées de vie de fluorescence dans le rouge, et ainsi de mieux caractériser les futurs composants synthétisés par l'équipe.

Sur un plan plus général pour la PDT, la diversité des caractéristiques cellulaires mènera sans doute un jour à la découverte de médicaments ciblés et des mécanismes d'adressage. Actuellement, la recherche continue dans sa quête de la « magic bullet ». Malgré tout, il semble qu'une approche moins générale soit plus réaliste. Chaque type de maladie, ou de cancer, doit être ciblé individuellement.

La thérapie photodynamique n'échappe pas à ce phénomène. En effet, le développement de cette technique passe par la destruction ciblée de tous les types cellulaires et tissulaires, et a donc besoin de photosensibilisants couplés à des motifs divers. En plus d'utiliser le photosensibilisant idéal couplé au bon motif pour chaque maladie particulière, il existe des contraintes propres à la PDT. En effet, les premiers photosensibilisants synthétisés avaient tendance à créer de fortes interactions entre photosensibilisants ainsi que des complexes non covalents avec certaines protéines plasmatiques. Malgré des avancées certaines, ce phénomène d'agrégation complique la séparation des composés couplés, de manière covalente au vecteur, des composés non couplés, et donc la purification. La présence de ces composés non couplés va directement affecter les résultats

biologiques obtenus. Comme nous l'avons signalé, l'agrégation va également affecter les propriétés photophysiques des photosensibilisants. La production des ROS, et donc l'efficacité thérapeutique, va être impactée négativement par la diminution, entre autres, des coefficients d'extinction molaire et des rendements quantiques de formation d'oxygène singulet.

De plus, comme nous l'avons également signalé, l'accumulation intracellulaire du photosensibilisant est également une composante essentielle. Cela peut expliquer pourquoi un composé vectorisé est moins efficace que le même composé non conjugué, alors que le taux d'incorporation intracellulaire de ce dernier est plus faible.

Enfin, bien que la PDT utilisant des composés vectorisés soit surtout utilisée dans le traitement des cancers, d'autres techniques vont sans doute en bénéficier, comme le traitement de la DMLA, de certaines maladies bactériennes ou auto-immunes. Il reste à trouver le bon système photosensibilisant/vecteur ainsi que la bonne modalité de traitement pour chaque pathologie pour que la PDT démontre enfin tout le potentiel qu'elle a laissé entrevoir il y a maintenant plus d'un siècle.

En termes de perspectives, à l'issue de ce travail, deux voies complémentaires de recherche vont être mises en œuvre :

- Des expériences de microscopie confocale sur les composés liés au peptide RGD, linéaire et cyclique vont être initiées prochainement afin de déterminer leur localisation intracellulaire et valider le mode d'incorporation intracellulaire des composés ainsi vectorisés.

- Des expériences *in vivo* pourront également être réalisées sur des modèles tumoraux richement vascularisés, afin d'étudier la possibilité d'obtenir une destruction tumorale directe et/ou indirecte, conséquence de l'hypoxie induite par la destruction de la néo-vascularisation tumorale.

Bibliographie

- [¹] M.J. Imbault-Huart ; Histoire du cancer, ED. Histoire, 1985, 74-77.
- [²] J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, D.M. Parkin ; Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide, GLOBOCAN 2002. IARC Cancer Base, IARC Press Lyon, 2004.
- [³] Rapport de la commission d'orientation sur le cancer 2003.
- [⁴] D. Hanahan, R.A. Weinberg ; The hallmarks of cancer. Cell, 2000, 100, 57-70.
- [⁵] A.W. Griffioen, G. Molema ; Angiogenesis : potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. Pharmacol. Rev. 2000, 52, 237-268.
- [⁶] M. Ochsner ; Photodynamic therapy : the clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous. Arzneimittelforschung, 1997, 47(11), 1185-1194.
- [⁷] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, O. Peng ; Photodynamic therapy. J. Natl Cancer Inst., 1998, 90(12), 889-905.
- [⁸] R.A. Hsi, D.I. Rosenthal, E. Glatstein ; Photodynamic therapy in the treatment of cancer : current state of the art. Drugs, 1999, 57(5), 725-734.
- [⁹] J.D. Spikes ; The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences ; dans Primary Photoprocesses in Biology and Medicine (Edité par R.V. Bergasson, G. Jori, E.J. Land et T.G. Truscott), Plenum Press, New York, 1985, 209-227.
- [¹⁰] O. Raab ; Uber die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien. Z. Biol., 1900, 39, 524-546.
- [¹¹] H. Tappeiner, A. Jesoniek ; Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. Muench. Med. Wochenscher, 1903, 1, 2042-2044.

[12] W. Hausmann ; Die sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. *Biochem. Z.*, 1911, 30, 276–316.

[13] F. Meyer-Betz ; Untersuchungen über die Biologische (photodynamische) Wirkung des Hamatoporphyrins und anderer Derivative des Blut- und Galenfarbstoffs. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 1913, 112, 476-503.

[14] A. Policard ; Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinées à la lumière de Wood. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, 1423-1428.

[15] H. Auler, G. Banzer ; Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Z. Krebsforschung*, 1942, 53, 65-68.

[16] F.H.J. Figge, G.S. Weiland ; Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, 68, 640-641.

[17] R.L. Lipson, J. Ednard, D. Baldes, A.M. Olsen ; The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1961, 26, 1-11.

[18] J.F. Kelly, M.E. Snell, M.C. Berenbaum ; Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br. J. Cancer*, 1975, 31, 237–244.

[19] T.J. Dougherty, G.B. Grindey, R. Fiel, K.R. Weishaupt, D.G. Boyle ; Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1975, 55, 115-121.

[20] T.J. Dougherty, J.E. Kaufman, A. Goldfarb, K.R. Weishaupt, D. Boyle, A. Mittleman ; Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumours. *Cancer Res.*, 1978, 36, 2628-2635.

[21] T.J. Dougherty, W.R. Potter, K.R. Weishaupt ; The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. *Dans Porphyrin Localization and*

Treatment of Tumors (Edité par D.R. Doiron et C.J. Gomer) A.R. Liss, New York, 1984, 301-314.

[22] C.S. Foote ; Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochem. Photobiol., 1991, 54(5), 659.

[23] T. Takemura, N. Ohta, S. Nakajima, I. Sakata ; Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. Photochem. Photobiol., 1989, 50(3), 339-344.

[24] J.E. van Lier, J.D. Spikes ; The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. Ciba Found. Symp., 1989, 146, 17-32.

[25] J. Moan, K. Berg ; The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. Photochem. Photobiol., 1991, 53(4), 549-553.

[26] M. Niedre, M.S. Patterson, B.C. Wilson ; Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. Photochem. Photobiol., 2002, 75(4), 382-391.

[27] G.R. Bicknell, G.M. Cohen ; Cleavage of DNA to large Kilobase pair fragments occurs in some forms of necrosis as well as apoptosis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, 207, 40-47.

[28] A. Mignon, N. Rouquet, V. Joulin ; Les caspases, les protéases à cystéine de l'apoptose : un enjeu thérapeutique pour demain? Médecine/Sciences, 1998, 14, 9-17.

[29] Q. Peng, J. Moan, J.M. Nesland ; Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. Ultrastruct. Pathol., 1996, 20(2), 109-129.

[30] Y.J. Hsieh, C.C. Wu, C.J. Chang, J.S. Yu ; Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells

triggered by photodynamic therapy : when plasma membranes are the main targets. *J. Cell Physiol.*, 2003, 194(3), 363-75.

[31] M. Relf, S. LeJeune, P.A. Scott, S. Fox, K. Smith, R. Leek, A. Moghaddam, R. Whitehouse, R. Bicknell, A.L. Harris ; Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res.*, 1997, 57(5), 963-969.

[32] V.H. Fingar, S.W. Taber, P.S. Haydon, L.T. Harrison, S.J. Kempf, T.J. Wieman ; Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors : a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo*, 2000, 14(1), 93-100.

[33] W.J. de Vree, A.N. Fontijne-Dorsman, J.F. Koster, W. Sluiter ; Photodynamic treatment of human endothelial cells promotes the adherence of neutrophils in vitro. *Br. J. Cancer*, 1996, 73(11), 1335-1340.

[34] B.W. Henderson, J.M. Donovan ; Release of prostaglandin E2 from cells by photodynamic treatment in vitro. *Cancer Res.*, 1989, 49(24), 6896-6900.

[35] S. Herman, Y. Kalechman, U. Gafter, B. Sredni, Z. Malik ; Photofrin II induces cytokine secretion by mouse spleen cells and human peripheral mononuclear cells. *Immunopharmacology*, 1996, 31, 195-204.

[36] S.O. Gollnick, X. Liu, B. Owczarczak, D.A. Musser, B.W. Henderson ; Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy *in vivo*. *Cancer Res.*, 1997, 57(18), 3904-3909.

[37] N. Yamamoto, B.Z. Ngwenya ; Activation of mouse peritoneal macrophages by lysophospholipids and ether derivatives of neutral lipids and phospholipids. *Cancer Res.*, 1987, 47(8), 2008-2013.

[38] R. Bonnett, M. Berenbaum ; Porphyrins as photosensitizers. *Ciba. Found. Symp.*, 1989, 146, 40-59.

[39] H. Fisher, H. Orth ; *Die Chemie des Pyrrols* vol. I-II, (édité par J. Springer), Berlin, 1934-1940.

[40] K.M. Smith ; *Porphyrins and Metalloporphyrins*, Elsevier, Amsterdam, 1975, 910 p.

[41] R. Bonnett, B.D. Djelal, P.A. Hamilton, G. Martinez, F. Wierrani ; Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)porphyrin (*m*-THPP) and the corresponding chlorin (*m*-THPC) and bacteriochlorin (*m*-THPBC). A comparative study. *J. Photochem. Photobiol. B : Biology*, 1999, 53, 136-143.

[42] J.P. Rovers, M.L. de Jode, H. Rezzoug, M.F. Grahn ; In vivo photodynamic characteristics of the near-infrared photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl) bacteriochlorin. *Photochem. Photobiol.*, 2000, 72(3), 358-364.

[43] T.J. Dougherty ; Photosensitizers : therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.*, 1987, 45(6), 879-889.

[44] I. Laville, S. Pigaglio, J.C. Blais, B. Loock, P. Maillard, D.S. Grierson, J. Blais ; A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells : a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. *Bioorg. Med. Chem.*, 2004, 12, 3673-3682.

[45] P. Rothmund ; Formation of porphyrins from pyrrole and aldehydes. *J. Am. Chem. Soc.*, 1935, 57, 2010-2011.

[46] P. Rothmund, A.R. Menotti ; Porphyrin studies. IV. The synthesis of a,b,g,d-tetraphenylporphin. *J. Am. Chem. Soc.*, 1941, 63, 267-270.

[47] R.H. Ball, G.D. Dorrough, M. Calvin ; A Further Study of the Porphin-like Products of the Reaction of Benzaldehyde and Pyrrole. *J. Am. Chem. Soc.*, 1946, 68, 2278-2281.

[48] A.D. Adler, F.R. Longo, J.D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff ; A simplified synthesis for *meso*-tetraphenylporphin. *J. Org. Chem.*, 1967, 32(2), 476.

[49] R.G. Little, J.A. Anton, P.A. Loach, J. Ibers ; The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. *J. Heterocycl. Chem.*, 1975, 12(2), 343-349.

[50] A.M.A.R. Rocha Gonsalvès, M.M. Pereira ; New look into the Rothmund *meso*-tetraalkyl and tetraarylporphyrin synthesis. *J. Heterocycl. Chem.*, 1985, 22, 931-933.

[51] J.S. Lindsey, H.C. Hsu, I.C. Shreiman ; Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. *Tetrahedron Lett.*, 1986, 27(41), 4969-4970.

[52] J.S. Lindsey, S. Prathapan, T.E. Johnson, R.W. Wagner ; Porphyrin building blocks for modular construction of bioorganic model systems. *Tetrahedron*, 1994, 50(30), 8941-8968.

[53] H. Fisher, A. Stern ; *Die Chemie des Pyrrols*, 1940, vol. 2 Part 2, Akad Verlag, Leipzig.

[54] R.B. Woodward ; Total synthesis of chlorophylls. *Angew. Chem.*, 1960, 72, 651-662

[55] G.P. Arsenault, E. Bullock, S.F. MacDonald ; Pyrromethanes and porphyrins therefrom. *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, 82, 4384-4389.

[56] B.J. Littler, Y. Ciringh, J.S. Lindsey ; Investigation of conditions giving minimal scrambling in the synthesis of *trans*-porphyrins from dipyrromethanes and aldehydes. *J. Org. Chem.*, 1999, 64(8), 2864-2872.

[57] D.F. Shi, R.T. Wheelhouse ; Novel, high-yielding synthesis of *meso*-substituted porphyrins *via* the direct arylation of porphine. *Tetrahedron Letters*, 2002, 43(51), 9341-9342.

[58] R.B. Merrifield ; Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *J. Ammer. Chem. Soc.*, 1963, 85, 2149-2154.

[59] C.C. Leznoff, P.I. Svirskaya ; The synthesis of unsymmetrical tetraarylporphyrins on solid phases. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 1978, 17, 947.

[60] J.M. Montierth, A.G. Duran, S.H. Leung, K.M. Smith, N.E. Schore ; The polymer-supported MacDonald-type porphyrin synthesis : coupling of two dissimilar dipyrromethanes. *Tetrahedron Letters*, 2000, 41(39), 7423-7426.

[61] A. Treibs, N. Häberlé ; Concerning the synthesis and the electron spectrum of *ms*-substituted porphine. *Justus Liebigs Annalen der Chemie*, 1968, 718, 183-207.

[62] L.T. Nguyen, M.O. Senge, K.M. Smith ; One-pot synthesis of regiochemically pure porphyrins from two different pyrroles. *Tetrahedron Letters*, 1994, 35(41), 7581-7584.

[63] H. Fischer, H. Friedrich, W. Lamatsch, K. Morgenroth ; Porphyrin syntheses XVIII (XIX). Syntheses of coproporphyrin I and II and also mesoporphyrin II, V and XII. *Techn. Hochschule, Munchen. Ann.*, 1928, 2, 187-188.

[64] J.L. Sessler, J.W. Genge, A. Urbach, P. Sanson ; A 3+1 approach to monofunctionalized alkyl porphyrins. *Synlett.*, 1996, 2, 187-188.

[65] H. Fischer, H. Eckoldt ; Überführung von Porphyrinen in Dioxy-chlorine durch Einwirkung von Osmiumtetroxyd. *Justus Liebigs Ann. Chem.*, 1940, 552, 138.

[66] H.W. Whitlock, R. Hanauer, M.Y. Oester, B.K. Bower ; Diimide reduction of porphyrins. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1969, 91, 7485-7489.

[67] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng ; Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, 90(12), 889-905.

[68] R. Bonnett ; *Chemical Aspects of Photodynamic Therapy*. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam, 2000.

[69] T.J. Dougherty, W.R. Potter, K.R. Weishaupt ; The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 1984, 170, 301-314.

[70] T.J. Dougherty ; Photosensitization of malignant tumors. *Semin. Surg. Oncol.*, 1986, 2(1), 24-37.

[71] R.R. Anderson, J.A. Parrish ; The optics of human skin. *J. Invest. Dermatol.*, 1981, 77(1), 13-19.

[72] M.C. Berenbaum, S.L. Akande, R. Bonnett, H. Kaur, S. Ioannou, R.D. White, U.J. Winfield ; *meso*-tetra(hydroxyphenyl)porphyrins, a new class of potent tumour photosensitisers with favourable selectivity. *Br. J. Cancer*, 1986, 54(5), 717-725.

[73] R. Bonnett, R.D. White, U.J. Winfield, M.C. Berenbaum ; Hydroporphyrins of the *meso*-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem. J.*, 1989, 261(1), 277-280.

[74] S.W. Taber, V.H. Fingar, C.T. Coats, T.J. Wieman ; Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease : a Phase I clinical study. *Clin. Cancer Res.*, 1998, 4(11), 2741-2746.

[75] H. Fukuda, A. Casas, A. Batlle ; Aminolevulinic acid : from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2005, 37(2), 272-276.

[76] P. Foley ; Clinical efficacy of methyl aminolevulinate (Metvix) photodynamic therapy. *J. Dermatolog. Treat.*, 2003, 14, 15-22.

[77] A.M. Richter, E. Waterfield, A.K. Jain, E.D. Sternberg, D. Dolphin, J.G. Levy ; In vitro evaluation of phototoxic properties of four structurally related benzoporphyrin derivatives. *Photochem. Photobiol.*, 1990 , 52(3), 495-500.

[78] S.C. Lin, C.P. Lin, J.R. Feld, J.S. Duker, C.A. Puliafito ; The photodynamic occlusion of choroidal vessels using benzoporphyrin derivative. *Curr. Eye Res.*, 1994, 13(7), 513-522.

[79] B. Roeder, D. Naether, T. Lewald, M. Braune, C. Nowak, W. Freyer ; Photophysical properties and photodynamic activity in vivo of some tetrapyrroles. *Biophys. Chem.*, 1990, 35, 303-312.

[80] K. Berg, J.C. Bommer, J. Moan ; Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. A study on the relative efficiencies of photoinactivation. *Photochem. Photobiol.*, 1989, 49(5), 587-594.

[81] C. Milanesi, C. Zhou, R. Biolo, G. Jori ; Zn(II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. II. Studies on the mechanism of photosensitised tumour necrosis. *Br. J. Cancer*, 1990, 61(6), 846-850.

[82] Q. Peng, J. Moan, M. Kongshaug, J.F. Evensen, H. Anholt, C. Rimmington ; Sensitizer for photodynamic therapy of cancer : a comparison of the tissue distribution of Photofrin II and aluminum phthalocyanine tetrasulfonate in nude mice bearing a human malignant tumor. *Int. J. Cancer*, 1991, 48(2), 258-264.

[83] S.W. Young, K.W. Woodburn, M. Wright, T.D. Mody, Q. Fan, J.L. Sessler, W.C. Dow, R.A. Miller ; Lutetium texaphyrin (PCI-0123) : a near-infrared, water-soluble photosensitizer. *Photochem. Photobiol.*, 1996, 63(6), 892-897.

[84] G.M. Garbo ; Purpurins and benzochlorins as sensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1996, 34, 109-116.

[85] D. Kessel, Y. Luo, Y. Deng, C.K. Chang ; The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 1997, 65(3), 422-426.

[86] A.S. Derycke, P.A. de Witte ; Liposomes for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, 56(1), 17-30.

[87] W.M. Sharman, J.E. van Lier, C.M. Allen ; Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2004, 56(1), 53-76.

[88] C.M. Allen, W.M. Sharman, J.E. van Lier ; Photodynamic therapy: targeting cancer cells with photosensitizer-bioconjugates. Dans *Tumour Targeting in Cancer Therapy* (Edité par M. Page), Humana Press, New Jersey, 2002, 329–361.

[89] I. Rosenthal ; Phthalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.*, 1991, 859–887.

[90] Y. Niamien Konan, R. Gurny, E. Alle ´mann ; State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2002, 66, 89–106.

[91] E. Reddi ; Role of delivery vehicles for photosensitizers in the photodynamic therapy of tumors. *Photochem. Photobiol.*, 1997, 37 189–195.

[92] M.R. Hamblin, E.L. Newman ; On the mechanism of the tumor-localising effect in photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1994, 23 3–8.

[93] T.G. Gantchev, R. Ouellet, J.E. van Lier ; Binding interactions and conformational changes induced by sulfonated aluminum phthalocyanines in human serum albumin. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999, 366 21–30.

[94] C. Larroque, A. Pelegrin, J.E. van Lier ; Serum albumin as a vehicle for zinc phthalocyanine: photodynamic activities in solid tumor models. *Br. J. Cancer*, 1996, 74, 1886–1890.

[95] M.R. Hamblin, J.L. Miller, B. Ortel ; Scavenger-receptor targeted photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 2000, 72, 533–540.

[96] M.R. Hamblin, E.L. Newman ; Photosensitizer targeting in photodynamic therapy I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1994, 26, 45–46.

[97] G. Valduga, A. Pifferi, P. Taroni, G. Valentini, E. Reddi, R. Cubeddu, G. Jori ; Steady-state and time-resolved spectroscopic studies on low-density lipoprotein-bound Zn(II)-phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B*, 1999, 49, 198–203.

[98] P. Urizzi, C.M. Allen, R. Langlois, R. Ouellet, C. La Madeleine, J.E. van Lier ; Low-density lipoprotein-bound aluminum sulfophthalocyanine: targeting tumor cells for photodynamic therapy. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2000, 4, 1–7.

[99] G. Jori, E. Reddi ; The role of lipoproteins in the delivery of tumor-targeting photosensitizers. *Int. J. Biochem.*, 1993, 25, 1369–1375.

[100] P. Ponka, C. Beaumont, D.R. Richardson ; Function and regulation of transferrin and ferritin. *Semin. Hematol.*, 1998, 35 35–54.

[101] G. Zheng, H. Li, M. Zhang, S. Lund-Katz, B. Chance, J.D. Glickson ; Low-density lipoprotein reconstituted by pyropheophorbide cholesteryl oleate as target-specific photosensitizer. *Bioconjug. Chem.*, 2002, 13, 392–396.

[102] H. Ali, J.E. van Lier ; Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chem. Rev.*, 1999, 99, 2379–2450.

[103] R.W. Boyle, D. Dolphin, C.K. Johnson ; Meso-mono-iodosubstituted tetrameacrocyclic compounds and methods for making and using the same. *US Patent*, 1997, 5, 703, 230.

[104] J.A. Katzenellenbogen, B.W. O'Malley, B.S. Katzenellenbogen ; Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites

as a basis for the cell-and promoter-specific action of these hormones. *Mol. Endocrinol.*, 1996, 10, 119–131.

[105] G.M. Arstead, K.E. Carlson, J.A. Katzenellenbogen ; The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*, 1997, 62, 268–303.

[106] A.M. Brzozowski, A.C. Pike, Z. Dauter, R.E. Hubbard, T. Bonn, O. Engstrom, L. Ohman, G.L. Greene, J.A. Gustafsson, M. Carlquist ; Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 1997, 389, 752–758.

[107] D.M. Tannenbaum, Y. Wang, S.P. Williams, P.B. Sigler ; Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1998, 95, 5998– 6003.

[108] E.H. Khan, H. Ali, H. Tian, J. Rousseauf, G. Tessier, Shafiullah, J.E. van Lier ; Synthesis and biological activities of phthalocyanine-estradiol conjugates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2003, 13, 1287–1290.

[109] S.V. Lutsenko, N.B. Feldman, G.V. Finakova, G.A. Posypanova, S.E. Severin, K.G. Skryabin, M.P. Kirpichnikov, E.A. Lukyanets, G.N. Vorozhtsov ; Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates. *Tumour Biol.*, 1999, 20, 218–224.

[110] A. Gijssens, L. Missiaen, W. Merleved, P. de Witte ; Epidermal growth factor-mediated targeting of chlorin e6 selectively potentiates its photodynamic therapy. *Cancer Res.*, 2000, 60, 2197–2202.

[111] A.S. Sobolev, D.A. Jans, A.A. Rosenkranz ; Targeted intracellular delivery of photosensitizers. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2000, 73, 51–90.

[112] D. Brault, C. Vever-Bizet, K. Kuzelova ; Interactions of dicarboxylic porphyrins with membranes in relation to their ionization state. *J. Photochem. Photobiol. B.*, 1993, 20, 191-195.

- [113] I. Sylvain, R. Zerrouki, R. Granet, Y.M. Huang, J.F. Lagorce, M. Guilloton, J.C. Blais, P. Krausz ; Synthesis and biological evaluation of thioglycosylated porphyrins for an application in photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem.*, 2002, 10(1), 57-69.
- [114] R. Lotan, A. Raz ; Lectins in cancer cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1988, 551, 385-398.
- [115] M. Monsigny, C. Quetard, S. Bourgerie, D. Delay, C. Pichon, P. Midoux, R. Mayer, A.C. Roche ; Glycotargeting : the preparation of glyco-amino acids and derivatives from unprotected reducing sugars. *Biochimie*, 1998, 80(2), 99-108.
- [116] O. Gaud, R. Granet, M. Kaouadji, P. Krausz, J.C. Blais, G. Bolbach ; Synthèse et analyse structurale de nouvelles méso-arylporphyrines glycosylées en vue de l'application en photothérapie des cancers. *Can. J. Chem.*, 1996, 74, 481-499.
- [117] C.J. Gomer ; Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 1991, 54(6), 1093-1107.
- [118] D. Oulmi, P. Maillard, J.L. Guerquin-Kern, C. Huel, M. Momenteau ; Glycoconjugated porphyrins 3. Synthesis of flat amphiphilic mixed *meso*-(glycosylated-aryl)arylporphyrins and mixed *meso*-(glycosylated-aryl)alkylporphyrins bearing some monosaccharide and disaccharide groups. *J. Org. Chem.*, 1995, 60, 1554-1564.
- [119] G. Csík, E. Balog, I. Voszka, F. Tölgyesi, D. Oulmi, P. Maillard, M. Momenteau ; Glycosylated derivatives of tetraphenyl porphyrin: photophysical characterization, self-aggregation and membrane binding. *J. Photochem. Photobiol. B : Biology*, 1998, 44(3), 216-224.
- [120] I. Laville, T. Figueiredo, B. Loock, S. Pigaglio, P. Maillard, D.S. Grierson, D. Carrez, A. Croisy, J. Blais ; Synthesis, cellular internalization and

photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra(*meta*-hydroxyphenyl)chlorins. *Bioorg. Med. Chem.*, 2003, 11(8), 1643-1652.

[121] M. Momenteau, P. Maillard, M.A. de Bélinay, D. Carrez, A. Croisy ; Tetrapyrrolic glycosylated macrocycles for an application in PDT. *Biomed. Opt.*, 1999, 4, 298-318.

[122] P. Maillard, J.L. Guerquin-Kern, M. Momenteau, S. Gaspard ; Glycoconjugated tetrapyrrolic macrocycles. *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 9125-9127.

[123] A. van der Made, E.J.H. Hoppenbrouwer, R.J.M. Nolte, W. Drenth ; An improved synthesis of tetraarylporphyrins. *Recl. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1988, 107, 15-16.

[124] P. Maillard, J.L. Guerquin-Kern, C. Huel, M. Momenteau ; Glycoconjugated porphyrins. 2. Synthesis of sterically constrained polyglycosylated compounds derived from tetraphenylporphyrins. *J. Org. Chem.*, 1993, 58, 2774-2780.

[125] G.R. Geier, J.A. Riggs, J.S. Lindsey ; Investigation of Acid Cocatalysis in Syntheses of Tetraphenylporphyrin. *J. Porph. Phthal.*, 2001, 5, 681-690.

[126] P. Maillard, C. Huel, M. Momenteau ; Synthesis of new *meso*-tetrakis(glycosylated) porphyrins. *Tetrahedron Letters*, 1992, 33, 8081-8084.

[127] R.G. Little ; The Synthesis of Covalently Linked Tetraarylporphyrin Dimers. *J. Heterocycl. Chem.*, 1978, 75, 203-208.

[128] Y. Mikata, Y. Onchi, M. Shibata, T. Kakuchi, H. Ono, S.I. Ogura, I. Okura, S. Yano ; Synthesis and phototoxic property of tetra- and octa-glycoconjugated tetraphenylchlorins. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1998, 8, 3543-3548.

[129] P. Maillard, C. Héry, M. Momenteau ; Synthesis, characterization and photocytotoxicity of a glycoconjugated *meso*-monoarylbenzochlorin . *Tetrahedron Letters*, 1997, 38, 3731-3734.

[130] E.J. Tarlton, S.F. Mac Donald, E. Baltazzi ; Uroporphyrin 3. J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4389-4395.

[131] E. Goldman ; The growth of malignant disease in man and the lower animals with special reference to the vascular system. Lancet, 1907, 2, 1236-1240.

[132] J. Folkman, E. Merler, C. Abernathy, G. Williams ; Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J. Exp. Med., 1971,133(2), 275-288.

[133] J. Folkman ; Tumor angiogenesis : Therapeutic implications. N. Engl. J. Med., 1971, 285, 1182-1186.

[134] A. Bamias, M.A. Dimopoulos ; Angiogenesis in human cancer : implications in cancer therapy. Eur. J. Int. Med., 2003, 14, 459-469.

[135] G. Bergers, L.E. Benjamin ; Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat. Rev. Cancer, 2003, 3, 401-410.

[136] P. Carmeliet, R.K. Jain ; Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature, 2000, 407, 249-257.

[137] P. Carmeliet ; Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. Nat. Med., 2000, 6, 389-395.

[138] L.M. Coussens, W.W. Raymond, G. Bergers, M. Laig-Webster, O. Behrendtsen, Z. Werb, G.H. Caughey, D. Hanahan ; Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. Genes Dev., 1999, 13, 1382-1397.

[139] H. Hashizume, P. Baluk, S. Morikawa, J.W. McLean, G. Thurston, S. Roberge, R.K. Jain, D.M. Mac Donald ; Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am. J. Pathol., 2000, 156, 1363-1380.

[140] T.A. Fong, L.K. Shaver, L. Sun, C. Tang, H. App, T.J. Powell, Y.H. Kim, R. Schreck, X. Wang, W. Riseau, A. Ullrich, K.P. Hirth, G. McMahon ; SU5416 is a potent and selective inhibitor of the vascularendothelial growth factor receptor (Flk-1/KDR) that inhibits tyrosine kinase catalysis, tumor vascularization and growth of multiple tumor types. *Cancer Res.*, 1999, 59, 99-106.

[141] A.D. Laird, P. Vajkoczy, L.K. Shawver, A. Thurnher, C. Liang, M. Mohammadi, J. Schlessinger, A. Ullrich, S.R. Hubbard, R.A. Blake, T.A. Fong, L.M. Strawn, L. Sun, C. Tang, R. Hawtin, F. Tang, N. Shenoy, K.P. Hirth, G. McMahon, J.M. Cherrington ; SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors. *Cancer Res.*, 2000, 60(15), 4152-4160.

[142] M. Ziche, S. Donnini, L. Morbidelli ; Development of new drugs in angiogenesis. *Curr. Drug Targets*, 2004, 5, 389-406.

[143] P.C. Brooks, S. Silletti, T.L. von Schalscha, M. Friedlander, D.A. Cheresh ; Disruption of angiogenesis by PEX, a noncatalytic metalloproteinase fragment with integrin binding activity. *Cell*, 1998, 92, 391-400.

[144] D. Ingber, T. Fujita, S. Kishimoto, K. Sudo, T. Kanamaru, H. Brem, J. Folkman ; Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature*, 1990, 348, 555-557.

[145] V. Castronovo, D. Belotti ; TNP-470 (AGM-1470) : mechanisms of action and early clinical development. *Eur. J. Cancer*, 1996, 32A, 2520-2527.

[146] M.S. O'Reilly, L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R.A. Rosenthal, M. Moses, W.S. Lane, Y. Cao, E.H. Sage, J. Folkman ; Angiostatin : a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 1994, 79, 315-328.

- [147] M.S. O'Reilly, T. Boehm, Y. Shing, C. Chen, N. Fukai, G. Vasios, W.S. Lane, E. Flynn, J.R. Birkhead, B.R. Olsen, J. Folkman ; Endostatin : an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, 88, 277-285.
- [148] S.K. Gupta, T. Hassel, J.P. Singh ; A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1995, 92, 7799-7803.
- [149] P.C. Brooks, R.A. Clark, D.A. Cheresh ; Requirement of vascular integrin $\alpha_v\beta_3$ for angiogenesis. *Science*, 1994, 264, 569-571.
- [150] G.C. Tucker ; Inhibitors of integrins. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2002, 2(4), 394-402.
- [151] J.W. Smith ; Cilengitide Merck. *Curr. Opin. Investig. Drugs*, 2003, 4, 741-745.
- [152] F.G. Giancotti, E. Ruoslahti ; Integrin signaling. *Science*, 1999, 285(5430), 1028-1032.
- [153] B. Masson-Gadais, J. Huot, J.C. Lissitzky ; Topographie de la liaison intégrine ligand. *Médecine/Sciences*, 2001, 17, 206-210.
- [154] A. van der Flier, A. Sonnenberg ; Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res.*, 2001, 305(3), 285-298.
- [155] D.M. Ramos, M. But, J. Regezi, B.L. Schmidt, A. Atakilit, D. Dang, D. Ellis, R. Jordan, X. Li ; Expression of integrin beta 6 enhances invasive behavior in oral squamous cell carcinoma. *Matrix Biol.*, 2002, 21(3), 297-307.
- [156] M.J. Humphries ; Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.*, 2000, 28, 311-339.
- [157] E.F. Plow, T.A. Haas, L. Zhang, J. Loftus, J.W. Smith ; Ligand binding to integrins. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275(29), 21785-21788.

- [158] M.A. Arnaout, S.L. Goodman, J.P. Xiong ; Coming to grips with integrin binding to ligands. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2002, 14, 641-651.
- [159] P.C. Brooks, R.A. Clark, D.A. Cheresh ; Requirement of vascular $\alpha_v\beta_3$ integrin for angiogenesis. *Science*, 1994, 264, 569-571.
- [160] L.E. Reynolds, L. Wyder, J.C. Lively, D. Taverna, S.D. Robinson, X. Huang, D. Sheppard, R.O. Hynes, K.M. Hodivala-Dilke ; Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β_3 integrin or β_3 and β_5 integrins. *Nat. Med.*, 2002, 8, 27-34.
- [161] R.O. Hynes ; A reevaluation of integrins as regulator of angiogenesis. *Nat. Med.*, 2002, 8, 918-921.
- [162] J.P. Xiong, T. Stehle, B. Diefenbach, R. Zhang, R. Dunker, D.L. Scott, A. Joachimiak, S.L. Goodman, M.A. Arnaout ; Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$. *Science*, 2001, 294, 339-345.
- [163] R. Haubner, D. Finsinger, H. Kessler ; Stereoisomeric peptide libraries and peptidomimetics for designing selective inhibitors of the $\alpha_v\beta_3$ integrin for a new cancer therapy. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1997, 36, 1374-1389.
- [164] S.J. Bogdanowich-Knipp, S. Chakrabarti, T.D. Williams, R.K. Dillman, T.J. Siahaan ;. Solution stability of linear vs. cyclic RGD peptides. *J. Pept. Res.*, 1999, 53, 530-541.
- [165] S.L. Goodman, G. Holzemann, G.A. Sulyok, H. Kessler ; Nanomolar small molecule inhibitors for $\alpha_v(\beta)_6$, $\alpha_v(\beta)_5$, and $\alpha_v(\beta)_3$ integrins. *J. Med. Chem.*, 2002, 45, 1045-1051.
- [166] E. Koivunen, B. Wang, E. Ruoslathi ; Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins. *Bio-Technology*, 1995, 13, 265-270.

- [167] R.J. Kok, A.J. Schraa, E.J. Bos, H.E. Moorlag, S.A. Asgeirsdottir, M. Everts, D.K. Meijer, G. Molema ; Preparation and functional evaluation of RGD-modified proteins as $\alpha(v)\beta(3)$ integrin directed therapeutics. *Bioconjug. Chem.*, 2002, 13, 128–135.
- [168] I. Mahmood, M.D. Green ; Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations in the development of therapeutic proteins. *Clin. Pharm.*, 2005, 44, 331–347.
- [169] M. Bai, L. Campisi, P. Freimuth ; Vitronectin receptor antibodies inhibit infection of HeLa and A549 cells by adenovirus type 12 but not by adenovirus type 2. *J. Virol.*, 1994, 68, 5925–5932.
- [170] R. Vene, R. Benelli, D.M. Noonan, A. Albini ; HIV-Tat dependent chemotaxis and invasion, key aspects of tat mediated pathogenesis. *Clin. Exp. Metastasis*, 2000, 18, 533–538.
- [171] R.H. Haubner, H.J. Wester, W.A. Weber, M. Schwaiger ; Radiotracer-based strategies to image angiogenesis. *Q. J. Nucl. Med.*, 2003, 47, 189–199.
- [172] M. Gurrath, G. Muller, H. Kessler, M. Aumailley, R. Timpl ; Conformation/activity studies of rationally designed potent anti-adhesive RGD peptides. *Eur. J. Biochem.*, 1992, 210, 911-921.
- [173] M. Aumailley, M. Gurrath, G. Muller, J. Calvete, R. Timpl, H. Kessler ; Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.*, 1991, 291, 50-54.
- [174] M.A. Dechantsreiter, E. Planker, B. Matha, E. Lohof, G. Holzemann, A. Jonczyk, S.L. Goodman, H. Kessler ; N-Methylated cyclic RGD peptides as highly active and selective $\alpha_v\beta_3$ integrin antagonist. *J. Med. Chem.*, 1999, 42, 3033-3040.

[175] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti ; Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science*, 1998, 279(5349), 377-380.

[176] R. Haubner, R. Gratias, B. Diefenbach, S.L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler ; Structural and functional aspects of RGD-containing cyclic pentapeptides as highly potent and selective integrin $\alpha_v\beta_3$ antagonists. *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, 118, 7461-7472.

[177] J.P. Xiong, T. Stehle, R. Zhang, A. Joachimiak, M. Frech, S.L. Goodman, M.A. Arnaout ; Crystal structure of the extracellular segment of integrin $\alpha_v\beta_3$ in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science*, 2002, 296, 151-155.

[178] J. Zilberstein, S. Schreiber, M.C. Bloemers, P. Bendel, M. Neeman, E. Schechtman, F. Kohen, A. Scherz, Y. Salomon ; Antivascular treatment of solid melanoma tumors with bacteriochlorophyll-serine-based photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 2001, 73(3), 257-266.

[179] N.V. Koudinova, J.H. Pinthus, A. Brandis, O. Brenner, P. Bendel, J. Ramon, Z. Eshhar, A. Scherz, Y. Salomon ; Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD) : successful *in vivo* treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts. *Int. J. Cancer*, 2003, 104(6), 782-789.

[180] R. Binetruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre, M. Kraemer, J. Plouet, C. Derbin, G. Perret, J.C. Mazie ; Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *EMBO J.*, 2000, 19(7), 1525-1533.

[181] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob ; A peptide competing with EGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J. of Contr Release* 11 (2006) 153-164.

[182] C.M. Allen, W.M. Sharman, C. La Madeleine, J.M. Weber, R. Langlois, R. Ouellet, J.E. van Lier ; Photodynamic therapy : tumor targeting with adenoviral proteins. *Photochem. Photobiol.*, 1999, 70(4), 512-523.

[183] V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz ; Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide-porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support. *Tetrahedron Lett.*, 2004, 45, 5295-5299.

[184] I.J. MacDonald, T.J. Dougherty ; Basic principles of photodynamic therapy. *J. Porphyrins and phthalocyanins*, 2001, 5, 105-129.

[185] U. Isele, K. Schieweck, R. Kessler, P. van Hoogevest, H. G. Capraro ; Pharmacokinetics and body distribution of liposomal zinc phthalocyanine in tumor-bearing mice: influence of aggregation state, particle size, and composition. *J. Pharm. Sci.*, 1995, 84, 166-173.

[186] J.G. Moser, F.P. Montforts, D. Kusch, A. Vervoorts, D. Kirsch, M. Berghahn, N. Akgün, A. Rueck, S. Andrees, B. Wagner ; How many molecules of a photosensitizer are necessary to photosensitize a tumor cell. *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, 1996, 2924, 22-30.

[187] G. Zheng, A. Graham, M. Shibata, J. Missert, A.R. Oseroff, T.J. Dougherty, R.K. Pandey; Synthesis of beta-galactose-conjugated chlorins derived by enyne metathesis as galectin-specific photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Org. Chem.*, 2001, 66, 8709-8716.

[188] J.H. Fuhrhop, C. Demoulin, C. Boettcher, J. Koenig, U. Siggel ; Chiral micellar porphyrin fibers with 2-aminoglycosamide head groups. *J. Amer. Chem. Soc.*, 1992, 114, 4159-4165

[189] J. Defaye, J. Gelas. Dans *Studies in natural products Chemistry* (Edité par Atta-ur-Rhaman) ; Elsevier, Amsterdam, 1991, vol. 8, 315-357.

[¹⁹⁰] C. Frochot, B. Di Stasio, M. Barberi-Heyob, M.C. Carre, J.M. Zwier, F. Guillemin, M.L. Viriot ; New glycosylated porphyrins for PDT applications. *Oftalmologia*, 2003, 56, 62-66.

[¹⁹¹] B. Di Stasio, C. Frochot, D. Dumas, P. Even, J. Zwier, A. Muller, J. Didelon, F. Guillemin, M.L. Viriot, M. Barberi-Heyob ; The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur. J. Med. Chem.*, 2005, 40, 1111-1122.

[¹⁹²] C. Frochot, B Di Stasio, R. Vanderesse, F Guillemin, M.L. Viriot, M. Barberi-Heyob ; Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity. *Bioorg. Chem. Soumise*

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ooo

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Monsieur René SANTUS, Professeur, Muséum d'Histoire Naturelle, Paris

Monsieur Xavier ALLONAS, Professeur, ENSCMu, Mulhouse

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur DI STASIO Benoît

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Étude de nouveaux photosensibilisants pour des applications en Thérapie
Photodynamique"**

en vue de l'obtention du titre de :

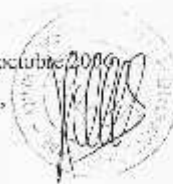
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Biogénierie - Biomatériaux** »

Fait à Vandœuvre, le 17 octobre 2006

Le Président de l'IN.P.L.,

L. SCHUFFENECKER



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORÊT DE HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

Etude de nouveaux photosensibilisants pour des applications en thérapie photodynamique

Les dérivés de porphyrines sont impliqués dans de nombreux processus d'oxydoréduction. Ces composés conduisent à de nombreuses applications, dont la Thérapie Photodynamique (PDT). Il existe deux générations de dérivés de porphyrines qui sont actuellement remplacés par des composés de 3^{ème} génération, plus actifs et entraînant moins d'effets secondaires. Ces composés sont capables de reconnaître spécifiquement et directement (par adressage) ou indirectement (par vectorisation) les cellules cancéreuses. Nous avons orienté notre travail vers la synthèse et l'évaluation biologique de composés tétrapyrroliques associés à des modules tels que des sucres ou des motifs peptidiques de type -RGD- qui permettent une reconnaissance spécifique des cellules cancéreuses, *via* les lectines ou les intégrines, respectivement. De plus, dans le cadre d'un programme européen Cost-Chemistry intitulé "*New molecular systems with therapeutic applications in photodynamic therapy of cancer and microbial infections*", nous avons étudié les propriétés photophysiques de nombreux photosensibilisants synthétisés par une équipe roumaine.

Study of new photosensitizers for PDT applications

Derived of porphyrins are tetrapyrrolic macrocycles involved in several redox processes. These compounds are used for different biological applications, like photodynamic therapy (PDT). Many teams in the world seek to synthesize compounds able to directly recognize specifically and (by targeting) or indirectly (by vectorization) cancer cells. These compounds are known as of 3rd generation. We are involved in the synthesis and the biological evaluation of tetrapyrrolic compounds associated to recognition and/or transport agents such as sugars or RGD-like peptide sequences. These moieties allow a specific recognition of the cancerous cells, *via* the lectins for the sugar moieties and the integrins for the RGD type moieties, respectively. Within the framework of an European Cost-Chemistry program entitled "*New molecular systems with therapeutic applications in photodynamic therapy of cancer and microbial infections*", we also studied the photophysical properties of photosensitizers synthesized by a Rumanian team.

Discipline : Bioingénierie-Biomatériaux

Mots clefs : chlorines, *in vitro*, PDT, porphyrines, vectorisation, synthèse

Laboratoires :

DCPR-GRAPP, UMR 7630 CNRS-INPL, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France

Centre Alexis Vautrin, CRAN-UMR 7039 CNRS, Nancy-Université, Avenue de Bourgogne, Brabois, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France