



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>

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2000

FACULTE DE PHARMACIE

**Nouveaux photosensibilisants pour
la thérapie photodynamique**



THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 août 2000

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Sébastien AUBERT

Membres du jury

Président : M. Alain MARSURA, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : Mme Marie-Laure VIRIOT, Directeur de Recherche CNRS, DCPR-Nancy
Mme Marie-Christiane CARRE, Chargé de Recherche INSERM, DCPR-Nancy
M. Jean-Louis MERLIN, Pharmacien – Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre

BU PHARM. ODONTOL.



D 104 053192 4

UNIVERSITE HENRI POINCARÉ – NANCY I

2000

DB 22439

FACULTE DE PHARMACIE

**Nouveaux photosensibilisants pour
la thérapie photodynamique**

THESE



Présentée et soutenue publiquement

Le 29 août 2000

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Sébastien AUBERT

Membres du jury

Président : M. Alain MARSURA, Professeur, Faculté de Pharmacie de Nancy

Juges : Mme Marie-Laure VIRIOT, Directeur de Recherche CNRS, DCPR-Nancy
Mme Marie-Christiane CARRE, Chargé de Recherche INSERM, DCPR-Nancy
M. Jean-Louis MERLIN, Pharmacien – Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre

FACULTE DE PHARMACIE

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY I

Membres du personnel enseignant

Doyen : Mme Chantal FINANCE

Vice Doyen : Mme Anne ROVEL

DOYENS HONORAIRES

M. BERNANOSE André

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mlle BESSON Suzanne

Mlle GIRARD Thérèse

M. LECTARD Pierre

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEUR EMERITE

M. LOPPINET Vincent

PROFESSEURS

M.	ASTIER Alain	Pharmacie Clinique
M.	ATKINSON Jeffrey	Pharmacologie
M.	BAGREL Alain	Biochimie fondamentale et clinique, Biotechnologies
Mlle	BATT Anne Marie	Toxicologie
M.	BLOCK Jean Claude	Santé et Environnement
M.	BONALY Roger	Biochimie microbienne
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON	Pharmacologie Cardiovasculaire
Mme	FINANCE Chantal	Microbiologie moléculaire
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biomathématiques, Biophysique et Audioprothèse
Mlle	GALTEAU Marie Madeleine	Biochimie
M.	HENRY Max	Biologie végétale
M.	HOFFMAN Maurice	Pharmacie clinique
M.	JACQUE Michel	Pharmacodynamie
M.	LABRUDE Pierre	Physiologie
M.	LALLOZ Lucien	Chimie organique
M.	MAINCENT Philippe	Pharmacie galénique
M.	MARSURA Alain	Chimie thérapeutique
M.	MARTIN Jean Armand	Chimie minérale et Minéralogie
M.	MORTIER François	Pharmacognosie
M.	NICOLAS Alain	Chimie analytique et Bromatologie
M.	REGNOUF DE VAINS Jean Bernard	Chimie Thérapeutique
Mme	SCHWARTZBROD Janine	Bactériologie - Parasitologie
M.	SCHWARTZBROD Louis	Virologie - Immunologie
M.	SIEST Gérard	Chimie Biologique
M.	SIMON Jean Michel	Droit et Economie de la Santé
M.	VIGNERON Claude	Hématologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BONNEAUX François	Chimie Thérapeutique
M.	CATAU Gérald	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	CHILLON Jean Marc	Pharmacologie
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
M.	DUCOURNEAU Joël	Biophysique, Audioprothèse, Acoustique
Mme	FAIVRE-FIORINA Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mlle	FONS Françoise	Biologie Végétale et Mycologie
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GANTZER Christophe	Virologie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
M.	GIBAUD Stéphane	Pharmacie Clinique
Mme	HASENFRATZ-SAUDER Marie Paule	Biologie Végétale
Mlle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mlle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
M.	JORAND Frédéric	Santé et Environnement
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie Galénique
Mme	LARTAUD-IDJOUADIENE Isabelle	Pharmacologie
Mme	LEININGER-MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAL-HEUSSLER Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie Thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDICAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie
Mme	ZINUTTI Colette	Pharmacie galénique

ASSISTANTS

Mme	BEAUD Mariette	Biologie Cellulaire
Mme	BERTHE Marie-Catherine	Biochimie
M.	DANGIEN Bernard	Botanique
Mme	MOREAU Blandine	Pharmacognosie
Mme	PAVIS Annie	Parasitologie
M.	TROCKLE Gabriel	Pharmacodynamie

PROFESSEUR ASSOCIE

Mme	GRISON Geneviève	Pratiques officinales
-----	------------------	-----------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M.	COCHAUD Christophe	Anglais
----	--------------------	---------

A notre président de thèse :

Monsieur le Professeur Alain Marsura

Professeur de chimie thérapeutique

Nous le prions de trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance pour l'honneur qu'il nous a accordé en assurant la présidence de cette thèse.

Nous tenons à le remercier pour la richesse et la clarté de ses enseignements au cours du cursus universitaire ainsi que pour son accueil au sein du laboratoire de chimie thérapeutique.

Nous avons apprécié sa disponibilité et son ouverture d'esprit vis-à-vis de l'industrie pharmaceutique.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre profond respect et de notre sincère gratitude.

A Madame Marie-Laure Viriot

Directeur de Recherche CNRS

Directeur du Département de Chimie Physique des Réactions

Nous la remercions de nous avoir proposé le sujet et de nous avoir apporté son aide tout au long de cette étude.

Nous avons pu apprécier son professionnalisme et sa disponibilité.

Nous sommes honorés de sa présence dans le jury.

Qu'elle soit assurée de notre respectueuse considération et de notre vive gratitude.

A Madame Marie-Christiane Carré

Chargé de Recherche INSERM

Nous la remercions pour l'attention bienveillante et dynamique qu'elle nous a accordée tout au long de cette étude.

Nous avons pu apprécier son aide ainsi que ses précieux conseils.

Sa participation au jury nous honore.

Qu'elle trouve ici l'expression de notre sincère gratitude.

A Monsieur Jean-Louis Merlin

Pharmacien

Nous lui sommes reconnaissants d'avoir accepté de siéger dans ce jury.

Nous le remercions infiniment pour l'intérêt porté pour le sujet.

Que cette thèse soit l'expression de notre profonde estime et de nos chaleureux remerciements.

A tous les membres du DCPR rencontrés au cours de ce travail,
merci de votre accueil et de votre collaboration à son élaboration.

A Pascale, merci pour ton aide et tes conseils.

A Vanessa et Patrick, merci pour vos conseils.

A Cricri et Olivier, merci pour votre support informatique.

A Fabrice, merci pour ton scanner.

A mes parents, mon frère et ma sœur,
merci pour tout.

A Audrey, merci pour ton ordinateur et pour tout le reste.

A toute ma famille proche et éloignée.

A toute l'équipe Pharma plus : Anne-Cécile, Bao-linh, Céline, Claire, Benoît,
Guillaume, Luc et Zouhair,

Aux admis sur titre : Adrien, Cyrille et Elodie,

A Raphaël, mon binôme de Pharma,

A Seb mon ami portois,

A Alex et Bertrand.

A toutes les personnes croisées jusqu'à ce jour et ayant contribué directement
ou indirectement à l'élaboration de ce travail.

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	3
INTRODUCTION GENERALE	5
1 ^{ère} PARTIE : LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	7
1. Introduction :	8
2. Historique :	8
3. Rappels de spectroscopie :	9
4. Absorption, désactivations non radiatives et radiatives :	11
4.1. L'absorption :	11
4.2. Les transitions non radiatives :	11
4.3. Les transitions radiatives :	12
5. Les porphyrines :	14
5.1. Généralités :	14
5.2. Synthèse biologique des porphyrines :	16
5.3. Caractérisation spectrale des porphyrines :	17
6. La photooxydation :	19
6.1. Etape n°1 : Passage du photosensibilisateur de l'état fondamental S_0 à l'état triplet excité T_1 suite à l'absorption de lumière :	19
6.2. Etape n°2 : Photooxydations sensibilisées à partir du photosensibilisateur à l'état triplet T_1 :	20
6.2.1. Réaction de type I :	20
6.2.2. Réaction de type II :	21
2 ^{ème} PARTIE : LES PHOTOSENSIBILISATEURS	24
1. Introduction :	25
2. Les photosensibilisateurs de première génération :	25
3. Les photosensibilisateurs de seconde génération :	28
3.1. Critères requis :	28
3.2. Caractéristiques structurales :	29
4. Le futur :	32
4.1. Ac monoclonaux et 5-Ala :	32
4.2. Les texaphyrines :	33
4.2.1. Généralités :	33
4.2.2. Les texaphyrines et la PDT :	34
4.2.3. Synthèse des texaphyrines :	35



5. Localisation des photosensibilisateurs :	36
5.1. Paramètres intervenants :	36
5.2. Passage de la membrane plasmique :	39
5.3. Localisation dans la cellule :	41
6. Apoptose et nécrose :	42
6.1. Apoptose :	42
6.2. Nécrose :	43
6.3. Constatation :	44
7. Nouvelles applications de la PDT :	44
 3 ^{ème} PARTIE : SYNTHESSES.....	46
1. Introduction :	47
2. Synthèses de la PpIX (bis) glucosamide acétylée :	48
2.1. Schéma de la première voie de synthèse :	48
2.2. Schéma de la deuxième voie de synthèse :	49
2.3. Schéma de la troisième voie de synthèse :	50
 CONCLUSION	51
 BIBLIOGRAPHIE	53
 ANNEXES.....	62
ANNEXE 1 : Photographies de vitiligo	63
ANNEXE 2 : Historique de la PDT	65
ANNEXE 3 : Tableaux de photosensibilisateurs.....	70
ANNEXE 4 : Voies de synthèse des <i>méso</i> porphyrines	88
ANNEXE 5 : Protocoles	90

LISTE DES ABREVIATIONS

AIPCTS : "aluminium phthalocyanine tetrasulfonate"

AMM : Autorisation de mise sur le marché

BPDMA : "Benzoporphyrin Derivative Monoacid"

Cle6 : "chlorin e₆"

CI : Conversion interne

CIS : Conversion inter-systèmes

CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique

DCPR : Département de Chimie Physique des Réactions

DDQ : 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone

ENSIC : Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques

GRAPP : Groupe de Recherches et Applications en Photophysique et Photochimie

Hp : Hématoporphyrine

HpD : Dérivé de l'hématoporphyrine

INSERM : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale

LDL : "Low Density Lipoprotein"

MACE : "monoaspartyl chlorin e₆"

mTHPC : "m-Tetrahydroxyphenylchlorin"

¹O₂ : Oxygène singulet

³O₂ : Oxygène triplet

PDT : "Photodynamic therapy" (Thérapie photodynamique)

PCT : Photochimiothérapie

PII : "Photofrin II"

φ : rendement quantique

Sens : photosensibilisateur

TCQ : "2,3,5,6-tetrachlorobenzoquinone"

TEOA : "triethylorthoacetate"

3THPP : "tetra(3-hydroxyphenyl)porphyrin"

TMPyP : " $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetrakis (1-methylpyridinium-4-yl) porphyrin *p*-toluenesulfonate"

TPPS₃ : "tetraphenylporphine trisulfonate"

TPPS₄ : "tetraphenylporphine tetrasulfonate"

UV : ultraviolet

ν : niveau quantique de vibration

INTRODUCTION GENERALE

A l'aube du XXI^{ème} siècle, une nouvelle thérapie anticancéreuse est en plein essor : la thérapie photodynamique (PDT) ou photochimiothérapie (PCT). Des premiers travaux de Raab en 1900, en passant par Lipson dans les années 60 (Dougherty, 1987), la PCT est considérée depuis les années 80 comme une nouvelle arme thérapeutique dans la lutte antitumorale (Schuitmaker et al., 1996).

A ce jour, bien que le PHOTOFRIN[®] soit l'unique représentant de la PCT dans le monde du médicament, de nombreuses molécules ont été élaborées afin d'améliorer la thérapie photodynamique. Ces produits sont tous dérivés de molécules de bases : les porphyrines. En plus de leurs emplois multiples tels que catalyseurs d'oxydation thermique ou photochimique, agents d'activation de petites molécules, les porphyrines constituent un des éléments essentiels de la PCT.

Dans la suite du document, nous présentons la thérapie photodynamique, son fonctionnement, son mode d'action et nous dressons un tableau représentatif des nouveaux photosensibilisants pour la PDT afin de mieux comprendre les axes de recherche empruntés par les scientifiques. Enfin, nous exposons des travaux de synthèses chimiques réalisés au sein du DCPR-GRAPP pour élaborer une nouvelle molécule photosensibilisante.

1^{ère} PARTIE : LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

1. Introduction :

La thérapie photodynamique est un traitement médical basé sur l'utilisation concomitante de deux agents : un composé photosensibilisant et la lumière ; la combinaison de ces deux éléments va entraîner un effet cytotoxique ou modificateur de la zone traitée. Cette thérapie dont l'action est générée par l'emploi à la fois de photons et d'un photosensibilisateur est par conséquent appelée "thérapie photodynamique" (PDT).

2. Historique :

Même si le terme de PDT est récent et provient de l'utilisation de cette thérapie dans le traitement de certaines tumeurs, l'utilisation de la double association lumière / photosensibilisant pour traiter certaines maladies remonte quant à elle très loin dans l'histoire de l'humanité : ainsi, il y a 4000 ans, les populations de l'ancienne Egypte combinaient déjà l'ingestion de plantes (contenant des psoralènes photosensibles) et les rayons du soleil pour soigner le vitiligo (Sternberg et al., 1998). Pour mémoire, le vitiligo, nom d'origine latine signifiant "tache blanche" est une maladie auto-immune, multifactorielle, se manifestant par l'apparition de zones de peau dépigmentée plus ou moins importantes, principalement sur le visage, les pieds, les mains, les articulations et les parties génitales. Les bordures de ces zones présentent la particularité d'être plus colorées que la peau normalement pigmentée (cf. annexe 1).

Le véritable développement de la PDT date de 1900, année où Raab réussit à tuer des paramécies en combinant à la fois la lumière et l'acridine. Par la suite, Trappeiner, Meyer, Betz, Policard, Lipson permirent par leurs travaux d'avancer dans la compréhension de la PDT (Sternberg et al., 1998) ; le 16 avril 1993, le bureau de la protection de la santé du Canada approuva la mise sur le marché du PHOTOFRIN[®], premier médicament utilisé dans la PDT (Dougherty, 1993). Depuis, le PHOTOFRIN[®] a reçu une AMM (Autorisation de mise sur le marché) aux Etats Unis, au Japon, en Europe... Parallèlement, dans le cadre de la PDT, de nombreuses molécules ont été synthétisées ; parmi celles-ci, certaines sont actuellement en phases d'essai clinique telles que la MACE (monoaspartyl chlorin

e6), le BPDMA (Benzoporphyrin Derivative Monoacid), la Sn étiopurpurine, la mTHPC (m-Tetrahydroxyphenylchlorin) (Sternberg et al., 1998)...

Un historique plus exhaustif se trouvant en annexe 2 expose les événements essentiels de la PDT.

3. Rappels de spectroscopie :

La base de l'effet photodynamique est le changement du photosensibilisateur occasionné par la rencontre de celui-ci avec un photon. Il s'ensuit alors une cascade réactionnelle qui aboutira à la destruction de la zone tumorale.

Pour mieux comprendre ces réactions successives, un rappel de spectroscopie s'impose.

Une molécule ne peut exister que dans un certain nombre d'états d'énergie discrets correspondant à des configurations électroniques données. Ces états électroniques sont de deux types :

- Les états singulets (S) dans lesquels les électrons sont appariés, c'est-à-dire groupés par paires de spins opposés. Il en résulte que le spin global de la molécule est nul.
- Les états triplets (T) dans lesquels il existe deux électrons non appariés avec des spins de même sens.

Les dénominations "état singulet" et "état triplet" viennent du fait que, lorsque la molécule est soumise à un champ magnétique, deux électrons non appariés possèdent trois niveaux d'énergie différents alors que deux électrons appariés n'en possèdent qu'un. Par conséquent, l'état singulet est dit de multiplicité un et l'état triplet de multiplicité trois.

Dans la plupart des cas, l'état fondamental de la molécule, c'est-à-dire celui correspondant au niveau d'énergie le plus bas, est un état singulet désigné par S_0 . Une exception importante est la molécule d'oxygène dont l'état fondamental est un état triplet noté T_0 .

A côté de ces états fondamentaux, on trouve des états d'énergie supérieure, notés S_1, S_2, \dots, S_n et correspondant à des états singulets, dans le cas où leur configuration électronique est la même que celle de l'état fondamental S_0 . Si leur configuration électronique est différente de celle de l'état S_0 , on notera ces états supérieurs T_1, T_2, \dots, T_n .

Dans un état électronique donné, la molécule dispose de nombreux degrés de liberté correspondant aux vibrations et rotations des noyaux atomiques. Ainsi, chaque état de vibration-rotation est caractérisé par un niveau d'énergie ; les écarts énergétiques entre les niveaux de rotation sont faibles par rapport à ceux observés entre les niveaux de vibration. Par ailleurs, ces derniers sont beaucoup plus rapprochés que les états électroniques. Par conséquent, on note qu'à l'intérieur d'un état électronique donné, des états vibrationnels se subdivisent et que dans un état de vibration, des états de rotation se subdivisent.

Dans un état électronique donné, les niveaux vibrationnels sont définis par leurs niveaux quantiques de vibration $v : v = 0, 1, 2, \dots, n$. Par définition, le niveau quantique $v = 0$ correspond au niveau vibrationnel d'énergie la plus basse (Grécias et Migeon, 1987).

Le passage d'un état d'énergie à un autre peut se réaliser grâce à une transition radiative ou non radiative. La transition radiative est le passage d'une molécule d'un état d'énergie à un autre par absorption ou émission d'un photon. La transition non radiative ne met pas en jeu la lumière mais des agents tels que des collisions intermoléculaires, qui entraînent des pertes d'énergie et un changement de niveau d'énergie pour la molécule.

La transition radiative est dite "**permise**", lorsqu'elle présente une probabilité élevée d'exister (moment de transition non nul) : c'est le cas des transitions entre états de même multiplicité tels qu'entre deux états singulets ou entre deux états triplets. Elle est dite "**interdite**", quand sa probabilité d'exister est faible ; c'est le cas des transitions entre niveaux de multiplicité différente, telles qu'entre l'état fondamental et le premier état excité triplet ($S_0 \rightarrow T_1$) par exemple.

4. Absorption, désactivations non radiatives et radiatives :

4.1. L'absorption :

Initialement, la molécule photosensibilisante est à un niveau d'énergie stable S_0 . Selon la loi de Grotthus-Draper, il y aura réaction photochimique quand cette molécule va **absorber** une radiation électromagnétique de longueur d'onde appropriée. La molécule va alors se trouver dans un état électroniquement excité. La dualité onde-corpuscule a permis à Planck d'écrire une relation exprimant la valeur de l'énergie transportée par un photon (quantum de radiation) :

$$E = h\nu = hc / \lambda \quad [\text{J.photon}^{-1}]$$

h : constante de Planck ($6,6256 \cdot 10^{-34} \text{ J.s.photon}^{-1}$)

c : vitesse de la lumière ($2,9979 \cdot 10^8 \text{ m.s}^{-1}$)

λ : longueur d'onde de la radiation (m)

ν : fréquence de la radiation (s^{-1})

Ainsi, un photon d'un faisceau lumineux de fréquence ν_a sera absorbé par une molécule si son énergie transportée $h\nu_a$ est égale à la différence d'énergie entre un des niveaux inférieurs de l'état fondamental S_0 et un des niveaux des états supérieurs singulets excités.

Le domaine de longueurs d'onde généralement utilisé en photochimie se situe entre 200 et 700 nm, c'est-à-dire dans les domaines de l'ultraviolet et du visible. Ceci correspond à des énergies comprises entre 600 et 170 kJ.mol^{-1} environ et entraîne qu'on observe des transitions d'état de type $S_0 \rightarrow S_1$ ou $S_0 \rightarrow S_2$.

Les radiations très énergétiques (rayons γ et rayons X) étant difficilement utilisables techniquement et les radiations dans le proche infrarouge étant trop peu énergétiques, la PDT se borne donc aux domaines de l'ultraviolet (UV) et du visible.

4.2. Les transitions non radiatives :

Après absorption d'un photon, la molécule est portée dans un des niveaux vibrationnels des états singulets S_1 ou S_2 . Si elle se trouve en phase condensée

(liquide ou solide), elle sera alors soumise à de multiples collisions au cours desquelles elle va perdre une partie de son énergie ; elle retournera alors au niveau vibrationnel inférieur de S_1 ou S_2 : on parlera de **conversion interne** (CI), transition non radiative entre un état excité et un état d'énergie inférieure de même multiplicité. Cette conversion interne appelée aussi relaxation non radiative ou vibrationnelle est très rapide et dure environ 10^{-13} - 10^{-12} s. En fait, la rapidité de ce phénomène est telle que tout se passe comme si la molécule avait été excitée au niveau vibrationnel inférieur de S_1 (règle de Kasha).

Au niveau vibrationnel inférieur S_1 , il peut se réaliser une transition non radiative analogue à la conversion interne, mais se produisant entre les états S_1 et T_1 . On parlera de **conversion intersystèmes** qui correspond donc à une transition non radiative entre états de multiplicité différente. Ce processus impliquant un changement de spin est interdit par la règle de Wigner mais il pourra néanmoins se réaliser si les interactions spin-orbite sont importantes et/ou si la différence d'énergie entre l'état singulet S_1 et l'état triplet T_1 est faible, ceci favorisant un couplage vibrationnel. Par conséquent, la conversion intersystèmes présentera une probabilité proportionnelle à l'intensité du couplage spin-orbite et inversement proportionnelle à la différence d'énergie entre l'état singulet S_1 et l'état triplet T_1 .

Dans la mesure où la conversion intersystèmes est plus lente que la conversion interne, la durée de vie de l'état triplet T_1 sera plus longue que celle de l'état singulet S_1 . C'est pourquoi quasiment toutes les réactions photochimiques bimoléculaires ont lieu à partir des états triplets les plus bas (T_1). L'état triplet doit donc être considéré comme un élément primordial dans l'effet photodynamique ; celui-ci comme on le verra plus loin est en effet initié par une réaction chimique dans laquelle le photosensibilisateur se trouve dans l'état triplet T_1 .

4.3. Les transitions radiatives :

Au niveau de l'état vibrationnel inférieur S_1 , la molécule restera environ 10^{-9} s puis pourra se désactiver par **émission** d'une radiation : c'est la **luminescence**. Elle retourne ensuite à un des états vibrationnels de l'état fondamental S_0 . Ce phénomène correspondant à une transition radiative entre l'état inférieur de S_1 et un

des niveaux vibrationnels de S_0 , c'est-à-dire entre deux états de multiplicité identique est appelé **fluorescence** et possède une durée de vie de l'ordre de 10^{-12} à 10^{-6} s.

Il faut noter que le spectre d'émission de fluorescence sera décalé vers le rouge par rapport au spectre d'absorption. En effet, la fluorescence se produit entre le niveau vibrationnel inférieur S_1 et un niveau vibrationnel excité de l'état fondamental S_0 : l'écart énergétique dans ce cas est donc bien plus petit que celui observé lors de l'absorption permettant la transition entre l'état fondamental S_0 et les différents niveaux vibrationnels des états singulets S_1 ou S_2 .

Dans le cas où l'émission se réalise entre T_1 et S_0 , c'est-à-dire entre des états de multiplicité différente, on parlera de **phosphorescence**. Ce phénomène correspondant à une transition interdite, sa durée de vie sera par conséquent plus longue que la fluorescence : 10^{-7} à 10 s.

Le diagramme de Jablonsky ci-dessous expose ces différents types de radiations :

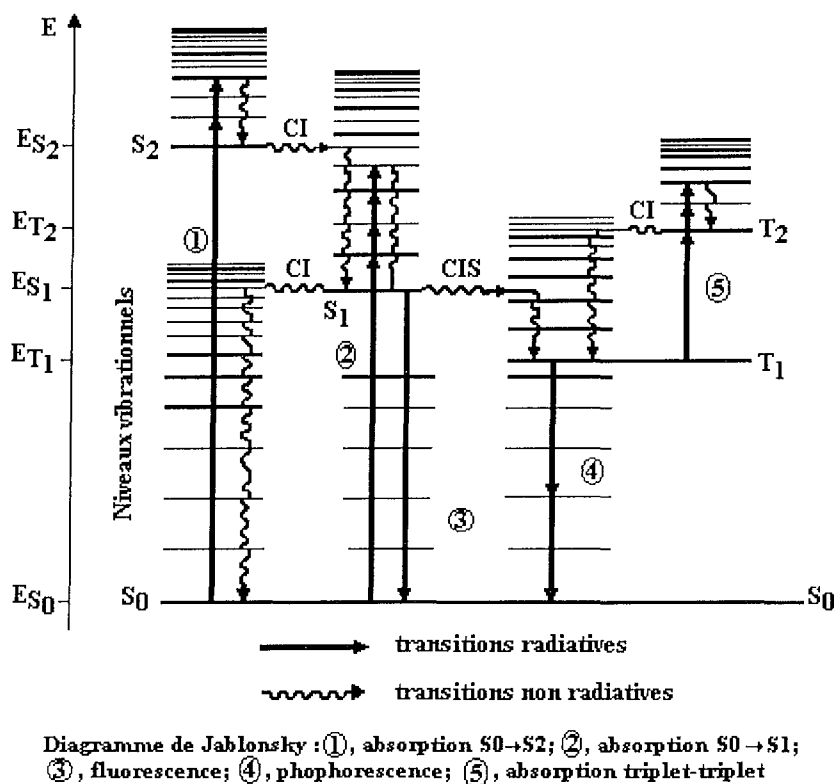


Figure 1: Diagramme de Jablonsky.

5. Les porphyrines :

5.1. Généralités :

La thérapie photodynamique repose sur l'utilisation concomitante de deux éléments : la lumière et un agent photosensibilisant ; ce dernier est représenté par une classe importante : les porphyrines dont le nom provient du grec *porphura* qui signifie "pourpre".

Les porphyrines et les molécules de type porphyrine sont retrouvées dans tous les organismes vivants. Qu'il s'agisse d'animaux ou de plantes, elles sont localisées principalement dans les cellules et les organes responsables de la production d'énergie, du métabolisme et des transports.

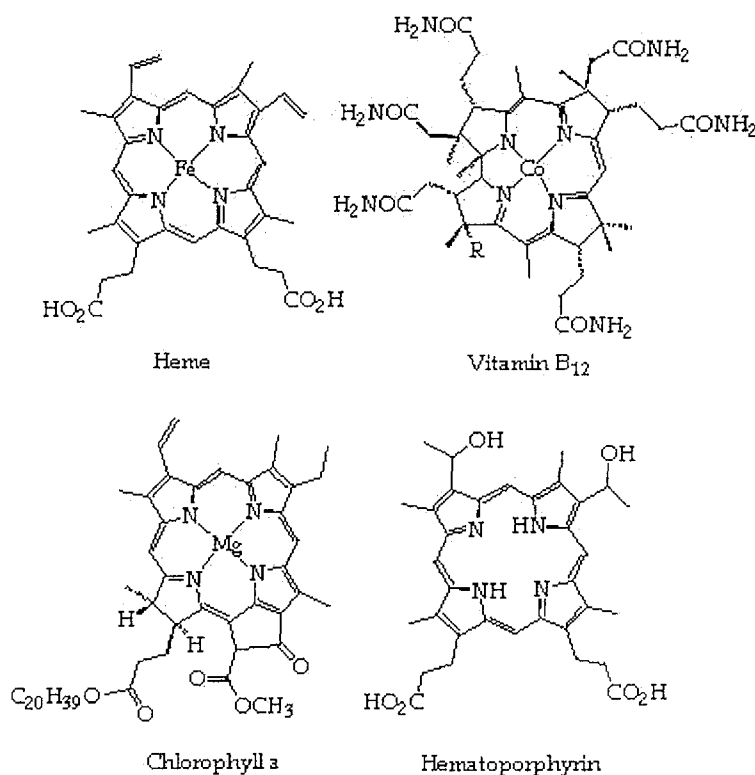


Figure 2 : Exemples de porphyrines naturelles et de molécules de type porphyrine.

Les porphyrines sont des dérivés de la porphine (cf. figure 3) ; celle-ci est un macrocycle formé de quatre noyaux pyrrole liés les uns aux autres par des ponts méthényle =CH- établis entre les atomes de carbone α et α' (Stryer, 1997).

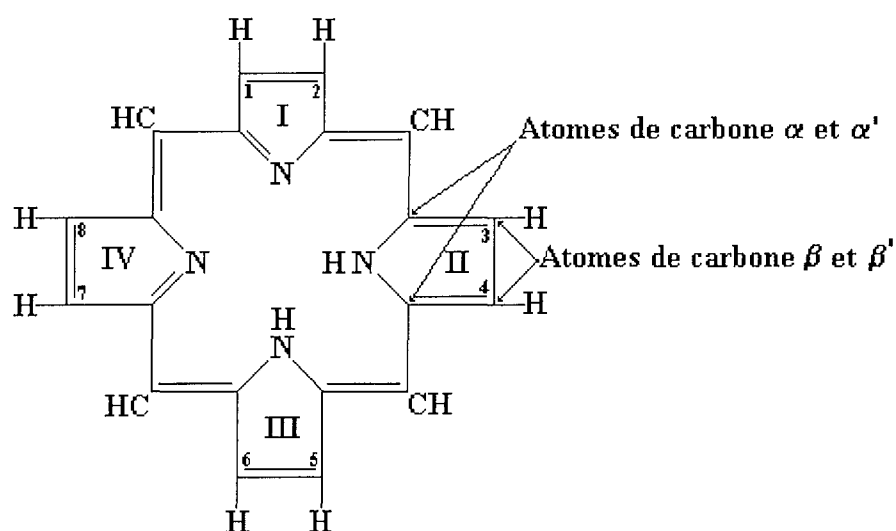


Figure 3 : Structure de la porphine.

Les porphyrines possèdent elles aussi le noyau tétrapyrrolique, mais les huit atomes de carbone β et β' de la porphine sont dans ce cas porteurs de divers substituants. Le squelette de base des porphyrines possède un caractère fortement conjugué dû à la présence de 18 électrons π aromatiques ce qui lui confère une très grande stabilité. Leur comportement de diacide ou de dibase en fonction du pH leur permet d'être facilement métallées par de nombreux métaux.

La structure de ces molécules offre des possibilités d'isomérisation. Par exemple, les uroporphyrines porteuses de deux substituants différents, un radical acétique (A) et radical propanoïque (P) sur les carbones β et β' conduisent à la formation de 4 types possibles d'uroporphyrines (Weil et al., 1994).

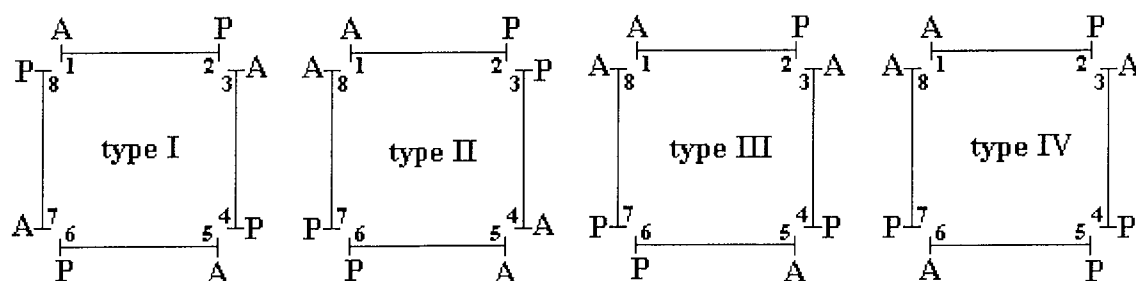


Figure 4 : Représentation schématique des 4 types d'uroporphyrines.

La protoporphyrine des hémoglobines, une des premières molécules utilisées en PDT est du type III et dérive de l'uroporphyrine III par décarboxylation des quatre radicaux acétiques en groupements méthyle et par décarboxylation puis déshydrogénation de deux des quatre radicaux propanoïques transformés en groupement vinyle. La protoporphyrine de type III est communément appelée protoporphyrine IX car elle correspond à l'isomère IX des isomères synthétiques ; en effet, les protoporphyrines comptant trois substituants différents, il y a quinze isomères possibles et non plus quatre.

La protoporphyrine IX comporte donc quatre groupements méthyle en 1, 3, 5 et 8, deux radicaux propanoïque en 6 et 7, et deux groupements vinyle en 2 et 4 (Weil et al., 1994).

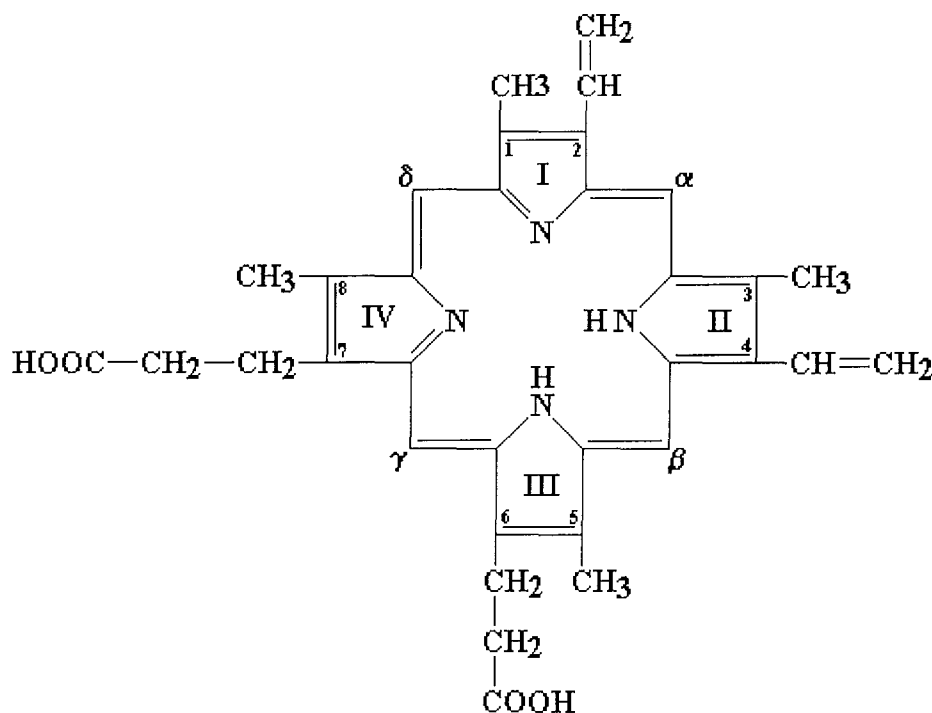


Figure 5 : Structure de la protoporphyrine IX.

5.2. Synthèse biologique des porphyrines :

Les porphyrines de notre organisme proviennent toutes d'un précurseur de base : l'acide 5-amino-lévulinique ; la condensation de deux molécules de ce composé conduit au porphobilinogène. Quatre molécules de porphobilinogène vont alors s'associer pour former le noyau tétrapyrrolique, squelette de base des porphyrines.

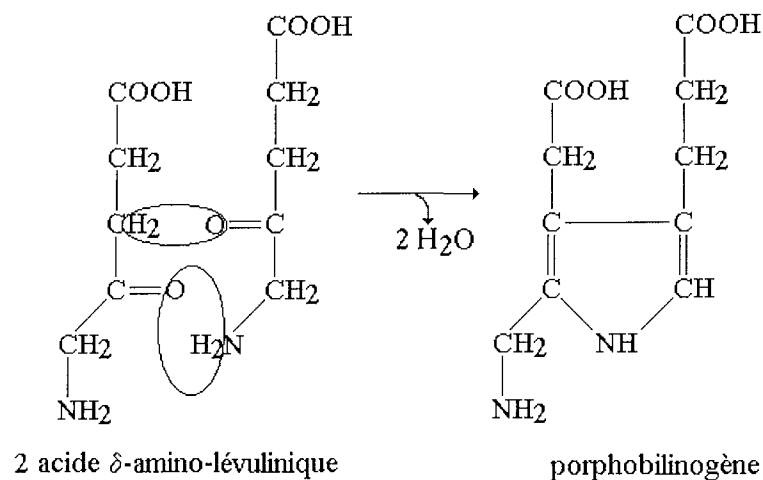


Figure 6 : Formation du porphobilinogène.

5.3. Caractérisation spectrale des porphyrines :

Spectre d'absorption :

La forte conjugaison des porphyrines due à la présence de nombreux électrons π leur confère la propriété d'absorption dans le domaine du visible. Ainsi le spectre d'absorption des porphyrines bases libres se présente classiquement par la présence d'une forte bande d'absorption entre 400 et 430 nm : c'est la bande de Soret. Celle-ci sera fine si la molécule est pure, large si la molécule est dimérisée (Oulmi et al., 1998).

A côté de la bande de Soret, on détecte quatre autres bandes d'intensité dix à vingt fois plus faible ; ce sont les bandes Q visualisées entre 480 et 700 nm, notées respectivement I, II, III et IV. Le nombre et l'intensité de ces bandes sont très variables et dépendent de plusieurs facteurs tels que le type et la nature de la substitution, l'absence ou la présence d'un métal, etc. En général, on rencontre quatre grands types de spectres : *étio*, *phyllo*, *rhodo* et *oxorhodo*.

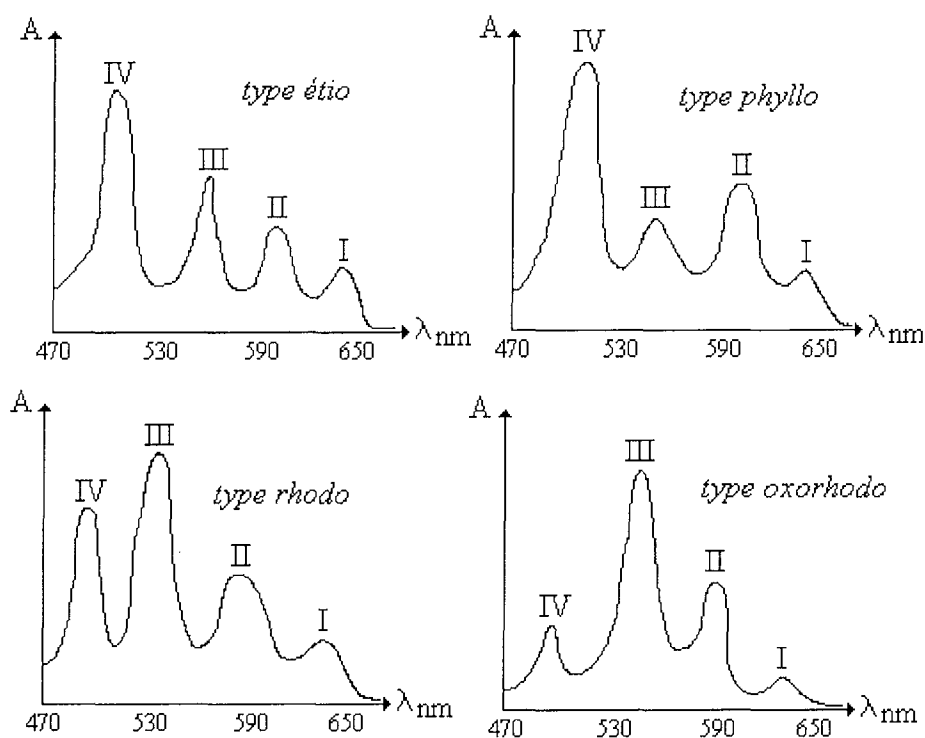


Figure 7 : Bandes Q des quatre grands types de spectre des porphyrines bases libres.

Rothemund a ainsi montré que le composé $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetraphénylporphine présentait un spectre de type étio, alors que la γ -méthylphylloporphyrine se caractérisait par un spectre de type phyllo (Rothemund et Menotti., 1941).

Fluorescence :

Outre la capacité d'absorber dans le visible, les porphyrines possèdent la capacité d'émettre à des longueurs d'onde supérieures à 600 nm. Cette émission se traduit par un spectre de fluorescence.

Cette fluorescence des porphyrines est très intéressante pour la PDT dans la mesure où elle permet de localiser les photosensibilisateurs utilisés ; une zone de forte fluorescence sera un signe de tumeur : la fluorescence sera donc employée pour détecter des cancers et pour observer l'évolution de la tumeur suite au traitement par PDT (Santus, 1991). Cependant, du fait du niveau bas de fluorescence et de la perte importante à travers le matériel optique, il est nécessaire d'intensifier l'image plusieurs milliers de fois (Dougherty, 1987).

6. La photooxydation :

La photooxydation est le processus de base de l'effet photodynamique qui est en fait constitué de nombreuses réactions chimiques et biologiques.

En 1976, Weishaupt et son équipe postulèrent que l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) est l'agent cytotoxique responsable de la photoinactivation des cellules tumorales (Weishaupt et al., 1976).

La photooxydation peut être partagée en deux étapes qui sont présentées ci-après.

6.1. Etape n°1 : Passage du photosensibilisateur de l'état fondamental S_0 à l'état triplet excité T_1 suite à l'absorption de lumière :

La molécule photoréactive est initialement à l'état fondamental S_0 ; suite à l'absorption d'un photon, elle va se retrouver tout d'abord à un niveau énergétique supérieur de type singulet S_1 . Une conversion intersystème entre l'état singulet S_1 et l'état triplet T_1 est alors possible bien que cette transition non radiative soit interdite : le photosensibilisateur se trouve dans l'état triplet T_1 qui peut participer à la deuxième étape de la réaction de photooxydation.



Il faut bien avoir en mémoire qu'au niveau de l'état singulet S_1 , la conversion intersystèmes $S_1 \rightarrow T_1$ n'est pas l'unique type de transition réalisée : on peut par exemple observer des phénomènes de fluorescence. Par conséquent, pour que l'effet photodynamique soit important, il sera nécessaire que l'efficacité de la conversion intersystèmes $S_1 \rightarrow T_1$ du photosensibilisateur soit très supérieure à l'efficacité des autres processus de désactivation de S_1 . Ainsi, le rendement quantique du croisement intersystèmes $S_1 \rightarrow T_1$, noté ϕ et défini comme le rapport du nombre de molécules réagissant selon le processus de photooxydation sur le nombre de photons absorbés par le système pendant le même temps, devra être

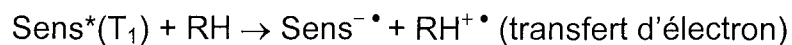
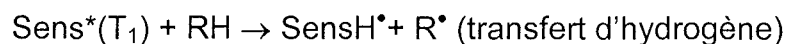
élevé pour permettre de peupler efficacement l'état triplet : les autres processus de désactivation constitueront alors des phénomènes secondaires.

6.2. Etape n°2 : Photooxydations sensibilisées à partir du photosensibilisateur à l'état triplet T_1 :

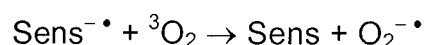
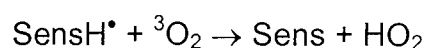
La molécule à l'état triplet T_1 constitue un agent très réactif, pouvant réagir non seulement avec les molécules du tissu où est concentré le photosensibilisateur mais aussi avec l'oxygène présent à cet endroit et apporté par le système vasculaire. Par conséquent, on distingue deux types de réaction pour cette étape : les réactions de type I et les réactions de type II (Foote, 1991).

6.2.1. Réaction de type I :

Dans ce cas, le photosensibilisateur va réagir directement avec la molécule d'un substrat réducteur : la réaction de type I est donc un transfert d'atome d'hydrogène ou d'électron à partir de ces substrats réducteurs vers la molécule photosensibilisante à l'état triplet T_1 ; il en résulte que des radicaux ou des ions radicaux vont être produits. Le schéma ci-dessous illustre les deux types de réaction possibles avec le type I (Braun et al., 1986) :



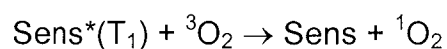
Les radicaux SensH^\bullet et les formes semi-réduites $\text{Sens}^{-\bullet}$ peuvent alors réagir, soit avec d'autres molécules RH du substrat, soit avec des molécules d'oxygène à l'état triplet fondamental ($^3\text{O}_2$). La réaction avec l'oxygène va non seulement produire des agents oxydants (anion superoxyde, hydroperoxyde) très puissants mais aussi régénérer le photosensibilisateur dans son état fondamental S_0 :



L'anion superoxyde $O_2^{\cdot -}$ va alors pouvoir oxyder des composés de la cellule. Cependant, bien qu'il possède le potentiel de réagir avec ces éléments, son réel danger repose dans sa capacité à générer des radicaux hydroxyle OH^{\cdot} hautement réactifs, qui sont souvent considérés comme les métabolites de l'oxygène les plus réactifs. Il a en effet été clairement établi que les radicaux hydroxyle OH^{\cdot} sont impliqués dans la destruction des membranes cellulaires en réagissant chimiquement avec des acides gras polyinsaturés : il en résulte alors la formation de radicaux lipidiques (L^{\cdot}), de radicaux lipidiques alkoxy (LO^{\cdot}), de peroxydes lipidiques (LOO^{\cdot}) et d'hydroperoxydes lipidiques ($LOOH$) (Ochsner, 1997). Ces produits réactionnels vont alors entraîner la déstabilisation des membranes de la cellule...

6.2.2. Réaction de type II :

Dans ce cas le photosensibilisateur à l'état triplet 3O_2 va transmettre son énergie à une molécule d'oxygène qui va passer de l'état fondamental à l'état excité singulet 1O_2 (Braun et al., 1986) :



L'oxygène singulet formé va ensuite interagir avec différentes molécules organiques riches en électrons : celle-ci vont s'oxyder et entraîner une atteinte de l'intégrité des organites de la cellule tels que la membrane plasmique, les mitochondries, les lysosomes, le noyau, le tout provoquant la nécrose de la tumeur (Dougherty et al., 1998).

En conclusion, le photosensibilisateur et la lumière sont les agents initiateurs d'une suite de diverses réactions chimiques qui aboutissent à la destruction de la tumeur. Néanmoins, face à cette photooxydation et augmentation de composés oxydants la cellule possède plusieurs moyens de défense : ainsi, pour maintenir le taux d' $O_2^{\cdot -}$ et pour empêcher sa conversion en OH^{\cdot} , la cellule dispose de la **superoxyde dismutase** (SOD) qui va éliminer $O_2^{\cdot -}$ pour former H_2O_2 et O_2 . La **catalase**, une enzyme des peroxysomes catalyse alors la dismutation d' H_2O_2 en O_2

et H₂O. De même, la glutathion peroxydase (GPO), enzyme présente dans les mitochondries et dans le cytosol de la cellule va réduire H₂O₂ et les peroxydes organiques formés (Ochsner, 1997).

Cependant, si la SOD est stable face à la photosensibilisation, la GPO et la catalase le sont beaucoup moins et seront fortement dégradées : ceci permettra ainsi l'augmentation d'agents oxydants dans la cellule et donc la destruction progressive de celle-ci.

Une étude menée par Gantchev et van Lier en 1995 a montré que la phthalocyanine dégradait la catalase au niveau de sa sous-unité héminique ce qui libérait dans le milieu du fer Fe(II) : ceci catalyse fortement la réaction d'Haber-Weiss qui produit davantage d'OH[•].

Voici un tableau regroupant les réactions impliquées dans la génération de O₂^{-•}, de H₂O₂ et d'OH[•] :

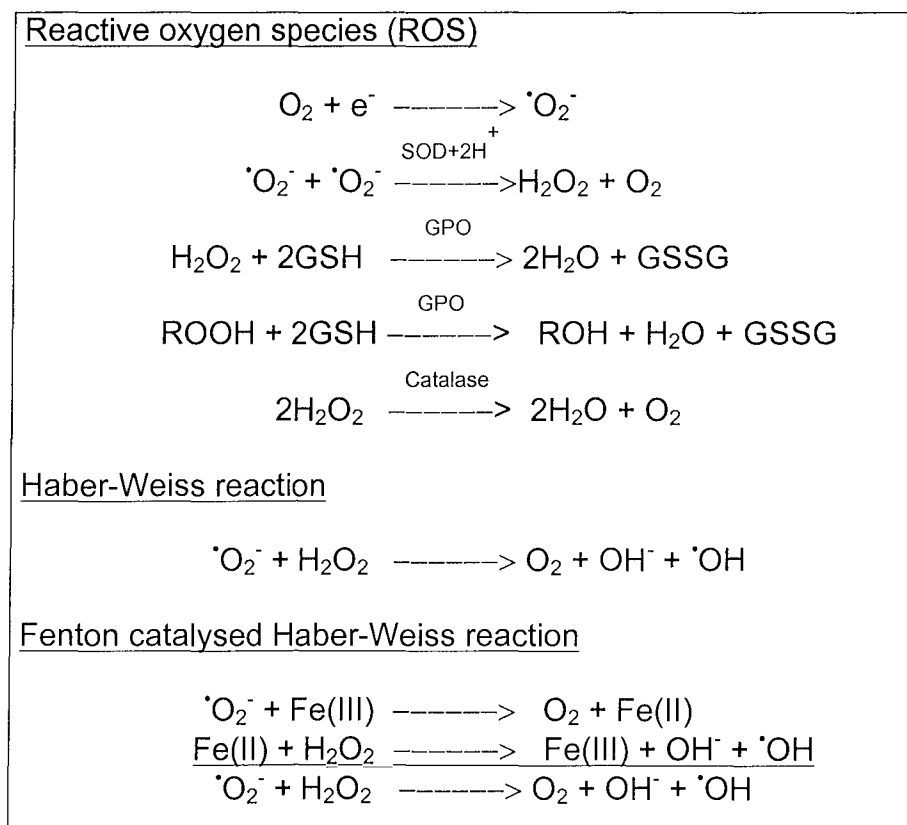


Tableau 1 : Génération d'O₂^{-•}, de H₂O₂ et d'OH[•].

Le mécanisme photochimique général de la PDT est représenté ci-dessous dans la figure 8 :

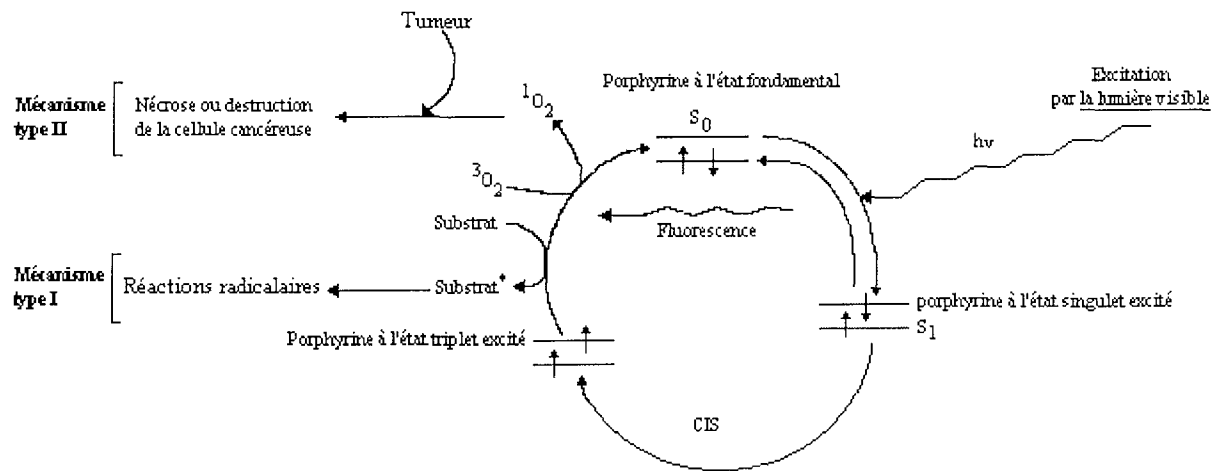


Figure 8 : Mécanisme photochimique général de la thérapie photodynamique.

2^{ème} PARTIE : LES PHOTSENSIBILISATEURS

1. Introduction :

Le choix du photosensibilisateur est d'une importance capitale pour permettre une photosensibilisation efficace. Ainsi, le composé photosensibilisant doit répondre aux critères généraux suivants :

- Le domaine d'absorption de cette molécule doit être situé dans le visible ou l'UV et impérativement dans une région spectrale où le composé à oxyder n'absorbe pas ; de cette façon, on évite des réactions secondaires indésirables.
- Le photosensibilisateur doit être inerte vis-à-vis de l'oxygène singulet et des composés à oxyder : il n'interviendra donc pas dans les réactions photochimiques.
- L'énergie de l'état triplet T_1 du photosensibilisateur doit être supérieure à celle de l'oxygène singulet afin que le transfert d'énergie soit efficace.
- La durée de vie de l'état triplet T_1 doit être assez longue afin de permettre une bonne interaction entre le photosensibilisateur et l'oxygène à l'état triplet.
- Le rendement quantique de la CIS $S_1 \rightarrow T_1$ doit être le plus grand possible pour permettre un bon peuplement de l'état triplet T_1 ; les désactivations de tout autre type devront donc être des processus secondaires de faible importance (Braun et al., 1986).

Ces conditions générales s'adressent à tout type de photosensibilisateur. En plus de ces critères, les produits utilisés en thérapie photodynamique devront posséder certaines propriétés plus spécifiques à la photochimiothérapie avec le moins d'effets secondaires possibles, une spécificité orientée vers la réaction de type II génératrice d'oxygène singulet, ...

A l'heure actuelle, on peut classer les agents photosensibilisants en deux générations exposées ci-après.

2. Les photosensibilisateurs de première génération :

Dans les années 60, Schwartz (Sternberg et al., 1998) mit au point un mélange à base d'hématoporphyrine (Hp) et de dérivés de celle-ci obtenus par l'action d'acide sulfurique et d'acide acétique sur l'Hp puis par l'action de soude. Cette préparation dont la composition était souvent variable fut appelée "Dérivé de l'hématoporphyrine (HpD)". Lipson utilisa l'HpD en combinaison avec d'autres

porphyrines telles que la protoporphyrine (PpIX) et l'uroporphyrine. Il réussit avec ces produits et des irradiations lumineuses à traiter avec succès un cancer du sein ; ceci marqua véritablement le début de la photochimiothérapie qui est donc basée sur l'utilisation de porphyrines (Sternberg et al., 1998).

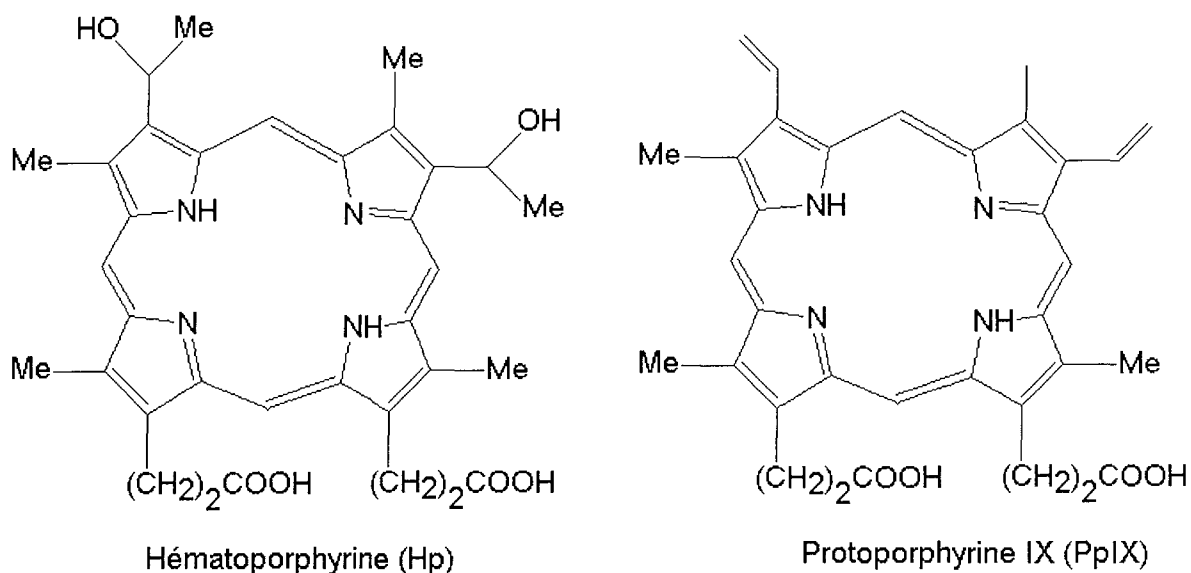


Figure 9 : Représentation de l'hématoporphyrine et de la protoporphyrine IX.

Ainsi, durant les années 70, différentes préparations d'HpD furent utilisées dans de nombreux essais cliniques. Plusieurs années après Dougherty (Sternberg et al., 1998) mis au point le PHOTOFRIN II[®], ultrafiltrat de l'HpD. Par la suite, les laboratoires canadiens QLT synthétisèrent le PHOTOFRIN[®], produit issu de nombreuses purifications et considéré comme le produit phare de la PDT.

Le PHOTOFRIN[®] est un mélange d'oligomères formant des dimères, trimères, etc. reliés par des liaisons esters ou éthers. Savoir quelle est la fraction active de ce produit n'a pas été facile ; de nombreux travaux et études ont été réalisés dans ce but. Il semblerait que seuls les dimères et trimères avec liaison éther présentent une activité photocytotoxique efficace (Pandey et al., 1988). Par ailleurs, les dimères avec des liaisons esters sont instables dans des conditions physiologiques expliquant ainsi leur inactivité alors que ceux reliés par des ponts éthers résistent parfaitement à des températures élevées. De plus, dans la mesure où les liaisons éthers sont détruites en milieu acide et que le pH des cellules tumorales est acide, il est probable que ces dimères avec des ponts éthers soient clivés en monomères lorsqu'ils pénètrent dans la cellule tumorale (Pandey et al., 1990).

Actuellement, le PHOTOFRIN[®] est indiqué dans le traitement des rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules ou du cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional antérieur (Vidal, 1999).

Le PHOTOFRIN[®] présente certes une photocytotoxicité efficace, mais il possède néanmoins certaines limites :

- Sa forte accumulation dans la peau provoque des effets secondaires importants jusque six semaines après le traitement.
- Sa longueur d'onde d'absorption correspondant à la longueur d'onde à laquelle il se trouve photoactivé est de 630 nm ; or, à cette longueur d'onde, les chromophores endogènes des tissus en particulier l'oxyhémoglobine vont également absorber la lumière créant des interférences et diminuant ainsi la photoactivation du PHOTOFRIN[®]. De plus, la dispersion de la lumière au sein du tissu va également limiter sa pénétration dans celui-ci (Miller, 1999).

La figure 10 représente la relation entre la profondeur de pénétration de la lumière dans la tumeur et la longueur d'onde de la source lumineuse. Il est intéressant de remarquer que la profondeur de pénétration lumineuse double entre 550 et 700 nm. Par contre, au-delà de 700 nm, elle n'augmente que de 10%.

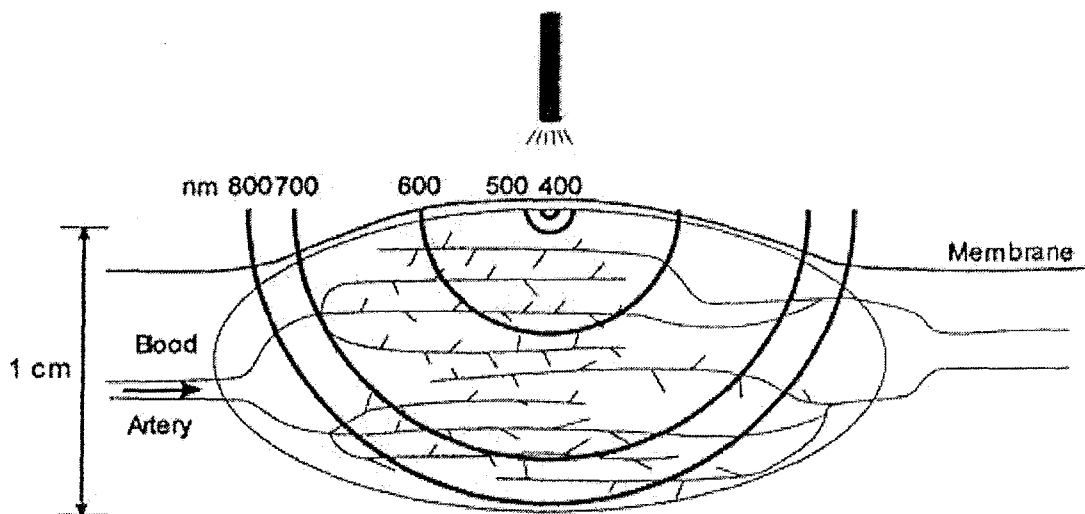


Figure 10 : Relation entre la profondeur de pénétration de la lumière et la longueur d'onde de la source lumineuse.

Les limites du PHOTOFRIN® ont entraîné dans les années 80 la réalisation de nombreux travaux et études pour de nouveaux produits photosensibilisants qui se poursuivent encore à ce jour. L'un des objectifs de ces recherches est de trouver des composés qui absorberaient à des longueurs d'onde situées dans le rouge, voire dans le proche infrarouge : ceci permettrait d'éviter les interférences précitées et d'améliorer la pénétration de la lumière dans le tissu tumoral, par conséquent d'étendre la PDT aux traitements de tumeurs plus profondes.

3. Les photosensibilisateurs de seconde génération :

3.1. Critères requis :

Les photosensibilisateurs de première génération avec le PHOTOFRIN® en tête ont permis le développement de la PDT. Mais les limites de ces composés ont contraint les chercheurs à produire les photosensibilisateurs de seconde génération : ceux-ci sont considérés comme tels, s'ils satisfont aux critères suivants (Santus, 1991, Schuitmaker et al., 1996) :

- une longueur d'onde d'absorption supérieure à 630 nm dans le but d'améliorer la pénétration de la lumière dans les tissus et de diminuer les interférences,
- une non cytotoxicité en absence de lumière,
- une absence de photosensibilité rémanente au niveau de la peau,
- une structure chimique bien définie et une pureté établie,
- une durée de vie de l'état triplet T_1 excité assez longue afin de pouvoir réagir avec l'oxygène triplet et ainsi former l'oxygène singulet,
- une bonne sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales,
- une structure offrant une bonne solubilité dans l'eau,
- un passage transmembranaire efficace,
- une énergie de l'état triplet supérieure à 94 kJ.mol^{-1} (énergie de l'oxygène singulet) (Adams et al., 1992).

3.2. Caractéristiques structurales :

L'annexe 3 regroupe différents photosensibilisateurs synthétisés au cours des dernières années et permet de conclure quant aux caractéristiques structurales que doit posséder une molécule photosensibilisante pour que son action antitumorale soit améliorée :

* Posséder des groupements hydrophiles :

Le caractère hydrophile assure au dérivé une bonne solubilité dans l'eau ; il est en général obtenu par la fixation de groupements **anioniques** tels que SO_3^- retrouvé dans la "tetraphenyl porphine trisulfonate" (TPPS₃), COO^- dans la "tetracarboxyphenylporphine" (TCPP) (Pasternack et al., 1972), de groupements **cationiques** tels que le cycle pyridinium (Kaldapa et al., 2000)...

* Posséder des groupements glycosylés :

Au niveau de la membrane de la cellule, les glycoprotéines également nommées "lectines" constituent de véritables récepteurs membranaires qui vont en plus guider la molécule réceptionnée dans différents compartiments cellulaires tels que les lysosomes, les endosomes et l'appareil de Golgi. De plus, certaines cellules cancéreuses possèdent un nombre de lectines anormalement élevé (Monsigny et al., 1994). Par conséquent, des chercheurs ont synthétisé des photosensibilisateurs possédant des groupements glycosylés dans l'espoir que ces molécules se fixent spécifiquement sur les lectines qui faciliteront leur intégration au sein de la cellule tumorale. Par ailleurs, la fixation de groupements glycosylés, de par leur bonne hydrophilie, assure aux dérivés porphyriniques une bonne solubilité dans l'eau (Sol et al., 1999).

Considérant cette caractéristique, différents travaux ont été menés :

- Porphyrines ceinturées avec des groupements glycosylés donnant à la molécule une organisation tridimensionnelle qui lui confère une structure stéréosélective propice à des réactions de catalyse (Davoust et al., 1999).

- Porphyrines avec des cycles glycosylés acétylés ou non afin d'analyser le lien entre le caractère hydrophile de ces molécules et leur action photocytotoxique (Mikata et al., 1998).
- Porphyrines avec des cycles glycosylés en position *bêta* (Fülling et al., 1989 ; Ono et al., 1992), en position *méso* (Cornia et al., 1994), sur des groupements *méso*-aryles (Driaef et al., 1993, 1996 ; Oulmi et al., 1995), sur des groupements *méso*-porphyrinyles (Li et Czuchajowski, 1994).

Un récapitulatif des méthodes de synthèse des porphyrines substituées en position *méso* figure en annexe 4.

* Posséder des groupements lipophiles :

La présence de groupements lipophiles assurerait une bonne pénétration dans la membrane plasmique (Schell et Hombrecher, 1999). Parmi ceux-ci, on trouve les résidus aryles, acétyles...

* Posséder un bras espaceur entre le squelette porphyrine et les groupements substitués :

Ces bras espaceurs vont permettre le greffage d'éléments en diminuant les problèmes d'encombrement stérique éventuels ; de plus, ils permettent aux groupes de substitution d'assurer pleinement leur fonction (vectorisation, lipophilie, hydrophilie) ceux-ci n'étant pas en interaction directe avec la structure de base porphyrine (Sylvain et al., 1999).

* Posséder des groupements S-glycosylés :

En comparaison avec les porphyrines O-glycosylées, les dérivés porphyrine S-glycosylés pourraient empêcher le clivage des liaisons glycosylées catalysé par des glycosidases (Sylvain et al., 1999). La demi-vie de ces composés serait donc augmentée.

* Greffer des vecteurs :

Les molécules vectrices ont pour rôle le ciblage des dérivés porphyrine spécifiquement vers les cellules tumorales ; ceci devrait permettre d'améliorer leur efficacité et par conséquent de diminuer leur toxicité.

Outre la présence d'unités glucidiques, différents vecteurs ont été utilisés :

- Des **petits peptides** reconnus spécifiquement par la cellule tumorale tels que des groupements alanyle (Sol et al., 1997), séryle (Sol et al., 1999).
- Des **groupements dérivés de l'estradiol** : ils permettront de cibler l'action photocytotoxique au niveau des cellules possédant de nombreux récepteurs aux estrogènes ce qui augmente considérablement la capture des estrogènes par ces cellules ; celles-ci sont observées dans les cas de cancer du sein, de l'ovaire par exemple (Montforts et al., 1992 ; James et al., 1999).
- Des **groupements d'acridone** : l'acridone est une molécule qui va s'insérer au niveau de l'ADN du noyau entraînant sa destruction. L'acridone parvient à pénétrer le noyau des cellules contrairement aux porphyrines qui restent au niveau de la membrane nucléaire. Par conséquent, le dérivé porphyrine-acridone permettra d'accroître l'activité nucléasique (Mehta et al., 1993).

* Utiliser des dimères et trimères de porphyrines reliés par des ponts éther :

Les molécules actives du Photofrin sont des dimères et trimères de porphyrines reliés par des ponts éther. A partir de ces structures, des premières synthèses de dimères et trimères de porphyrine ont été réalisées (Pandey et al., 1988, 1990). Récemment, une équipe a étudié les différences de photoactivité entre des dimères de porphyrine glycosylés neutres et cationiques (Kaldapa et al., 2000).

* Utiliser des chlorines, des bactérochlorines, des phthalocyanines, des naphthalocyanines :

Ces composés présentent des longueurs d'onde d'absorption plus grandes que celles du PHOTOFRIN® donc permettraient d'utiliser la PDT dans des zones tissulaires plus profondes. Des études ont été menées sur des chlorines et bactérochlorines (Adams et al., 1992 ; Pandey et al., 1996), sur des phthalocyanines (Maillard et al., 1989).

Des premières synthèses de photosensibilisateurs de deuxième génération à celles d'aujourd'hui, on est parvenu à tirer des caractéristiques générales pour ces composés ; le caractère **amphiphile** apparaît comme un élément important pour faciliter la pénétration membranaire et la solubilité dans l'eau ; de plus, l'utilisation de **vecteurs** tels que des sucres, des petits peptides pourraient améliorer la spécificité d'action des molécules photosensibilisantes... Plusieurs équipes ont donc combiné ces paramètres pour améliorer la photocytotoxicité de leurs dérivés.

A côté de ces caractéristiques, d'autres éléments doivent être considérés : ainsi, le produit photosensibilisant ne devra pas s'agréger car l'**agrégation** diminue la photoactivité (Schell et Hombrecher, 1999). L'aspect **configurationnel** est aussi à prendre en compte : certains produits seront plus actifs en configuration *trans* et d'autres en configuration *cis* (Davoust et al., 1999)...

4. Le futur :

4.1. Ac monoclonaux et 5-Ala :

Les paramètres précités amènent à penser qu'il ne sera pas possible de réaliser un composé photosensibilisant universel. Depuis peu, d'autres axes d'étude sont empruntés.

Des **photosensibilisateurs couplés à des anticorps monoclonaux** ont été synthétisés. Ceci améliorerait non seulement l'affinité du composé pour la cellule tumorale ciblée mais aussi sa spécificité d'action, atténuant ainsi les effets

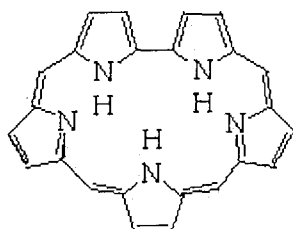
indésirables. Ce nouveau type de dérivés a été testé sur des cellules humaines de cancer du colon (Del Governatore et al., 2000), sur des cellules murines de cancer de l'ovaire (Goff et al., 1991) ; les résultats observés sont encourageants.

Des **inducteurs endogènes** de composés photosensibilisants tels que l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA), précurseur de la PpIX, photosensibilisateur endogène (Schuitmaker et al., 1996) ont également été étudiés. Le 5-ALA présente en effet certains avantages tels qu'une spécificité tissulaire, une clairance rapide de la PpIX induite et la possibilité d'une application topique (Rück et Diddens, 1996).

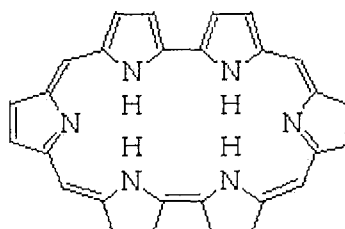
4.2. Les texaphyrines :

4.2.1. Généralités :

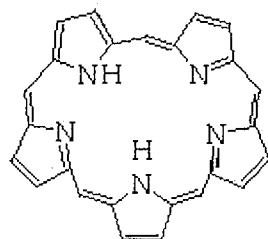
Les « **Texaphyrines** », nouvelle classe de porphyrines créée en 1988 par le professeur Sessler et son équipe à l'Université du Texas à Austin, USA, sont des porphyrines expansées, c'est-à-dire possédant un squelette de plus de 16 atomes (Sessler et al., 1988).



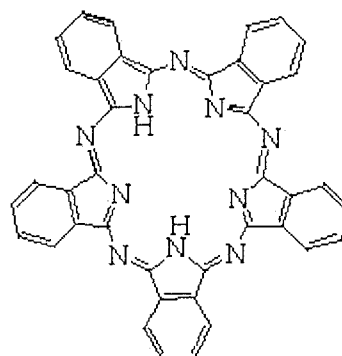
Sapphyrin



Rubyrin



Pentaphyrin



Superphthalocyanine

Figure 11 : Exemples de porphyrines expansées.

Les texaphyrines possèdent une cavité liante de 20% plus large que les porphyrines naturelles ; de plus, elles comptent cinq atomes d'azote qui assurent des liaisons stables, non labiles avec des métaux. Les texaphyrines complexées avec des métaux de la série des lanthanides tels que le gadolinium, le lutetium présentent un intérêt particulier ; en effet, ces complexes sont beaucoup plus stables que ceux réalisés avec des porphyrines classiques (Sessler et al., 1993).

4.2.2. Les texaphyrines et la PDT :

Les recherches de Sessler et des laboratoires Pharmacyclics ont débouché sur l'élaboration de deux composés : il s'agit de l'ANTRIN[®] et du LUTRIN[®].

L'ANTRIN[®] et le LUTRIN[®] sont des texaphyrines métallées avec l'ion lutetium (III). L'avantage de cette nouvelle classe réside dans leur bonne solubilité dans l'eau donc une utilisation possible en intraveineuse et surtout leur longueur d'onde d'excitation **entre 720 et 760 nm**. Ceci permet d'envisager des applications de la PDT dans des tissus profonds ; de plus, ces valeurs de longueurs d'onde diminuent fortement les effets parasites des chromophores endogènes des tissus.

En février 2000, le LUTRIN[®] était en phase II des essais cliniques pour les cancers du sein, l'ANTRIN[®] en phase I d'essais cliniques des maladies coronariennes et en phase II pour le traitement de l'athérosclérose (Sessler et Miller, 2000). Une autre application des métallotexaphyrines en tant que photosensibilisateurs se trouve dans la régulation de l'expression génique. Ces composés peuvent être attachés à des oligonucléotides pour produire des conjugués capables d'induire photochimiquement le clivage spécifique de certains sites des molécules d'ADN (Magda et al., 1995).

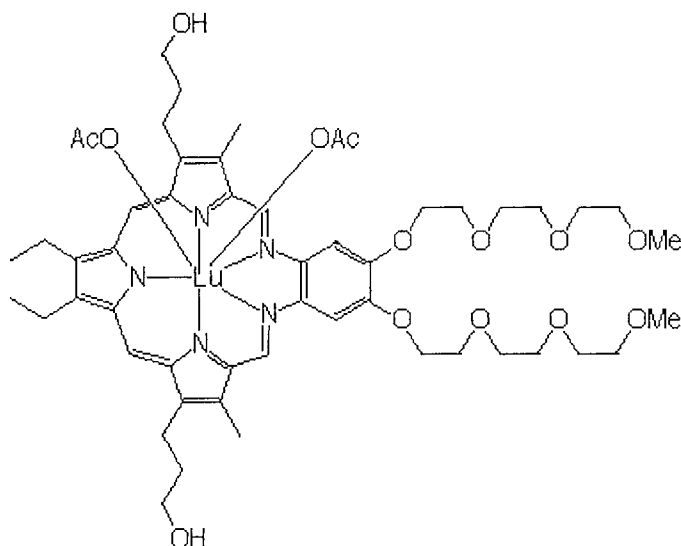


Figure 12 : Structure moléculaire du LUTRIN®.

4.2.3. Synthèse des texaphyrines :

Sessler et son équipe ont développé une méthode de synthèse des texaphyrines qui a été optimisée et adaptée ultérieurement par les laboratoires Pharmacyclics pour une application pharmaceutique. La synthèse de diacétate de gadolinium texaphyrine (XCYTRIN®) présentée ci-après illustre la stratégie générale à adopter pour préparer des métallotexaphyrines.

Tout d'abord deux sous-unités pyrroliques (un acétoxypyrrole et un diéthylpyrrole) sont préparées séparément. Celles-ci sont ensuite couplées au cours d'une succession d'étapes rapides pour conduire au tripyrrane. L'ajout de diaminobenzène permet d'élaborer un macrocycle non aromatique. Dans l'étape finale, ce macrocycle non aromatique est déprotonné, métallée avec l'ion gadolinium (III) et oxydé pour mener à la structure de métallotexaphyrine (Sessler et al., 1993).

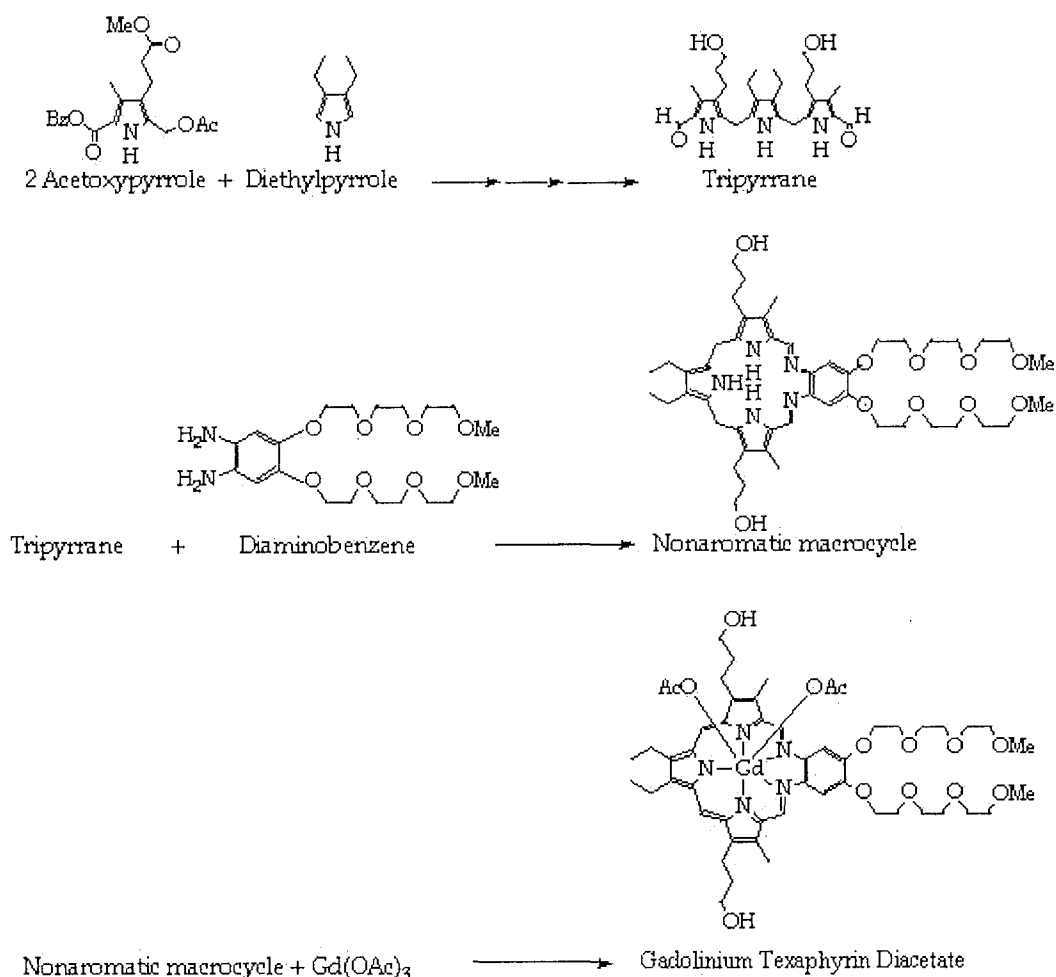


Figure 13 : Schéma général de synthèse du diacétate de gadolinium texaphyrine.

5. Localisation des photosensibilisateurs :

5.1. Paramètres intervenants :

Les travaux d'Auler, de Figge puis de Lipson sur les porphyrines ont conclu à la sélectivité de celles-ci pour les cellules tumorales ceci de façon plus ou moins prononcée. Depuis, de nombreuses études ont été menées et nous permettent de lister différents facteurs intervenant dans la sélectivité de l'agent photosensibilisant vis-à-vis de la cellule tumorale.

* Lipophilie et LDL :

Initialement, on pensait que l'albumine était la principale molécule sérique se liant aux photosensibilisateurs (Moan, 1986). Il a même été montré que les photosensibilisateurs qui se fixent préférentiellement sur le site II de l'albumine développaient la meilleure efficacité (Tsuchida et al., 1997). Néanmoins, ces composés se lient également à différentes protéines dans le sang. Et bien que le taux de lipoprotéines dans le sang soit nettement inférieur à celui de l'albumine, il ne faut pas négliger ces molécules (Reyftmann et al., 1984). En effet, il s'avère que les photosensibilisateurs se fixent aux lipoprotéines tout particulièrement aux LDL (Low Density Lipoproteins), ceci d'autant plus qu'ils seront hydrophobes (Jori et al., 1984).

La cellule tumorale a besoin de cholestérol pour élaborer sa membrane. Celui-ci est synthétisé au niveau du foie puis acheminé vers les cellules grâce aux LDL. Celles-ci se fixeront sur des récepteurs spécifiques aux LDL situés au niveau du glycocalyx des cellules ce qui permettra leur entrée dans la cellule (Stryer, 1997). Ainsi, on a constaté que les cellules tumorales présentaient au niveau de leur membrane plasmique un nombre de récepteurs aux LDL nettement supérieur à la normale : par conséquent, les agents photosensibilisants liés aux LDL vont s'accumuler beaucoup plus au niveau des cellules tumorales qu'au niveau des cellules saines (Miller, 1999).

* Le pH :

Thomas et Girotti ont administré du glucose au niveau de cellules tumorales placées en anaérobie. Le glucose a alors été transformé en acide lactique ce qui a diminué fortement le pH de ces cellules. Ils ont observé parallèlement à cette baisse de pH que l'accumulation de l'HpD augmentait (Thomas et Girotti, 1989).

Ces résultats ont récemment été appuyés par Ma et son équipe (Ma et al., 1999) : ils ont montré en effet qu'une ou des injections de glucose baisse le pH et augmente l'accumulation de mTHPC (m-Tetrahydroxyphenylchlorin) dans la tumeur. De plus, ils ont observé que l'effet anti-tumoral de la PCT était accru quand on refroidissait la tumeur à 5°C. Par conséquent, le refroidissement et une injection de glucose combinés augmentent l'efficacité de la PDT.

Par ailleurs, les tumeurs ont en général un pH nettement plus bas que les cellules normales (Lagerberg et al., 2000) ; ainsi, si la lipophilie du photosensibilisateur utilisé

augmente avec une baisse de pH, on parviendra à augmenter encore plus la sélectivité de cette molécule vis-à-vis des cellules tumorales par rapport aux autres cellules.

Moan et ses collaborateurs (Moan et al., 1987) ont étudié l'évolution de la lipophilie de certains photosensibilisateurs en fonction du pH. Les composés utilisés sont des dérivés de porphyrines, des phthalocyanines, molécules absorbant fortement dans la lumière rouge (Spikes, 1986), des chlorines et le Photofrin II. La figure 14 représente les résultats. La lipophilie de ces produits est exprimée à l'aide du coefficient de partition K, rapport entre la concentration du produit dans le Triton X-114 et dans l'eau.

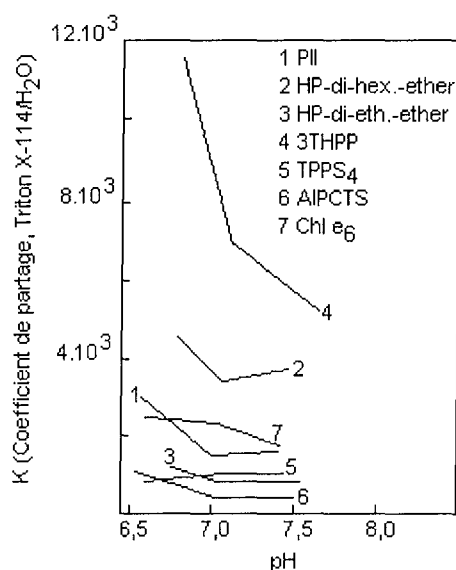


Figure 14 : Evolution de la lipophilie de photosensibilisateurs en fonction du pH.

On remarque que tous les produits testés ont leur lipophilie qui augmente avec une baisse de pH à l'exception du TPPS₄. Le 3THPP présente les meilleurs résultats. Cependant il faut noter que le TPPS₄ malgré tout a une bonne sélectivité vis à vis des cellules tumorales. Par conséquent, si la molécule a sa lipophilie qui augmente quand le pH diminue, cela va jouer favorablement sur la sélectivité du produit vis-à-vis de la tumeur, mais ce paramètre n'est pas absolument nécessaire.

En conclusion, la capture et la rétention des dérivés des porphyrines au niveau de la tumeur dépendra essentiellement de certaines propriétés du tissu tumoral, telles qu'une faible vascularisation, un pauvre drainage lymphatique, la présence de macrophages qui vont capturer les molécules agrégantes, un pH faible, une concentration élevée en lipoprotéines, tout particulièrement en LDL (Moan, 1986).

5.2. Passage de la membrane plasmique :

Les photosensibilisateurs peuvent entrer dans les cellules soit directement par passage à travers la membrane plasmique, soit par endocytose. La membrane plasmique est traversée par diffusion simple, par diffusion facilitée ou par des mécanismes de transport actifs (Berg et Moan, 1997). Ces différents types de transport sont rappelés dans la figure 15.

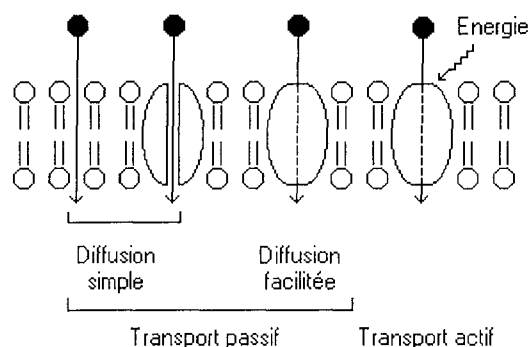


Figure 15 : Les modes de transport membranaire des photosensibilisateurs.

Ce passage transmembranaire est dépendant de plusieurs facteurs tels que les propriétés chimiques de la molécule, sa taille, son hydrophobicité, sa charge et son caractère amphiphile (Woodburn et al., 1991). Il faut également prendre en compte le fait que les photosensibilisateurs peuvent être sujets à l'agrégation. La structure agrégante va alors posséder des propriétés complètement différentes de celles observées pour une molécule seule. Ainsi, les gros agrégats dans la plupart des cas ne pourront pas entrer dans la cellule, sauf s'il s'agit de phagocytes, alors

que les plus petits agrégats entreraient dans les cellules par endocytose (Berg et Moan, 1997).

On a longtemps pensé que les molécules photoréactives liées aux LDL entraient dans la cellule en suivant l'endocytose des LDL, ce qui était en contradiction avec différentes études où il était observé des photosensibilisants ailleurs que dans les endosomes et dans les lysosomes, entités où les LDL sont retrouvées. En fait, il semble que le complexe LDL-photosensibilisateur se fixe sur le récepteur LDL au niveau d'un puits recouvert de molécule de clathrine ; mais une fois la LDL liée à son récepteur, la molécule photosensibilisatrice quitterait la LDL pour diffuser à travers la membrane plasmique (Rodal et al., 1998) comme l'indique la figure 16.

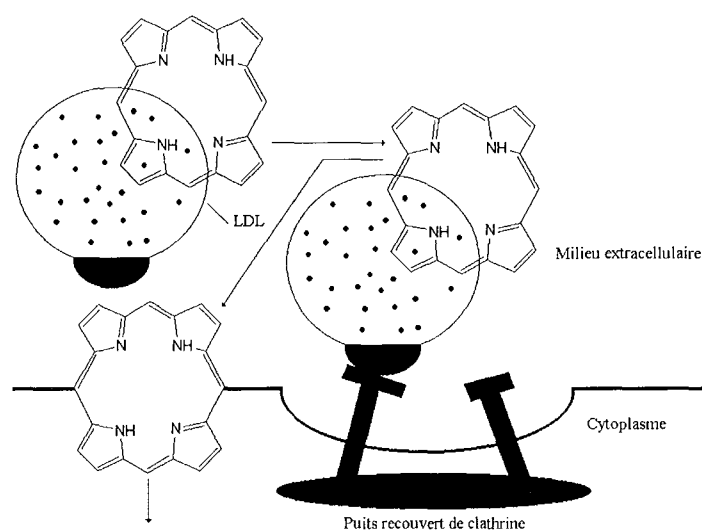


Figure 16 : Capture des photosensibilisateurs fixés aux LDLs.

La figure 17 retrace les différentes voies que peuvent emprunter les agents photosensibilisants afin de rentrer dans la cellule tumorale. On remarque que le photosensibilisateur sera localisé dans des endroits différents de la cellule en fonction du mode de pénétration à travers la membrane plasmique.

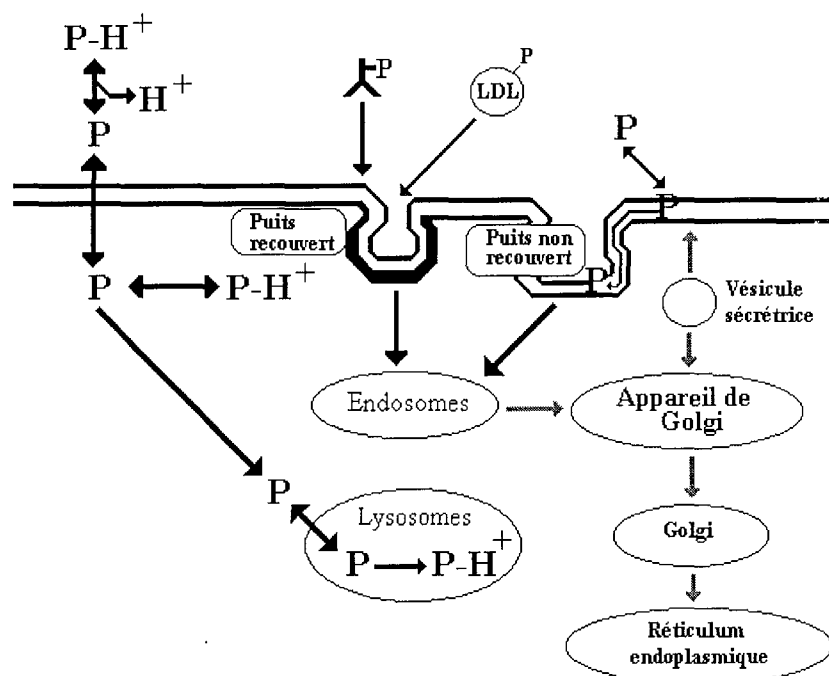


Figure 17 : Mécanismes de capture liés à la localisation des photosensibilisateurs.

5.3. Localisation dans la cellule :

Comme les molécules photosensibilisantes pour la plupart sont fluorescentes, il est aisé d'évaluer la localisation de ces produits au sein de la cellule par microscopie de fluorescence, à condition de mettre au point un système sensible permettant de contrer les effets parasites occasionnés par les phénomènes de photoblanchiment (Dougherty et al., 1998). De plus, comme l'action photocytotoxique de ces molécules est directement liée à la production d'oxygène singulet, que celui-ci a une durée de vie très courte (1 à 3 μ s), que sa diffusion cellulaire se limite à 20 nm (Bisland et al., 1999), on pourra aussi relier les sites de dommages cellulaires au moment de l'irradiation avec la localisation des photosensibilisateurs (Woodburn et al., 1992).

La plupart des molécules photosensibilisantes sont localisées dans les compartiments cellulaires suivants : membrane plasmique, mitochondrie, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes, région périnucléaire (Ochsner, 1997) ceci de façon plus ou moins importante. Par exemple, les images de fluorescence de la mTHPC ont montré une localisation diffuse de ce composé dans différents compartiments du cytoplasme mais pas dans le noyau (Melnikova et al., 1999). De plus, les photosensibilisateurs hydrophiles sont pour la plupart capturés par endocytose et sont localisés préférentiellement dans les lysosomes. Les composés

lipophiles sont souvent retrouvés dans les membranes cellulaires notamment les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique (Sailer et al., 2000).

Orienter les photosensibilisateurs vers une cible unique pourrait accroître leur cytotoxicité ; récemment, des chercheurs ont utilisé des molécules intracellulaires telles que des peptides linéaires ou branchés dits « loligomères » (du latin *loligo*, en référence aux membres de la seiche) et les ont greffés aux agents photosensibilisants afin de cibler et potentialiser leur action photocytotoxique. Les résultats sont encourageants (Bisland et al., 1999) et offrent une nouvelle voie de recherche : la vectorisation par des agents intracellulaires qui joueraient le rôle de navette guidante entre la membrane plasmique et le site d'action désiré : ceci permettrait d'optimiser l'action du photosensibilisateur et par conséquent de diminuer non seulement sa dose thérapeutique mais aussi ses effets secondaires.

6. Apoptose et nécrose :

La cascade réactionnelle suivant la photoactivation du photosensibilisateur conduit à la production de composés délétères pour la cellule atteinte : la nécrose ou lyse de la cellule et l'apoptose correspondant à la mort programmée de la cellule.

6.1. Apoptose :

L'apoptose est une forme morphologiquement reconnaissable de mort cellulaire qui est mise en œuvre par un mécanisme conservé à travers l'évolution, des nématodes à l'homme (Vaux et Strasser, 1996) : l'apoptose coïncide avec la libération de cytochrome C des mitochondries (Kessel et Luo, 1998), avec l'activation de caspases, avec le clivage de protéines cellulaires ainsi qu'avec la condensation de la chromatine et la fragmentation caractéristique de l'ADN qui s'effectue selon des stades bien ordonnés (Agarwal et al., 1991). De plus, l'apoptose n'est pas accompagnée de phénomènes inflammatoires (Carson et Ribeiro, 1993). Des désordres ioniques sont aussi constatés à savoir une forte réduction des concentrations de sodium et surtout de potassium et par conséquent une diminution du volume cellulaire (Bortner et Cidlowski, 1998).

6.2. Nécrose :

La nécrose contrairement à l'apoptose ne s'accompagne pas de fragmentation d'ADN, d'activation de caspase ou de clivage de protéines cellulaires en dépit de libération de cytochrome C des mitochondries (Samali et al., 1999). On observe une perte de contrôle du flux ionique : l'eau pénètre librement dans la cellule qui se gonfle et la membrane plasmique éclate. Parallèlement, les mitochondries gonflent, les autres organites boursoufflent : les lysosomes se lysent et déversent leur contenu dans la cellule ; les enzymes hydrolytiques ainsi libérés entraînent la destruction de la cellule (Desoize et Sens, 1992). Kressel et Groscurth, 1997 ont observé une fragmentation de l'ADN, mais 24 heures après l'induction de la nécrose par de l'ionomycine ; de plus cette fragmentation n'est pas caractérisée par une morphologie type mais donne des brins de toutes tailles possibles ; à l'électrophorèse, on constate une seule bande qui traîne sur toute la longueur de la migration. Le tableau ci-dessous présente les différences principales entre la nécrose et l'apoptose (Desoize, 1994) :

Caractéristiques	Nécrose	Apoptose
Condition de la mort	accidentelle	programmée
Mode	passif	actif (ATP dépendant)
Volume de la cellule	augmenté	diminué
Densité cellulaire	diminuée	augmentée
Concentration cytoplasmique en Ca^{++}	diminuée	augmentée
Lyse de la membrane plasmique	1 ^{ère} étape	dernière étape
Hydrolyse de l'ADN	dernière étape	première étape
Vitesse d'accomplissement	rapide	lente
Organites cellulaires	lysés	compacts
Réaction inflammatoire	oui	non
Cicatrisation	cicatrice fibreuse	pas de cicatrice

Tableau 2 : Comparaison des caractéristiques principales de la mort par nécrose et par apoptose.

6.3. Constatation :

La nécrose et l'apoptose sont étroitement liées au degré de destruction de la membrane plasmique : ainsi, en général, plus celle-ci est détruite, plus on observera une nécrose.

Ceci a été en partie confirmé lors d'une étude qui utilisait deux photosensibilisateurs différents : d'une part, le SnOPA (Tin octaethylpurpurin amidine), composé ciblant préférentiellement les lysosomes, les mitochondries et les membranes cellulaires ; d'autre part, le SnET (Tin etiopurpurin) retrouvé dans les lysosomes et les mitochondries mais pas dans les membranes cellulaires. Au cours de ces travaux, on observa une réponse apoptotique lors de l'utilisation de SnET et une nécrose avec l'emploi de SnOPA. Il semblerait donc que les photosensibilisateurs localisés dans la membrane plasmique et entraînant sa destruction conduisent plus à une nécrose qu'à l'apoptose (Kessel et al., 1997). En fait, l'apoptose serait un phénomène apparaissant suite aux réactions de photooxydations ; l'atteinte ultérieure des membranes cellulaires stopperait l'apoptose qui laisserait place à la nécrose (Dellinger, 1996). Ce serait donc plus l'action destructrice sur la membrane que la localisation du photosensibilisateur au niveau de celle-ci qui semble primordiale.

7. Nouvelles applications de la PDT :

La thérapie photodynamique trouve sa principale application dans le traitement de différents types de tumeurs ; ainsi, de nombreuses études et essais cliniques ont été réalisés dans ce domaine : traitement des cancers du poumon, de l'estomac, de la vessie, de l'œsophage... (Dougherty, 1993). Pour le cancer du poumon, certains préconisent une approche multimodale pour augmenter l'efficacité de la thérapie : PDT, radiation et chimiothérapie (Ost, 2000). D'autres ont constaté dans le cas de cancers récurrents du nasopharynx qu'une action combinée de la PDT et de la chimiothérapie semblait prolonger la survie de ces patients (Kulapaditharom et Boonkitticharoen, 1999). La PDT s'est également avérée efficace dans le traitement de tumeurs bénignes de la peau ainsi que de cancers cutanés (Kalka et al., 2000)

Parallèlement à ces applications directes en oncologie, d'autres utilisations de la PDT ont vu le jour ; récemment la PDT a été utilisée pour atténuer et soulager les dysphagies dues à un cancer de l'œsophage inopérable (Moghissi et al., 2000). Les applications de la PDT en dehors de la cancérologie se classent en deux types : les ablations de tissu et la modulation du comportement cellulaire (Levy et Obochi, 1996).

Concernant l'ablation de tissu, la PDT a été employée après une angioplastie transluminale pour prévenir la resténose (Overhaus et al., 2000) ou pour traiter l'athérosclérose (Fan et Miller, 1999). La thérapie photodynamique est également en usage dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) : la DMLA est la principale cause de cécité rencontrée chez les personnes de plus de 50 ans. Celle-ci apparaît suite à la formation de néo-vaisseaux autour de la rétine qui vont libérer du plasma et des hématies. La faible clairance de ces éléments au niveau de l'œil ainsi que le tissu cicatriciel formé et la fibrose développée autour de la rétine va entraîner une diminution progressive de la vision (Lévy, 1999). Toujours dans le domaine de l'ablation de tissu, la PDT est utilisée dans le cas des saignements dysfonctionnels utérins : l'ablation de l'endomètre par la PDT permet d'éviter l'hystérectomie (Lévy et Obochi, 1996).

Concernant la modulation immunologique, la PDT pourrait entraîner une suppression de la réponse immunologique ; cela constituerait une voie d'étude intéressante dans le domaine de la greffe, de la polyarthrite rhumatoïde (PAR) (Trauner et Hasan, 1996).

Enfin, des études utilisant la PDT pour supprimer la dissémination de cellules tumorales grâce au flux sanguin ont donné des résultats prometteurs. La PDT parvient à détruire les cellules tumorales circulant dans le sang sans atteindre les composés sanguins (Fischer et al., 1998).

3^{ème} PARTIE : SYNTHES

1. Introduction :

Lors de ma microthèse d'ingénieur ENSIC, mon travail au sein du DCPR-GRAPP consistait à synthétiser de nouveaux produits photosensibilisants c'est-à-dire de structure différente de ceux décrits dans la littérature.

La recherche bibliographique (cf. partie 2 et annexe 3) a amené notre équipe à synthétiser un photosensibilisateur qui aurait le squelette de la PpIX sur lequel seraient greffés des groupements glucosamine ; la nouveauté est que ces groupements glucosamine seraient reliés à la PpIX grâce à des liaisons amide et non par des liaisons éther comme cela a déjà été le cas (Mikata et al., 1998) : l'étude a commencé avec la **Protoporphyrine IX 13,17-Bis(1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-amido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose)**.

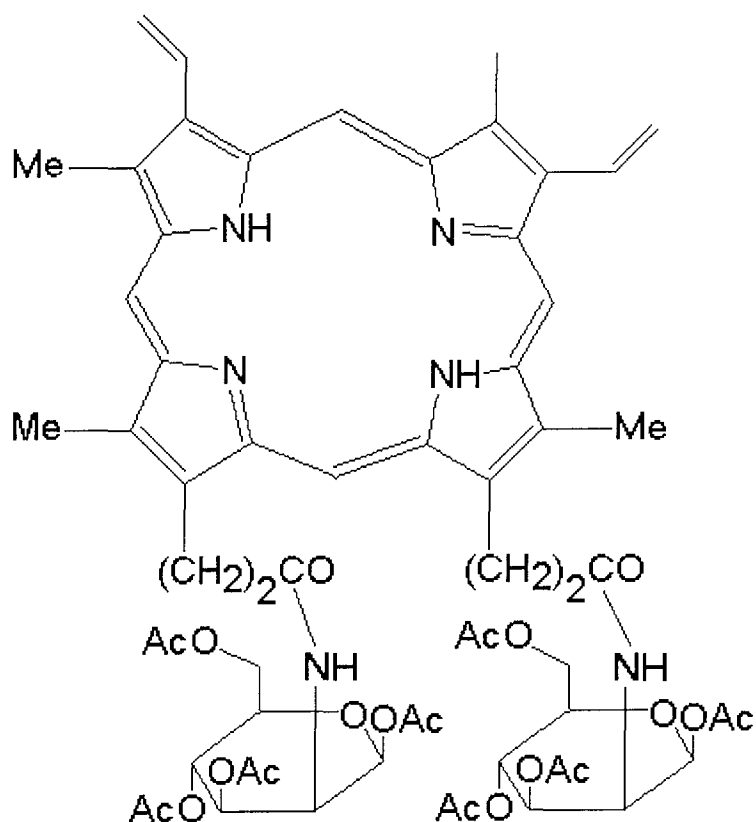


Figure 18 : PpIX (bis) glucosamide acétylée.

La suite de cette partie expose les différentes voies de synthèse utilisées pour élaborer ce photosensibilisateur.

2. Synthèses de la PpIX (bis) glucosamide acétylée :

2.1. Schéma de la première voie de synthèse :

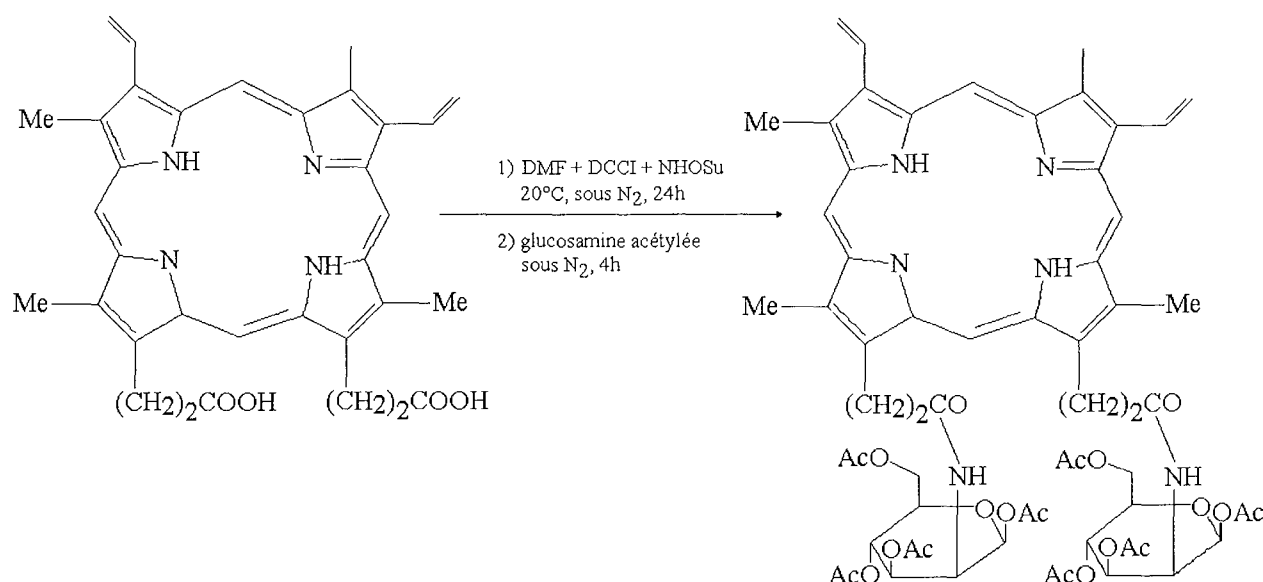


Figure 19 : Première voie de synthèse de la PpIX glucosamidée.

Nous avons fait réagir la protoporphyrine IX dans un premier temps avec le 1,3-dicyclohexylcarbodiimide (DCCI) et le N-hydroxysuccinimide (NHOSu) pour donner un ester de succinimide et de l'urée. Cette forme activée de la PpIX devant ensuite réagir avec la glucosamine acétylée pour donner la porphyrine glucosamide acétylée.

Il est impératif de réaliser ces réactions à l'abri de la lumière afin d'éviter toute photodégradation du composé porphyrine. De plus, la circulation d'azote lors des réactions évitera au dérivé porphyrine de réagir avec l'oxygène de l'air. Ces mesures sont nécessaires pour éviter la dégradation de la PpIX glucosamide acétylée.

2.2. Schéma de la deuxième voie de synthèse :

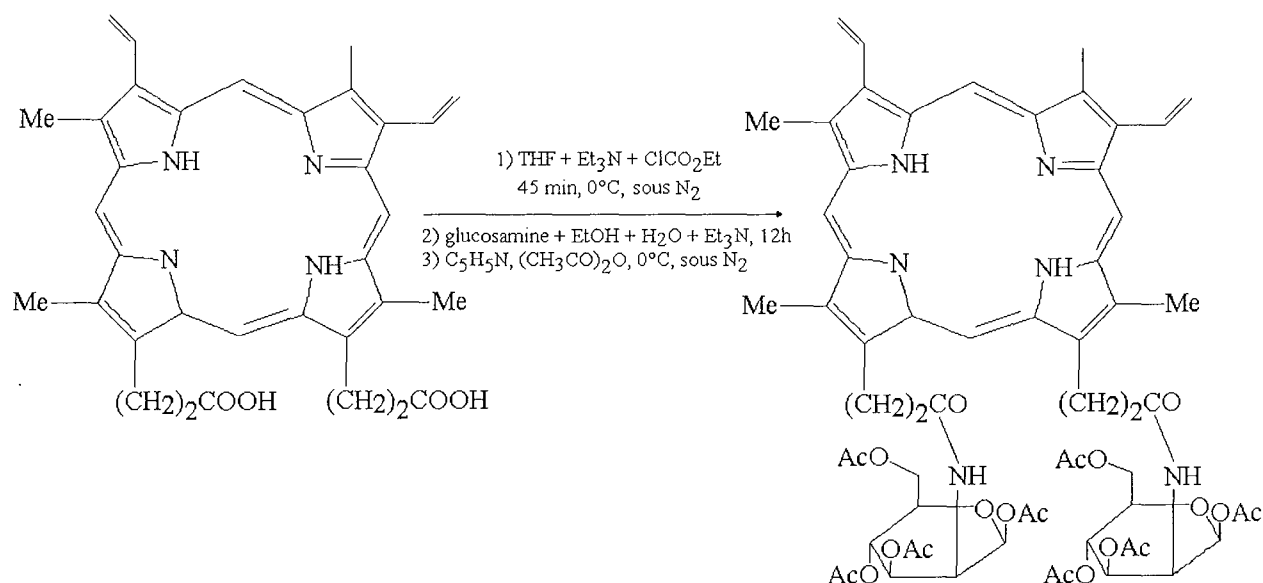


Figure 20 : Deuxième voie de synthèse de la PpIX glucosamidée.

La protoporphyrine IX dans un premier temps réagit avec le chloroformiate d'éthyle pour donner un dérivé anhydride. Une deuxième étape de glucosamination utilisant le chlorhydrate de glucosamine non acétylée conduit à la PpIX glucosamide non acétylée. Une troisième étape d'acétylation va aboutir à la formation de la PpIX glucosamide acétylée.

2.3. Schéma de la troisième voie de synthèse :

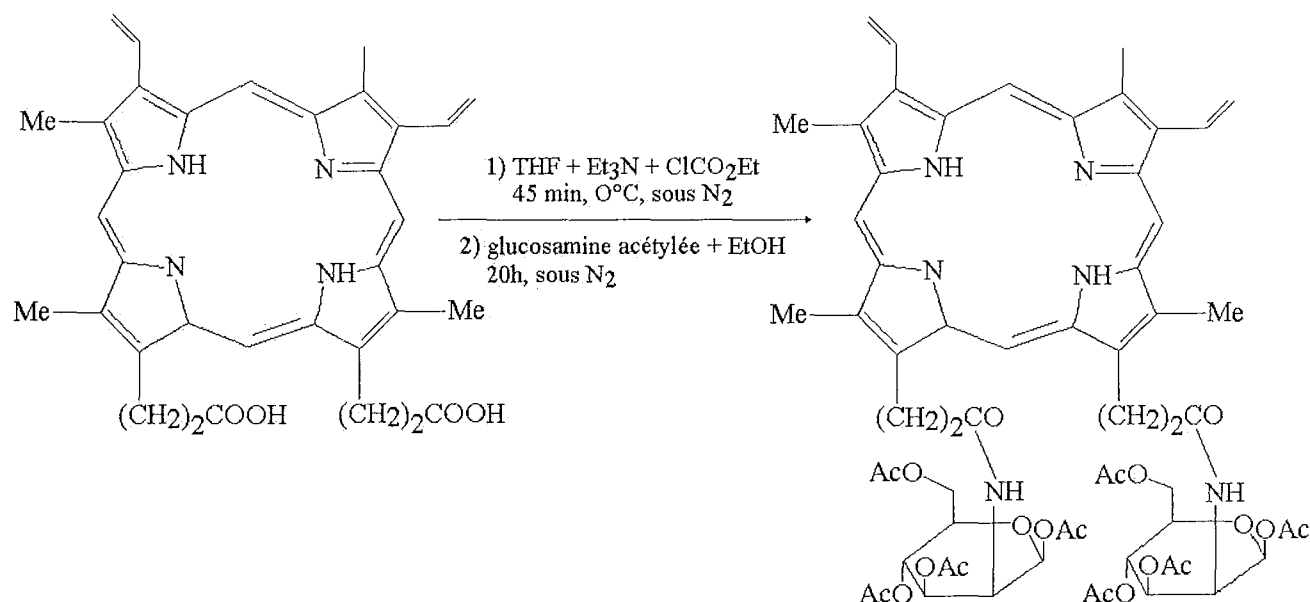


Figure 21 : Troisième voie de synthèse de la PpIX glucosamidée.

La protoporphyrine IX dans un premier temps réagit avec le chloroformiate d'éthyle pour donner un dérivé anhydride. Une deuxième étape de glucosamination utilisant le chlorhydrate de glucosamine acétylée conduit à la PpIX glucosamide acétylée.

Cette troisième voie de synthèse se démarque donc de la deuxième voie de synthèse par le fait que l'acétylation de la glucosamine est antérieure à la réaction avec la protoporphyrine IX. Ceci nous permet d'assurer la totale acétylation de la glucosamine.

CONCLUSION

Même si le PHOTOFRIN® est encore considéré actuellement comme le chef de file des produits photosensibilisants utilisés en thérapie photodynamique, le développement de photosensibilisateurs de deuxième génération et les essais cliniques en cours, notamment ceux de l'ANTRIN® et du LUTRIN® laissent envisager un avenir prometteur à la PDT. Ceci est d'autant plus vrai que cette spécialité a vu s'élargir son champ d'action ; ainsi, outre son indication dans certains cancers, la PDT pourrait être appliquée dans les traitements de l'athérosclérose, de la dégénération maculaire liée à l'âge (DMLA), du psoriasis, de la polyarthrite rhumatoïde, etc.

Les synthèses réalisées au sein du DCPR-GRAPP ont commencé avec un dérivé de la Protoporphyrine IX : la Protoporphyrine IX 13,17-Bis(1,3,4,6-tétra-O-acétyl-2-amido-2-desoxy- α,β -D-glucopyranose).

La caractéristique principale de cette molécule est la liaison amide entre le groupement amine de la tétra-O-glucosamine acétylée et la(les) fonction(s) carboxylique(s) du squelette porphyrinique. La prochaine étape à envisager est de tester ce composé sur des cellules afin d'évaluer sa photoactivité, sa toxicité... Tout en gardant la spécificité "liaison amide", d'autres synthèses pourraient être étudiées, telles que le greffage de groupements aryles, le greffage de cycle glucosamine non acétylée, le greffage d'autres groupements aminés. Celles-ci devront tenir compte des caractéristiques structurales requises pour obtenir une bonne photoactivité et le moins possible d'effets indésirables.

BIBLIOGRAPHIE

- K.R. Adams, the late M.C. Berenbaum, R. Bonnett, A.N. Nizhnik, A. Salgado, M.A. Vallés (1992) Second generation tumour photosensitisers : the synthesis and biological activity of octaalkyl chlorins and bacteriochlorins with graded amphiphilic character. *J. Chem. Soc. Perkin Trans I*. 1465-1470.
- A.D. Adler, F.R. Longo, J.D. Finarelli, J. Goldmacher, J. Assour, L. Korsakoff (1967) A simplified synthesis for *meso*-tetraphenylporphyrin. *J. Org. Chem.* 32, 476.
- M.L. Agarwal, M.E. Clay, E.J. Harvey, H.H. Evans, A.R. Antunez, N.L. Oleinick (1991) Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 51, 5993-5996.
- K. Berg, J. Moan (1997) Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* 65, 403-409.
- S.K. Bisland, D. Singh, J. Gariépy (1999) Potentiation of chlorin e6 photodynamic activity *in vitro* with peptide-based intracellular vehicles. *Bioconjugate Chem.* 10, 982-992.
- C.D. Bortner, J.A. Cidlowski (1998) A necessary role for cell shrinkage in apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 56, 1549-1559.
- A.M. Braun, M.T. Maurette, E. Oliveros (1986) Technologie photochimique 1^{ère} édition, Presses polytechniques romandes, Lausanne.
- D.A. Carson, J.M. Ribeiro (1993) Apoptosis and disease. *Lancet.* 341, 1251-1254.
- M. Cornia, G. Casiraghi, S. Binacchi, F. Zanardi, G. Rassu (1994) Facile entry to 5,10,15,20-tetra-C-glycosylporphyrins. *J. Org. Chem.* 59, 1226-1230.
- E. Davoust, R. Granet, P. Krausz, V. Carré, M. Guilloton (1999) Synthesis of glycosylated porphyrins. *Tetrahedron Lett.* 40, 2513-2516.
- M. Del Governatore, M.R. Hamblin, E.E. Piccinini, G. Ugolini, T. Hasan (2000) Targeted photodestruction of human colon cancer cells using charged 17.1A chlorin e6 immunoconjugates. *Br. J. Cancer.* 82, 56-64.
- M. Dellinger (1996) Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization : influence of the incubation protocol. *Photochem. Photobiol.* 64, 182-187.
- B. Desoize, S. Sens (1992) L'apoptose ou mort cellulaire programmée : concepts, mécanismes et apports en cancérologie. *Bull. Cancer* 79, 413-425.
- B. Desoize (1994) Apoptose et mort cellulaire programmée. *Bull. Cancer.* 81, 670-676.
- T.J. Dougherty (1987) Photosensitizers : therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* 45, 879-889.

- T.J. Dougherty (1993) Yearly review : Photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 58, 895-900.
- T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 12, 889-905.
- K. Driaf, P. Krausz, B. Verneuil (1993) Glycosylated cationic porphyrin as potential agents in cancer phototherapy. *Tetrahedron Lett.* 34, 1027-1030.
- K. Driaf, R. Granet, P. Krausz, M. Kaouadji, F. Thomasson, A.J. Chulia, B. Verneuil, M. Spiro, J.C Blais, G. Bolbach (1996) Synthesis of glycosylated cationic porphyrins as potential agents in photodynamic therapy. *Can. J. Chem.* 74, 1550-1563.
- Q. Fan, R. Miller (1999) Abstract SPM-E4 : Reduction of atheromatous plaque with ANITRIN® photoangioplasty. *Photochem. Photobiol.* 69, 19-20S.
- F. Fischer, W. Maier-Borst, W.J. Lorenz (1998) Photodynamic therapy as a tool for suppressing the haematogenous dissemination of tumour cells. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 43, 27-33.
- S. Foote (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* 54, 659.
- J.H. Fuhrhop, C. Demoulin, C. Boettcher, J. Köning, U. Siggel (1992) Chiral micellar porphyrin fibers with 2-aminoglycosamide head groups. *J. Am. Chem. Soc.* 114, 4159-4165.
- G. Fülling, D. Schröder, B. Franck (1989) Water-soluble porphyrin diglycosides with photosensitizing properties. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28, 1519-1521.
- T.G. Gantchev, J.E. van Lier (1995) Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulfonated metallophthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 62, 123-124.
- B.A. Goff, M. Bamberg, T. Hasan (1991) Photoimmunotherapy of human ovarian carcinoma cells ex vivo. *Cancer Res.* 51, 4762-4767.
- P. Grécias, J.P. Migeon. Chimie 1 Sup Bio Vét, Cours et tests d'application. Technique et documentation-Lavoisier 1987, Paris.
- D.A. James, N. Swamy, N. Paz, R.N. Hanson, R. Ray (1999) Synthesis and estrogen receptor binding affinity of a porphyrin-estradiol conjugate for targeted photodynamic therapy of cancer. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9, 2379-2384.
- G. Jori, M. Beltrami, E. Reddi, B. Salvato, A. Pagnan, L. Ziron, L. Tomio, T. Tsanov (1984) Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo. *Cancer Lett.* 24, 291-297.

- C. Kaldapa, J.C. Blais, V. Carré, R. Granet, V. Sol, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz (2000) Synthesis of new glycosylated neutral and cationic porphyrin dimers. *Tetrahedron Lett.* 41, 331-335.
- K. Kalka, H. Merk, H. Mukhtar (2000) Photodynamic therapy in dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 42, 389-413.
- D. Kessel, Y. Luo, Y. Deng, C.K. Chang (1997) The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 65, 422-426.
- D. Kessel, Y. Luo (1998) Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 42, 89-95.
- M. Kressel, P. Groscurth (1994) Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* 278, 549-556.
- B. Kulapaditharom, V. Boonkitticharoen (1999) Photodynamic therapy for residual or recurrent cancer of the nasopharynx. *J. Med. Assoc.* 82, 1111-1117.
- J.W.M. Lagerberg, K.P. Überriegler, B. Krammer, J. Van Steveninck, T.M.A.R. Dubbelman (2000) Plasma membrane properties involved in the photodynamic efficacy of merocyanine 540 and tetrasulfonated aluminium phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.* 71, 341-346.
- J. Levy, M. Obochi (1996) New applications in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 64, 737-739.
- J. Levy (1999) Abstract TPM-B1 : PDT in the treatment of ocular neovasculation. *Photochem. Photobiol.* 69, 48S.
- H. Li, L. Czuchajowski (1994) Ribofuranosides N-substituted with meso-porphyrin as nucleoside-like compounds. *Tetrahedron Lett.* 35, 1629-1630.
- J.S. Lindsey, I.C. Schreiman, H.C. Hsu, P.C. Kearney, A.M. Marguerettaz (1987) Rothemund and Aler-Longo reactions revisited : synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions. *J. Org. Chem.* 52, 827-836.
- R.G. Little, J.A. Anton, P.A. Loach, J.A. Ibers (1975) *J. Heterocycl. Chem.* 12, 343-345.
- D. Magda, M. Wright, R.A. Miller, J.L. Sessler, P.T. Sansom (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 3629-3630.
- P. Maillard, J.L. Guerin-Kern, M. Momenteau (1989) Glycoconjugated tetrapyrrolic macrocycles. *J. Am. Chem. Soc.* 111, 9125-9127.

- G. Mehta, T. Sambaiah, B.G. Maiya, M. Sirish, D. Chatterjee (1993) Synthesis and nuclease activity of some porphyrin-acridone hybrid molecules. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 2667-2669.
- V.O. Melnikova, L.N. Bezdetnaya, C. Bour, E. Festor, M.-P. Gramain, J.-L. Merlin, A.Y. Potapenko, F. Guillemin (1999) Subcellular localization of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 49, 96-103.
- Y. Mikata, Y. Onchi, K. Tabata, S.I. Ogura, I. Okura, H. Ono, S. Yano (1998) Sugar-dependent photocytotoxic property of tetra- and octa-glycoconjugated tetraphenylporphyrins. *Tetrahedron Lett.* 39, 4505-4508.
- J. Miller (1999) Photodynamic therapy : the sensitization of cancer cells to light. *J. Chem. Ed.* 76, 592-594.
- J. Moan (1986) Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem. Photobiol.* 43, 681-690.
- J. Moan, Q. Peng, J.F. Evensen, K. Berg, A. Western, C. Rimington (1987) Photosensitizing efficiencies, tumor- and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* 46, 713-721.
- J. Moan, L.W. Ma, E. Bjorklund (1999) The effect of glucose and temperature on the *in vivo* efficiency of Photochemotherapy with *meso*-tetra-hydroxyphenylchlorin. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 50, 94-98.
- K. Moghissi, K. Dixon, J.A. Thorpe, M. Stringer, P.J. Moore (2000) The role of photodynamic therapy (PDT) in inoperable oesophageal cancer. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 17, 95-100.
- M. Monsigny, A.C. Roche, P. Midoux, R. Mayer (1994) Glycoconjugates as carriers for specific delivery of therapeutic drugs and genes. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 14, 1-24.
- F.P. Montforts, A. Meier, G. Scheurich, G. Haake, J.W. Bats (1992) Chlorins designed for photodynamic tumor therapy and as model systems for photosynthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31, 1592-1594.
- M. Ochsner (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumors. *J. Photochem. Photobiol B : Biol.* 39, 1-18.
- N. Ono, M. Bougauchi, K. Maruyama (1992) Water-soluble porphyrins with four sugars molecules. *Tetrahedron Lett.* 33, 1629-1632.
- D. Ost (2000) Photodynamic therapy in lung cancer. *Oncology (Huntingt).* 14, 379-386.

- D. Oulmi, P. Maillard, J.L. Guerquin-Kern, C. Huel, M. Momenteau (1995) Glycoconjugated porphyrins. 3. Synthesis of flat amphiphilic mixed meso-(glycosylated aryl)arylporphyrins and mixed meso-(glycosylated aryl)alkylporphyrins bearing some mono- and disaccharide groups. *J. Org. Chem.* 60, 1554-1564.
- D. Oulmi, P. Maillard, C. Vever-Bizet, M. Momenteau, D. Brault (1998) Glycosylated porphyrins : Characterization of association in aqueous solutions by absorption and fluorescence spectroscopies and determination of singlet oxygen yield in organic media. *Photochem. Photobiol.* 67, 511-518.
- M. Overhaus, J. Heckenkamp, S. Kossodo, D. Leszczynski, G.M. La Muraglia (2000) Photodynamic therapy generates a matrix barrier to invasive vascular cell migration. *Circ. Res.* 86, 334-340.
- R.K. Pandey, T.J. Dougherty, K.M. Smith (1988) Syntheses of hematoporphyrin dimers and trimers with ether linkages. *Tetrahedron Lett.* 29, 4657-4660.
- R.K. Pandey, F.Y. Shiau, C.J. Medforth, T.J. Dougherty, K.M. Smith (1990) Syntheses, stability and tumoricidal activity of porphyrin dimers and trimers with ether linkages. *Tetrahedron Lett.* 31, 7399-7402.
- R.K. Pandey, N. Jagerovic, J.M. Ryan, T.J. Dougherty, K.M. Smith (1996) Synthesis and preliminary in vivo photodynamic efficacy of benzoporphyrin derivatives from phylloerythrin and rhodoporphyrin XV methyl esters and aspartyl amides. *Tetrahedron* 52, 5349-5362.
- R.F. Pasternack, P.R. Huber, P. Boyd, G. Engasser, L. Francesconi, E. Gibbs, P. Fasella, G. Cerio Venturo, L. de C. Hinds (1972) On the aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins. *J. Am. Chem. Soc.* 94, 4511-4517.
- J.P. Reyftmann, P. Morliere, S. Goldstein, R. Santus, L. Dubertret, D. Lagrange (1984) Interaction of human serum low density lipoproteins with porphyrins : a spectroscopic and photochemical study. *Photochem. Photobiol.* 40, 721-729.
- G.H. Rodal, S.K. Rodal, J. Moan, K. Berg (1998) Liposome-bound Zn(II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 45, 150-159.
- P. Rothmund, A.R. Menotti (1941) Porphyrin Studies. IV. The synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetraphenylporphine. *J. Am. Chem. Soc.* 63, 267-270.
- A. Rück, H. Diddens (1996) Uptake and subcellular distribution of photosensitizing drugs in malignant cells. The fundamental basis of phototherapy. Edited by H. Honigsmann, G. Jori, A. Young. 209-227. OEMF, Milano.

- R. Sailer, W.S.L. Strauss, H. Emmert, K. Stock, R. Steiner, H. Schneckenburger (2000) Plasma membrane associated location of sulfonated *meso*-tetraphenylporphyrins of different hydrophilicity probed by total internal reflection fluorescence spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 71, 460-465.
- A. Samali, H. Nordgren, B. Zhivotovsky, E. Peterson, S. Orrenius (1999) A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells : oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 6-11.
- R. Santus (1991) Récents développements en photochimiothérapie anticancéreuse. *Path. Biol.* 39, 54-58.
- C. Schell, H.K. Hombrecher (1999) Synthesis and investigation of glycosylated mono- and diarylporphyrins for photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem.* 7, 1857-1865.
- J.J. Schuitmaker, P. Baas, H.L.L.M. van Leengoed, F.W. van der Meulen, W.M. Star, N. van Zandwijk (1996) Photodynamic therapy : a promising new modality for the treatment of cancer. *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 34, 3-12.
- J.L. Sessler, T. Murai, V. Lynch, M. Cyr (1988) *J. Am. Chem. Soc.* 110, 5586-5588.
- J.L. Sessler, T.D. Mody, G.W. Hemmi, V. Lynch (1993) *Inorg. Chem.* 32, 3175-3187.
- J.L. Sessler, R.A. Miller (2000) Texaphyrins : new drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy. *Biochem. Pharmacol.* 59, 733-739.
- V. Sol, J.C. Blais, G. Bolbach, V. Carré, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz (1997) Toward glycosylated peptidic porphyrins : a new strategy for PDT ? *Tetrahedron Lett.* 36, 6391-6394.
- V. Sol, J.C. Blais, V. Carré, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz (1999) Synthesis, spectroscopy and photocytotoxicity of glycosylated amino acid porphyrin derivatives as promising molecules for cancer phototherapy. *J. Org. Chem.* 64, 4431-4444.
- J.D. Spikes (1986) Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors. *Photochem. Photobiol.* 43, 691-699.
- E.D. Sternberg, D. Dolphin, C. Brückner (1998) Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron Lett.* 54, 4151-4202.
- L. Stryer (1997) La biochimie 4^{ème} édition. Médecine-Sciences Flammarion, Paris.

- I. Sylvain, R. Benhaddou, V. Carré, S. Cottaz, H. Driguez, R. Granet, M. Guilloton, P. Krausz (1999) Synthesis and biological evaluation of thioglycosylated *meso*-arylporphyrins. *J. Porphyrins and Phthalocyanines*. 3, 1-4.
- J.P. Thomas, A.W. Girotti (1989) Glucose administration augments *in vivo* uptake and phototoxicity of the tumor-localizing fraction of hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* 49, 241-247.
- K.B. Trauner, T. Hasan (1996) Photodynamic treatment of Rheumatoid and inflammatory arthritis. *Photochem. Photobiol.* 64, 740-750.
- T. Tsuchida, G. Zheng, R.K. Pandey, W.R. Potter, D.A. Belinier, B.W. Henderson, H. Kato, T.J. Dougherty (1997) Correlation between site II-specific human serum albumin (HSA) binding affinity and murine *in vivo* photosensitizing efficacy of some Photofrin® components. *Photochem. Photobiol.* 66, 224-228.
- D.L. Vaux, A. Strasser (1996) The molecular biology of apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93, 2239-2244.
- VIDAL 1999.
- D. Voet, J.G. Voet (1998) Biochimie 2^{ème} édition. De Boeck université, Paris.
- J.H. Weil, J. Boulanger, P. Chambon, G. Dubertret, D. Gautheron, C. Kedinger, M. Lazdunski, J. Montreuil, J.C. Patte, G. Rebel, J.M. Rossignol, E. Shechter, M. Wright (1994) Biochimie générale 7^{ème} édition. Masson, Paris.
- K.R. Weishaupt, C.J. Gomer, T.J. Dougherty (1976) Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res.* 36, 2326-2329.
- K.W. Woodburn, N.J. Vardaxis, J.S. Hill, A.H. Haye, D.R. Phillips (1991) Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem. Photobiol.* 54, 725-732.
- K.W. Woodburn, N.J. Vardaxis, J.S. Hill, A.H. Kaye, J.A. Reiss, D.R. Phillips (1992) Evaluation of porphyrin characteristics required for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 55, 697-704.

Sources INTERNET :

<http://anocef.unice.fr/mini-revues/Apoptose>

<http://209.41.253.5:80/pdt@lmrf/>

<http://www.mahuzier.com/vit-patient.htm>

<http://www.medscape.com>

<http://www.newcenturypharm.com>

<http://www.oncavert.com>

<http://www.pcy.com>

<http://www.scimedia.com/chem-ed/light>

ANNEXES

ANNEXE 1



Photographies représentant des personnes atteintes de vitiligo (www.mahuzier.com).

ANNEXE 2

Historique des événements importants dans le développement de la PDT

1900 : Première observation (Raab) :

Paramécie + rayons solaires : survie

Paramécie + acridine + obscurité : survie

Paramécie + acridine + rayons solaires : décès

1904 : Nomination (Trappeiner et Jodlebauer) :

Création du terme réaction "photodynamique" pour un système biologique qui exige de l'oxygène, un sensibilisateur absorbant la lumière.

1910 : Hp chez l'animal (Hausmann) :

Des souris blanches ayant reçu une injection d'Hp et exposées à de la lumière développent des réactions qui varient énormément en fonction de la quantité de sensibilisateur et de lumière.

1913 : Hp chez l'homme (Meyer-Betz) :

Il s'injecte de l'Hp et démontre la photosensibilisation solaire qui persista pendant deux mois associée à des œdèmes et une hyperpigmentation.

1924 : Fluorescence tumorale (Policard) :

Il constate que certaines tumeurs émettent une fluorescence orange-rouge lorsqu'elles sont exposées à des rayons du proche UV et ceci provient de la présence de porphyrines endogènes.

1948 : Fluorescence de l'Hp chez l'animal (Figge) :

Une injection d'Hp cause une augmentation de fluorescence dans des ganglions lymphatiques, dans des tumeurs (sarcomes et glandes mammaires), dans des tissus incisés antérieurement ou traumatisés et dans le placenta de souris en gestation.

1955 : Fluorescence de l'Hp chez l'homme (Rassmusen-Taxdal) :

Ils observent la fluorescence de tumeurs chez des patients ayant reçu une injection d'Hp; ceci concerne les cancers du pénis, du sein, des ganglions mésentériques et axillaires.

1960 : HpD (Lipson et Baldes) :

Ils utilisent un dérivé de l'hématoporphyrine dit HpD préparé par Schwartz et montrent que la réaction de souris blanches exposées à la lumière varie avec la dose d'HpD, le flux de lumière et la durée d'exposition à la lumière.

1961 : Fluorescence de l'HpD au niveau endobronchial (Lipson) :

Il résume des études de fluorescence endoscopique observée chez 15 patients atteints d'une tumeur endobronchiale et utilisant de l'HpD comme sensibilisateur.

1966 : HpD comme traitement chez l'homme (Lipson) :

Il utilise l'HpD pour la détection et le suivi de cancer ; de plus, il traite pour la première fois une patiente atteinte d'un cancer du sein.

1968 : Fluorescence de l'HpD chez l'homme (Gregorie) :

Une étude de 226 personnes ayant reçu une injection IV d'HpD montre une corrélation de 75 à 85% entre la fluorescence et les biopsies positives mais aussi 23% de faux positifs chez 53 personnes possédant des lésions bénignes.

1972 : Hp comme traitement de tumeurs animales (Diamond) :

Il détruit des tumeurs chez des rats en les exposant à la lumière après leur avoir injecté de l'Hp.

1976 : HpD dans le traitement de tumeurs de la vessie (Kally et Snell) :

Ils utilisent l'HpD pour traiter un patient atteint d'un cancer de la vessie ; 48 heures après le traitement, le carcinome superficiel montre une nécrose de plusieurs tumeurs papillaires mais le reste de la vessie apparaît non atteint.

1976 : Oxygène singulet (Weishaupt) :

Il démontre que l'oxygène singulet est produit par l'absorption d'énergie lumineuse par l'HpD, ceci initialisant la destruction des tumeurs.

1978 : HpD dans le traitement de cancer de la peau (Dougherty) :

Il rapporte des réponses totales ou partielles dans 111 sur 113 lésions malignes cutanées ou sous-cutanées traitées avec la PDT utilisant l'HpD comme sensibilisateur.

1980 : Tunable Dye Laser ; 630 nm (Dougherty) :

Il décrit l'utilisation d'un laser et de systèmes à fibre optique pour délivrer un faisceau lumineux de longueur d'onde de 630 nm dans le traitement de tumeurs par HpD.

1981 : HpD dans le traitement de cancer endobronchial (Hayata) :

Il décrit l'usage de fibre optique bronchoscopique dans le traitement de tumeurs endobronchiques par la PDT.

1982 : Création de la LMRF :

La LMRF (Laser Medical Research Foundation) est créée pour avancer et étudier l'utilisation de lasers en médecine. Elle commence des essais cliniques utilisant la PDT pour traiter des personnes atteintes de cancer...

1984 : Photofrin II (Dougherty) :

Il fractionne l'HpD et sépare un mélange qu'il désigne comme le Photofrin II ; il s'agit d'éther de dihématoporphyrine (DHE).

1993 : Le Canada approuve l'utilisation du photofrin dans le traitement du cancer de la vessie.

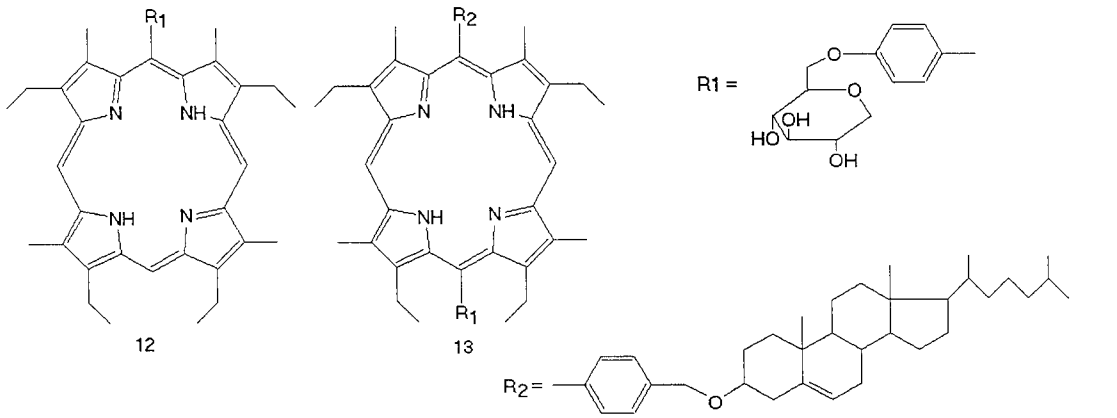
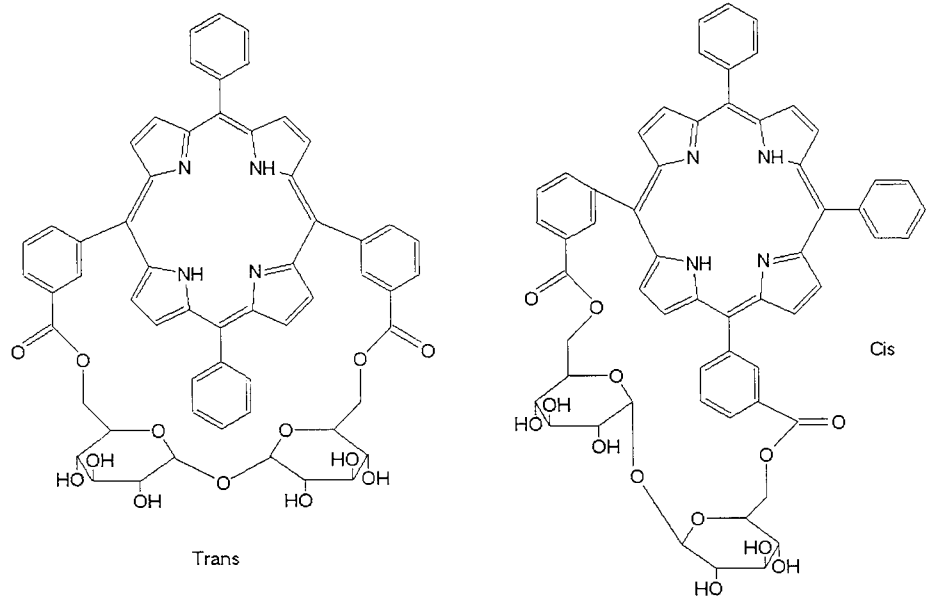
1996 : Approbation par la FDA pour le traitement de tumeurs obstructives de l'œsophage.

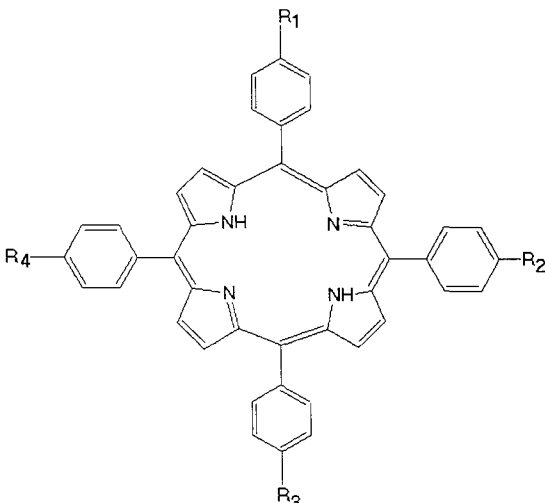
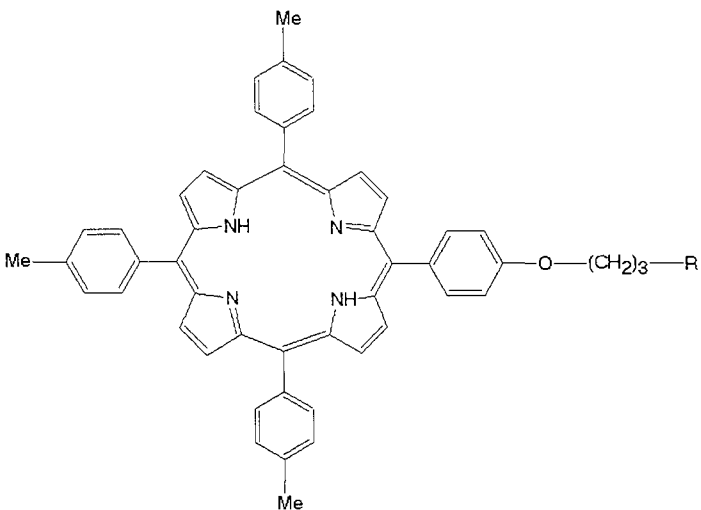
1997 : Approbation par la France, les Pays-Bas pour le traitement de tumeurs avancées du poumon et de l'œsophage. Approbation par l'Allemagne pour le traitement du cancer du poumon.

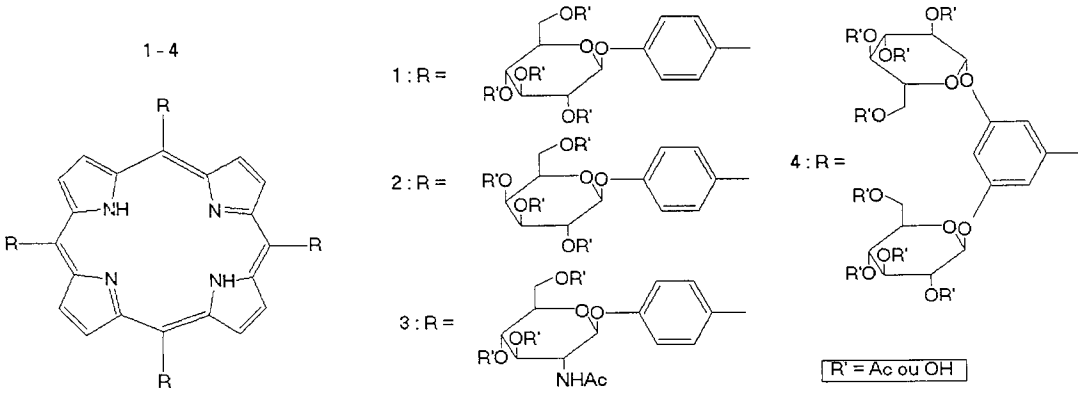
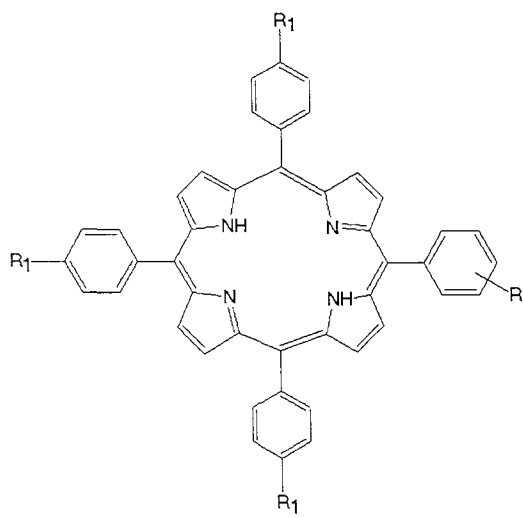
1997 : Approbation par le Japon pour le traitement des cancers primitifs de l'œsophage, du poumon, de l'estomac, des tumeurs cérébrales.

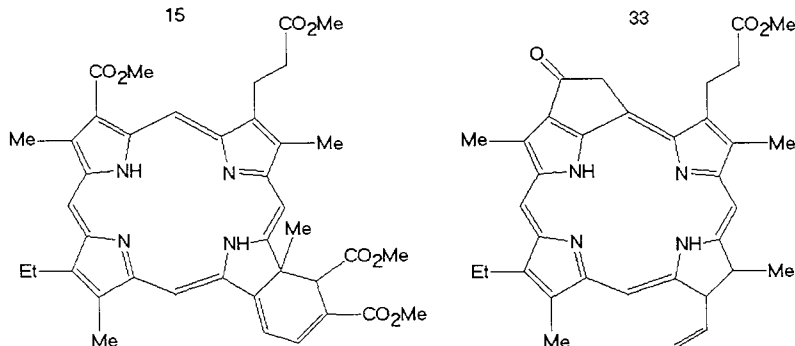
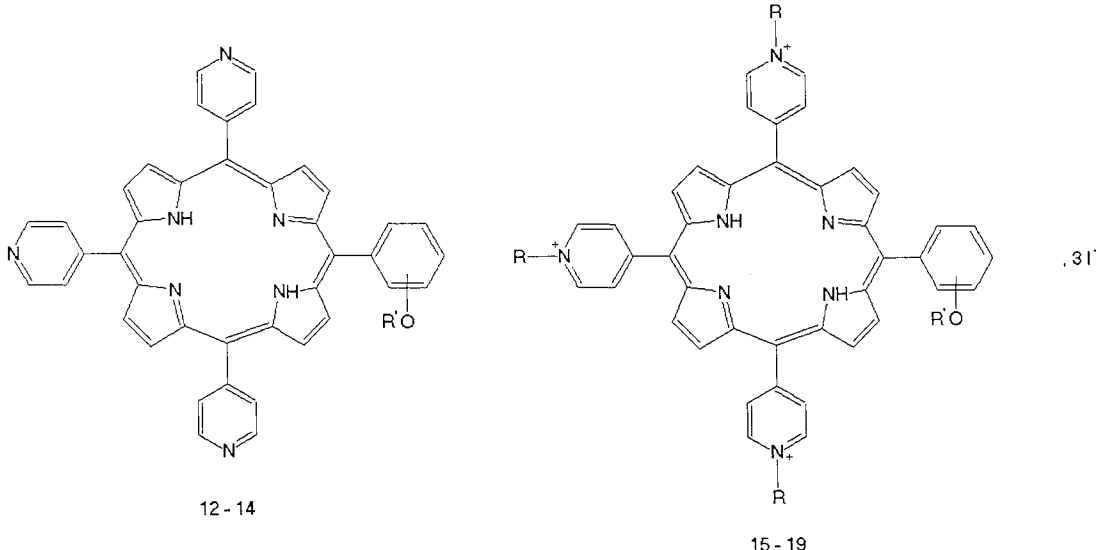
1998 : Approbation par la FDA pour le traitement des cancers primitifs endobronchiques.

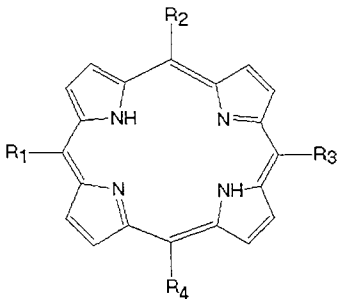
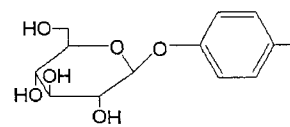
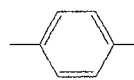
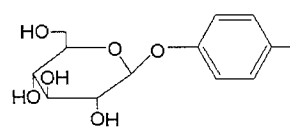
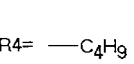
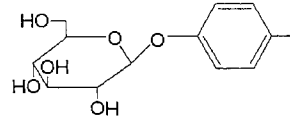
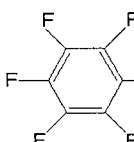
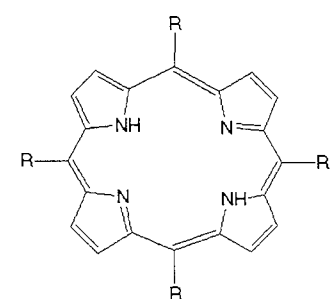

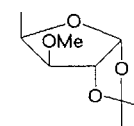
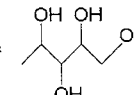
ANNEXE 3

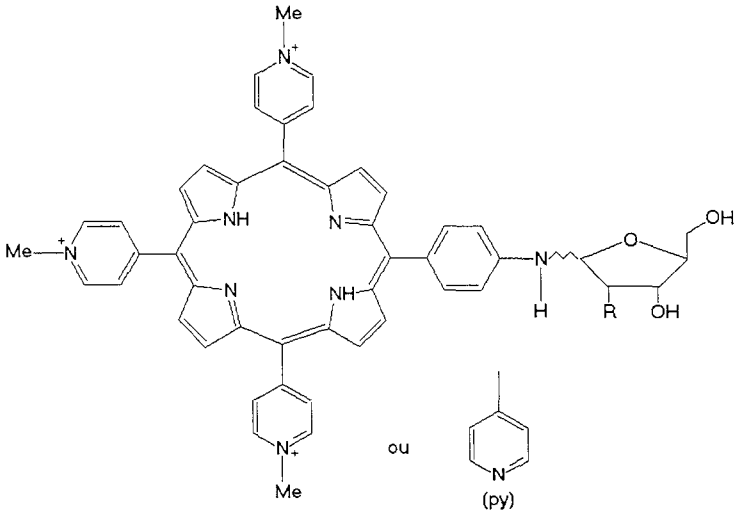
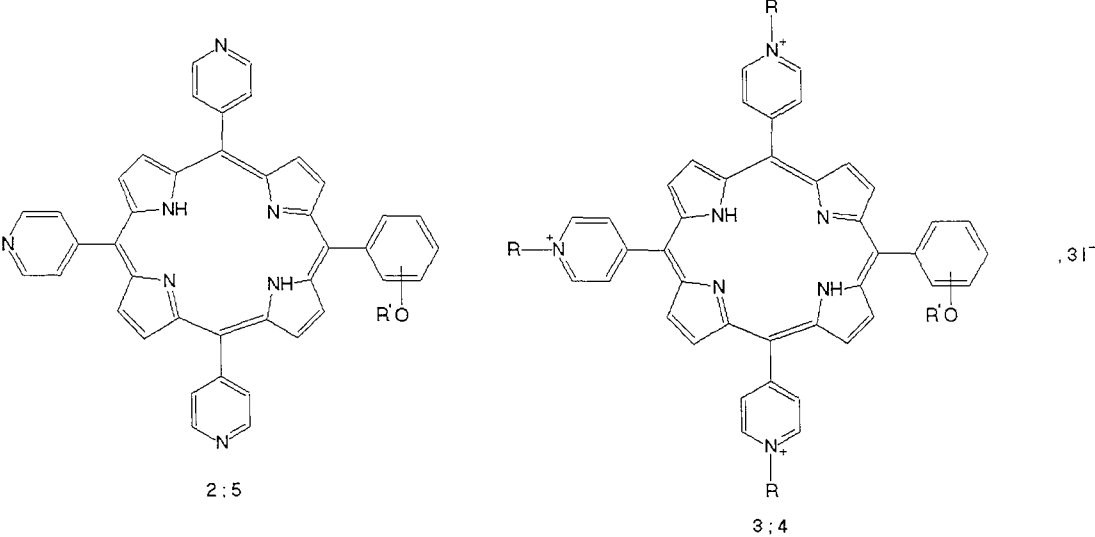
N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
2	<p>Bioorg. Med. Chem. Vol. 7 ; 1857-1865 1999</p> <p>C. Schell, H.K. Hombrecher</p>	 <p style="text-align: center;">Mono- et diaryl porphyrines glycosylées</p>	<p>12 : monoaryl porphyrine glycosylée 13 : diaryl porphyrine glycosylée</p>
3	<p>Tetrahedron Lett. Vol 40 ; 2513-2516 1999</p> <p>E. Davoust, R. Granet, P. Krausz, V. Carré, M. Guillon</p>	 <p style="text-align: center;">Mésoarylporphyrines avec ceinture de cycles glycosylés</p>	<p>Groupement Tréhalose 6a : trans 6b : cis</p>

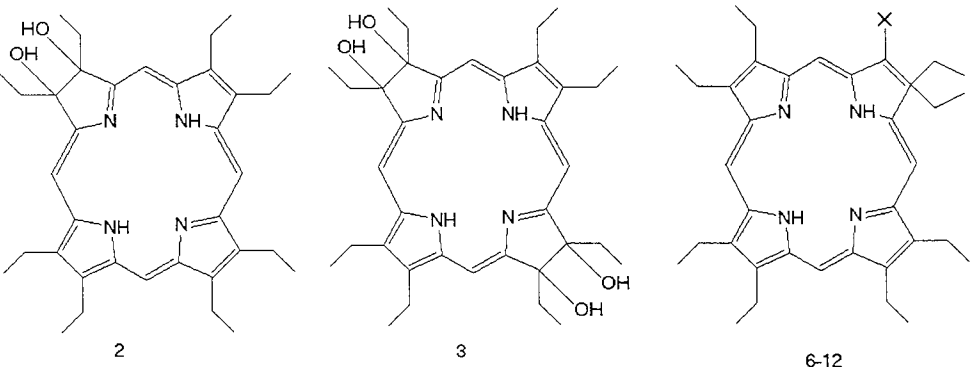
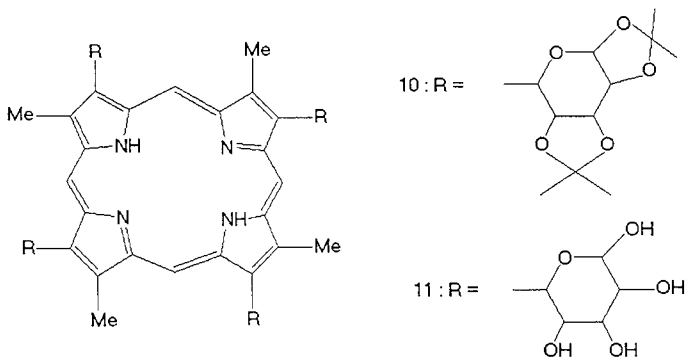
N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
4	<p>J. Org. Chem. Vol 64 ; 4431-4444 1999</p> <p>V. Sol, J.C. Blais, V. Carré, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz</p>	 <p>Mésoarylporphyrines avec groupements glucosyles, alanyles et glycosylséryles</p>	<p>a,b = ortho et para</p> <p>19a,b : R₂ = R₃ = R₄ = Ala ; R₁ = OgluOH</p> <p>20 : R₁ = R₃ = Ala ; R₂ = R₄ = OgluOH</p> <p>21 : R₁=R₂= Ala ; R₃=R₄= OgluOH</p> <p>22a,b : R₁= Ala ; R₂=R₃=R₄= OgluOH</p> <p>23a,b: R₁= SerOgluOH ; R₂=R₃=R₄=Me</p>
5	<p>J. Porphyrins & Phthalo. Vol 3 ; 1-4 1999</p> <p>I. Sylvain, R. Benhaddou, V. Carré, S. Cottaz, H. Driguez, R. Granet, M. Guilloton , P. Krausz</p>	 <p>Mésoarylporphyrines thioglycosylées</p>	<p>a,b = ortho et para</p> <p>6a,b : R= -S-gluOH</p> <p>7a,b : R= -S-galOH</p> <p>8a,b : R= -S-manOH</p> <p>bras espaceur : -(CH₂)₃</p>

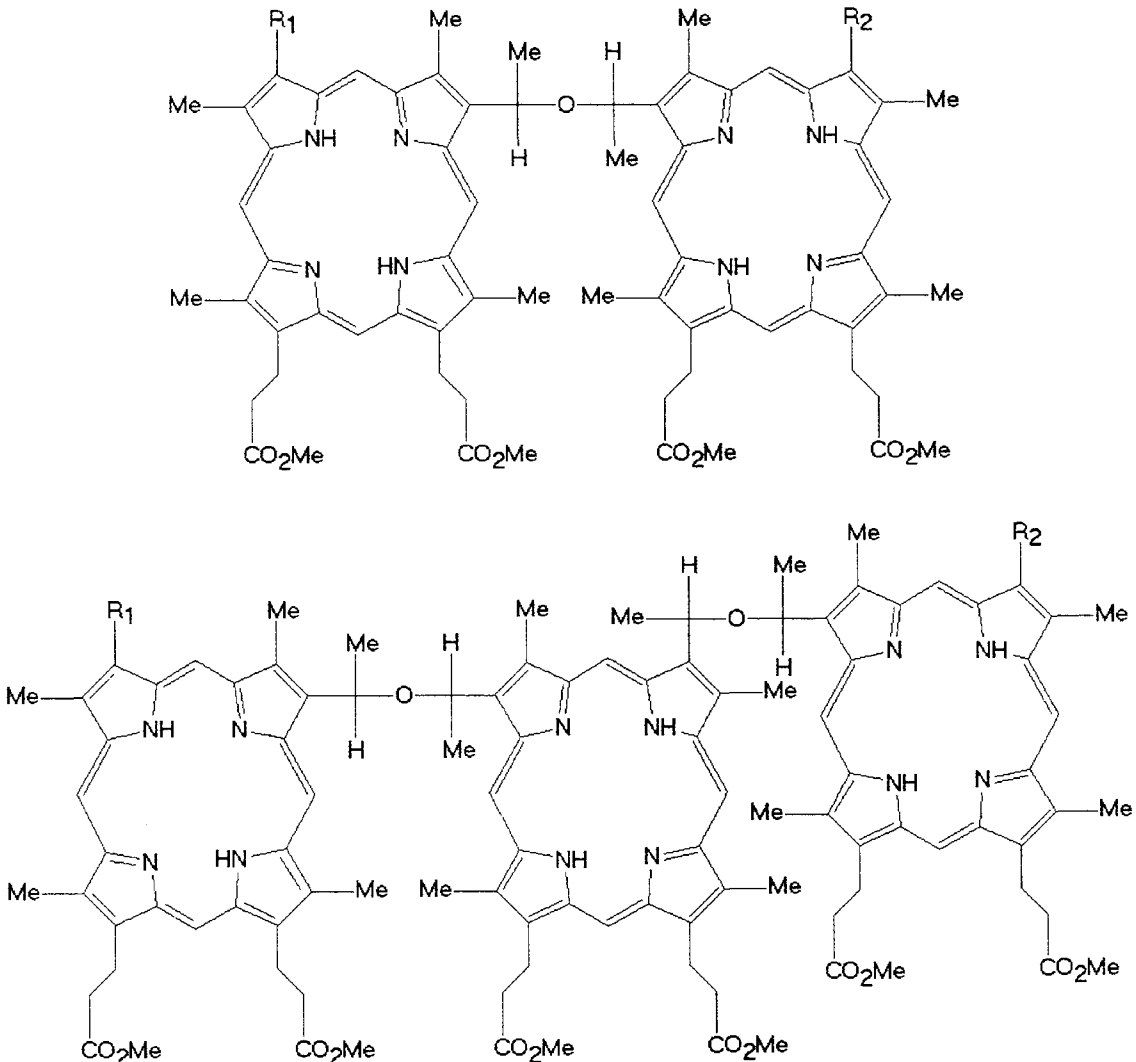
N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
6	<p>Tetrahedron Lett. Vol 39 ; 4505-4508 1998</p> <p>Y. Mikata, Y. Onchi, K. Tabata, S. Ogura, I. Okura, H. Ono, S. Yano</p>	 <p>1-4</p> <p>1 : R =</p> <p>2 : R =</p> <p>3 : R =</p> <p>4 : R =</p> <p>R' = Ac ou OH</p> <p>Mésoporphyrines avec groupements glycosyles acétylés ou non</p>	<p>4 composés acétylés ou non :</p> <p>1 : Tétra-glucose</p> <p>2 : Tétra-galactose</p> <p>3 : Tétra-N-Acétyleglucosamine</p> <p>4 : Octa-glucose</p>
7	<p>Tetrahedron Lett. Vol 38 n°36 ; 6391-6394 1997</p> <p>V. Sol, J.C. Blais, G. Bolbach, V. Carré, R. Granet, M. Guilloton, M. Spiro, P. Krausz</p>	 <p>Mésoporphyrines substituées par des groupements glycosyl et alanine</p>	<p>a,b = ortho et para</p> <p>9 a,b : R₁ = NH-L-Ala R = OgluOH</p> <p>10 a,b : R₁ = OgluOH R = NH-L-Ala</p>

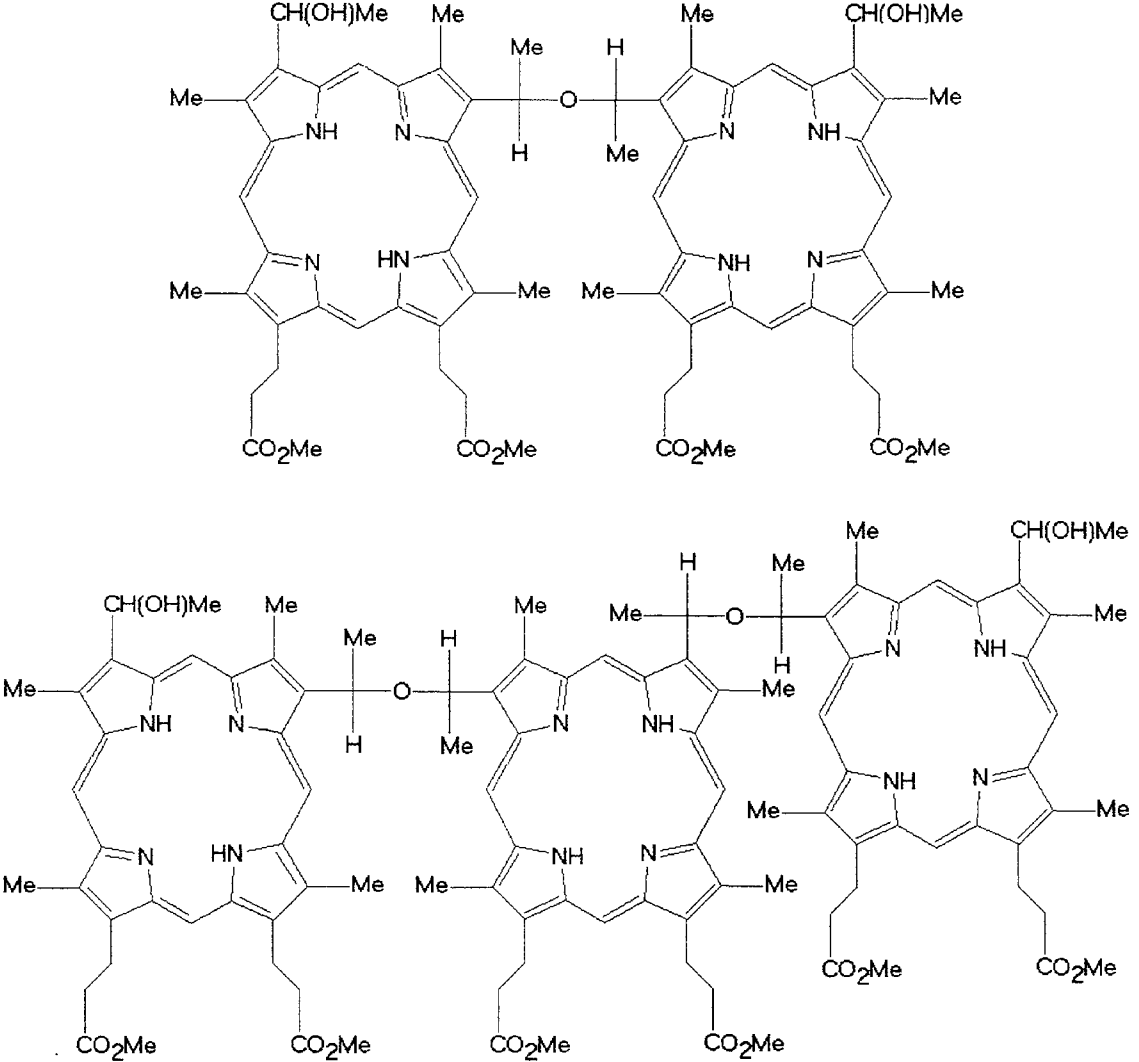
N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
8	<p>Tetrahedron Lett. Vol 52 n°15 ; 5349-5362 1996</p> <p>R.K. Pandey, J.M. Ryan, N. Jagerovic, K.M. Smith, T.J. Dougherty</p>		<p>Porphyrines modifiées ; Substrat : -rhodoporphyrine XV diméthylester -éthylène kétal méthylpyrophorbide-a</p> <p>15 33</p>
9	<p>Can. J. Chem. Vol 74 ; 1550-1563 1996</p> <p>K. Driaf, R. Granet, P. Krausz, M. Haouadji, F.Thomasson, A.J. Chulia, B. Verneuil, M. Spiro, J.C. Blais, G. Bolbach</p>	 <p>12 - 14</p> <p>15 - 19</p> <p>Porphyrines glycosylées acétylées ou non</p>	<p>a,b = ortho et para 12a,b : R=gluOH (OAc) 13a,b : R=maltOH (OAc) 14a,b : R=lactOH (OAc) 15a,b : R=Me ; R'=gluOH (OAc) 16a,b : R=Me ; R'=maltOH (OAc) 17a,b : R=Me ; R'=lactOH(OAc) 18a,b : R=i-Pr ; R'=gluOH (OAc) 19a,b : R=n-Oct ; R'=gluOH(OAc)</p> <p>,31"</p>

N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
10	J. Org. Chem. Vol 60 ; 1554-1564 1995 D. Oulmi, P. Maillard, J.L. Guerquin-Kern, C. Huel, M. Mamenteau	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-start; margin-top: 10px;"> <div> $15_{5,10,15} :$ $R_1=R_2=R_3=$  $R_4=$  </div> <div> $22_{5,10} :$ $R_1=R_3=$  $R_2=R_4=$  </div> <div> $27_{5,10,15} :$ $R_1=R_2=R_3=$  $R_4=$  </div> </div>	Porphyrines tétrakis(arylglycosylées) : 5 : $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OGluOAc}$ 6 : $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OGalOAc}$ 7 : $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OMaltOAc}$ 8 : $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OGluOAcNHAc}$ 9 : $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OGluOH}$ 10 : $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OGalOH}$ 11 : $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OMaltOH}$ 12 : $R_1=R_2=R_3=R_4= \text{OGluOHNHAc}$ Phénylporphyrines poly(arylglycosylées) : $15_{5,10,15}$ Alkylporphyrines poly(arylglycosylées): $22_{5,10}$ Perfluorophénylporphyrines poly(arylglycosylées) : $27_{5,10,15}$
11	J. Org. Chem. Vol 59 ; 1226-1230 1994 M. Cornia, G. Casiraghi, S. Binacchi, F. Zanardi, G. Rassu	 <div style="display: flex; flex-direction: column; align-items: flex-start; margin-top: 10px;"> <div> $4 : R=$  </div> <div> $6 : R=$  </div> <div> $10 : R=$  </div> </div> <p style="text-align: center;">Porphyrines glycosylées en <i>méso</i></p>	4 6 10

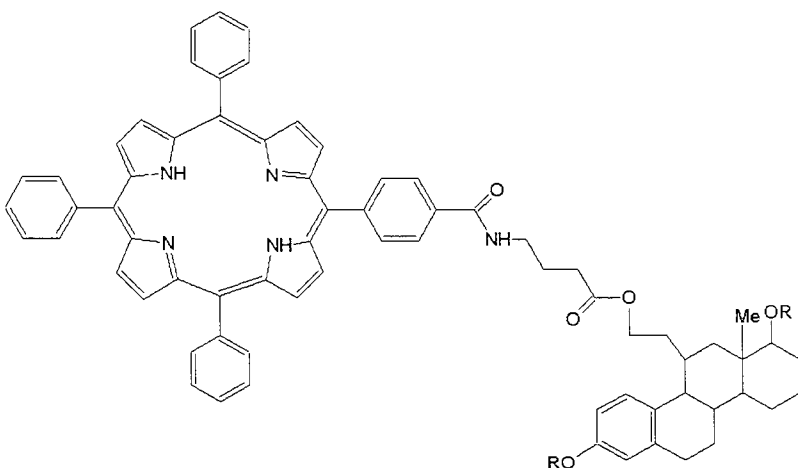
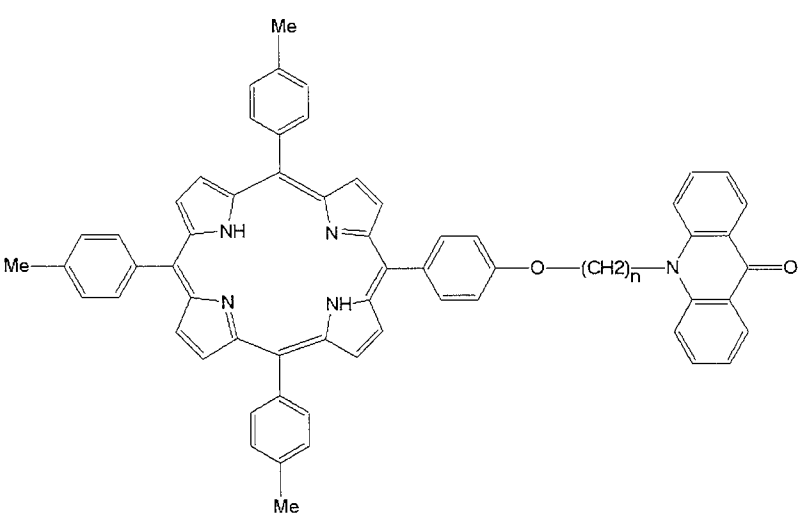
N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
12	Tetrahedron Lett. Vol 35 n°11 ; 1629-1630 1994 H. Li, L. Czuchajowski	 <p style="text-align: center;">Porphyrinyl-N-glycosides</p>	3 : py, R=OH 4 : py, R=H 5 : N-Mepy, R=OH 6 : N-Mepy, R=H
13	Tetrahedron Lett. Vol 34 n°6 ; 1027-1030 1993 K. Driaf, P. Krausz, B. Verneuil	 <p style="text-align: center;">Porphyrines O-glycosylées cationiques acétylées ou non</p>	2 : R'=OgluOAc 5 : R'=OgluOH 3a : R=Me, R'=OgluOAc 3b : R=iPr ; R'=OgluOAc 3c : R=n-Oct ; R'=OgluOAc 4a : R=Me ; R'=OgluOH 4b : R=iPr ; R'=OgluOH 4c : R=n-Oct ; R'=OgluOH

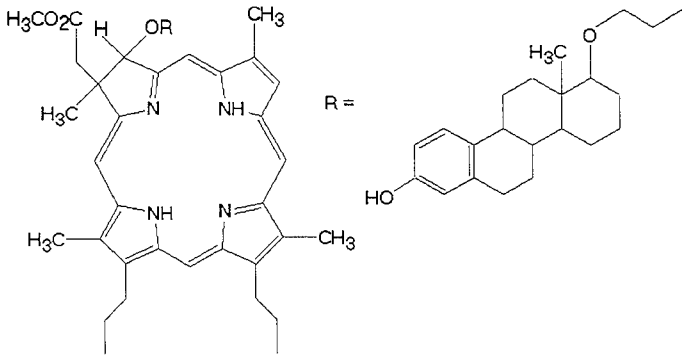
N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
14	<p>J. Chem. Soc. Perkin. Trans 1 1465-1470 1992</p> <p>K.A.Adams, R. Bonnett M.C. Berenbaum, A.N. Nizhnil, A. Salgado, M.A. Vallés</p>	 <p>2 3 6-12</p> <p>Porphyrines modifiées</p>	<p>2 3 6 : X=OH 7 : X=Br 8 : X=OEt 9 : X=OCH₂CH₂OH 10 : R=OCH₂CH(OH)CH₂OH 11 : R=OgluOH 12 : R=OmanOH</p>
15	<p>Tetrahedron Lett. Vol 33 n°12 ; 1629-1632 1992</p> <p>N. Ono, M. Bougauchi, K. Maruyama</p>	 <p>10 : R = 11 : R =</p> <p>Porphyrines avec cycle saccharide directement relié en position β</p>	<p>10 11</p>

N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
16	<p>Tetrahedron Lett. Vol 31 n°51 ; 7399-7402 1990</p> <p>R.K. Pandey, F.Y. Shiau, C.J. Medforth, T.J. Dougherty, K.M. Smith</p>	 <p>Dimères et trimères de porphyrines avec liaisons éther</p>	<p>Dimère 10 :</p> <p>a : $R_1=R_2=CO_2Me$ b : $R_1=R_2=CH(OH)Me$ c : $R_1=CO_2Me$; $R_2=CH=CH_2$ d : $R_1=CH(OH)Me$; $R_2=CH=CH_2$</p> <p>Trimère 16 :</p> <p>a : $R_1=R_2=CO_2Me$ b : $R_1=R_2=CH(OH)Me$ c : $R_1=R_2=CH=CH_2$</p>

N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
17	<p>Tetrahedron Lett. Vol 29 n°37 ; 4657-4660 1988</p> <p>R.K. Pandey, T.J. Dougherty, K.M. Smith</p>	 <p>Dimères et trimères de porphyrines</p>	<p>Dimère 6</p> <p>Trimère 12</p>

PORPHYRINES COUPLEES AVEC UNE MOLECULE COMPLEXE

N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
1	<p>Bioorg. Med. Chem. Lett. Vol 9 ; 2379-2384 1999</p> <p>D.A. James, N. Swamy, N. Paz, R.N. Hanson, R. Ray</p>	 <p>Mésorarylporphyrines portant un groupement estradiol</p>	<p>8 : estradiol</p> <p>bras espaceur : aminoacide</p>
2	<p>J. Chem. Soc. Perkin. Trans 1 2667-2669 1993</p> <p>G. Mehta, T. Sambaiah, B.G. Maiya, M. Sirish, D. Chatterjee</p>	 <p>Porphyrine couplée à une acridone</p>	<p>bras espaceur : $-(CH_2)_n$</p> <p>4a : n=2</p> <p>4b : n=3</p> <p>4c : n=4</p> <p>4d : n=5</p> <p>4e : n=6</p>

N°	Périodique / Auteurs	Schéma du photosensibilisateur	Substitution
3	<p data-bbox="161 117 444 205">Angew. Chem. Int. Ed. Engl. Vol 31 n°12 ; 1592-1594 1992</p> <p data-bbox="161 239 426 327">F.P. Monforts, A. Meier, G. Scheurich, G. Haake, J.W. Bats</p>	<div data-bbox="791 216 1470 572">  <p data-bbox="1108 310 1145 330">R =</p> </div> <p data-bbox="931 639 1378 667">Chlorine portant un groupement estradiol</p>	<p data-bbox="1838 117 2103 148">bras espaceur : $-(CH_2)_3$</p> <p data-bbox="1838 180 2103 239">R=estradiol avec chaîne alkylée en position 17.</p>

PORPHYRINES COUPLEES AVEC DES MOLECULES SIMPLES (SUCRES, ACIDES AMINES...)				
N°	Réaction	λ (nm) à Q1	Séparation	Conclusion
1	Méthode de Lindsey Méthode de Little	-----	PLC	Les composés 5a,b et 8 ont été testés sur des lignées de cellules de promyélocytes K562 avec l'HP comme référence. Les résultats montrent qu'ils ont une photocytotoxicité faible comparé à celle des dérivés de monomères de porphyrines. Il semble que le manque d'efficacité de ces dimères de porphyrines est dû à leur faible perméabilité cellulaire.
2	Méthode Mac Donald	Dans CH ₂ Cl ₂ /MeOH 630	CCM silice CH ₂ Cl ₂ /MeOH (9/1)	Les agrégats du composés 13 sont trop stables pour être incorporés à des liposomes ou à des lipoprotéines. Par contre, le composé 12, moins hydrophobe présente une grande affinité pour les liposomes, VLDL et LDL. Ceci montre que la structure du photosensibilisateur c'est-à-dire la balance hydrophilie / lipophilie est d'une grande importance dans la capture de celui-ci par les lipoprotéines et les cellules. De plus, les composés 12 et 13 forment des agrégats différents.
3	Méthode de Lindsey	Dans CH ₂ Cl ₂ 6a : 652 6b : 646	PLC (CH ₂ Cl ₂ /MeOH) Col. Seph. LH20 (MeOH)	6a et 6b ont été testés sur des lignées de cellules de promyélocytes K562 avec l'Hp comme référence. 6a (trans) a un délai de réponse > à l'HP mais donne de bons résultats 6b (cis) a une photocytotoxicité faible.
4	Méthode de Lindsey	Dans H ₂ O 19a (654), 19b (654) 20 (652), 21 (654) 22a (654), 22b (652) 23a (652), 23b (652)	Gel filtration sur Col. Seph. LH20 # CCM : 19a,b: THF/H ₂ O (8/2) # CH ₂ Cl ₂ /MeOH (70/30) 20 : THF/H ₂ O # CH ₂ Cl ₂ /EtOH/H ₂ O (4/6/2) 21 : THF/H ₂ O # CH ₂ Cl ₂ /EtOH/H ₂ O (4/6/2) 22a,b : MeOH/H ₂ O(9/1) # CH ₂ Cl ₂ /EtOH/H ₂ O(4/6/2) 23 : ----- # CH ₂ Cl ₂ /MeOH (80/20)	Les porphyrines glycosylées ont non seulement une bonne solubilité dans les solutions aqueuses mais aussi de possibles interactions spécifiques avec la membrane cellulaire. Cette propriété peut être accrue en utilisant de petits oligopeptides appropriés. La présence de groupes aryles lipophiles et de substituants hydrophiles pourrait augmenter l'interaction avec la membrane lipidique. Les composés ont été testés sur des lignées de cellules de promyélocytes K562 avec l'HP comme référence. 20, 21 et 22a ont une action comparable à celle de l'HP quand l'irradiation est > à 60 min.
5	Glycosylation de Bennett	~ 650	Chromato. gel de silice : CH ₂ Cl ₂ /EtOH (95/5)	Les composés ont été testés sur des lignées de levures <i>Saccharomyces cerevisiae</i> FL100 (ATCC29383) avec l'HP comme référence. Les composés 6,7 et 8 de type <i>ortho</i> sont + efficaces que leurs homologues <i>para</i> . La spécificité d'action photocytotoxique n'est pas directement reliée à la nature du cycle glycosylé. Le délai d'action de ces composés est analogue à celui de l'HP.

N°	Réaction	λ (nm) à Q1	Séparation	Conclusion
6	Méthode de Lindsey	Dans DMSO 1a (648), 1b (648) 2a (648), 2b (648) 3a (648), 3b (649) 4a (642), 4b (642)	-----	<p>Les composés ont été testés sur des lignées de cellules HeLa avec le TPPS et le TMPyP comme référence.</p> <p>Le composé octaglicosylé 4a, synthétisé dans le but d'obtenir une haute affinité vis-à-vis de la membrane cellulaire n'a pas montré de réels résultats ceci dû à la structure volumineuse de ce composé.</p> <p>Le composé 1a (tétraacétylglucose) a permis d'obtenir les meilleurs résultats.</p> <p>Importance du sucre utilisé et de la protection ou non des OH de ce sucre.</p> <p>Une structure volumineuse avec un fort caractère hydrosoluble (4b) sera moins efficace qu'une structure plane hydrophobe (1a).</p> <p><u>Ccl</u>: Protéger les sucres avec des groupements acétyle augmente l'incorporation du composé dans la cellule. Nécessité de ne pas utiliser des composés trop volumineux.</p>
7	Méthode de Lindsey	-----	PLC (CH ₂ Cl ₂ /EtOH ; 95/5)	<p>Les composés ont été testés sur des lignées de cellules de promyélocytes K562 avec l'HP comme référence.</p> <p>9a,b et 10 a,b sont immédiatement après l'irradiation moins efficaces que l'HP mais présentent un effet analogue à celle-ci après un jour d'incubation dans le noir.</p>
8	Modification	Dans pyridine/ CH ₂ Cl ₂ 15 : 668 33 : 640	-----	<p>Test in vivo sur des souris.</p> <p>Le composé 15 est actif à 1mg/kg ceci 3 heures après l'injection.</p> <p>Le composé 33 est toxique à 2 mg/kg. A des doses plus faibles, on note une reprise de l'activité tumorale 15 jours après le traitement à la lumière.</p>
9	Méthode de Little	(CH ₃) ₂ CO/H ₂ O (1/1) 12a,b (642/644) 13a,b (640/642) 14a,b (642/644) 15a,b (642/650) 16a,b (644/650) 17a,b (648/650) 18a,b (642/646) 19a,b (648/648)	CCM silice ou cellulose / Chrom. sur col. de silice 12a,b : SiO ₂ , ac. acétique/pyridine (1/1) 13a,b : cellulose, butanol/ac. acétique/eau (4/1/5) 14a,b : cellulose, SiO ₂ , butanol/ac. acétique/eau (4/1/5) 15a,b : SiO ₂ , ac. acétique/pyridine (1/1) 16a,b : cellulose, butanol/ac. acétique/eau (4/1/5) 17a,b : cellulose, butanol/ac. acétique/eau (4/1/5) 18a,b : SiO ₂ , ac. acétique/pyridine (1/1) 19a,b : SiO ₂ , acétone/eau (9/1)	<p>Le cycle glucosyle sert à augmenter l'interaction membranaire avec les composés glucanes de la cellule.</p> <p>Les différents substituants lipophiles vont accroître la pénétration à travers la membrane.</p> <p>Etudes PDT en cours.</p>

N°	Réaction	λ (nm) à Q1	Séparation	Conclusion
10	Synthèse	~ 650	CCM / Chrom. sur colonne de silice Eluents nbreux : CH_2Cl_2 /éther, CH_2Cl_2 /acétone...	<p>Les cycles glucopyranosyle, galactopyranosyle, maltosyle, glucosaminosyle reliés en position para du cycle aromatique confèrent à la porphyrine une bonne solubilité dans l'eau.</p> <p>Les groupements phényle, alkyle ou pentafluorophényle en position méso sont présents afin d'augmenter la lipophilie de la porphyrine.</p> <p>Les résultats montrent que le degré de substitution glycosylée et la nature des substituants lipophiles ont une répercussion directe sur l'efficacité de la photocytotoxicité des photosensibilisateurs.</p> <p>Les dérivés méso-butyles et méso-pentafluorophényles ont montré les meilleures activités antitumorales.</p> <p>Le caractère amphiphile est déterminant pour avoir une bonne activité antitumorale.</p>
11	Méthode de Lindsey modifiée	<p>Dans CHCl_3 :</p> <p>4 : 650</p> <p>6 : 652</p> <p>Dans H_2O :</p> <p>10 : faible pic à 650</p>	-----	Méthode de Lindsey modifiée : condensation de pyrroles et dérivés du glycéraldéhyde dans CH_2Cl_2 en présence de $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$.
12	Méthode Rothmund	<p>Dans EtOH</p> <p>3 : 646</p> <p>4 : 646</p> <p>5 : 653</p> <p>6 : 651</p>	Chromatographie sur colonne de silice : Eluent : $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (40/1)	Synthèse uniquement.
13	Méthode de Adler-Longo	-----	PLC ($\text{AcOH}/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$; 3/2/1)	<p>Les cycles saccharides augmentent la solubilité du composé dans l'eau, les interactions membranaires et la spécificité vis-à-vis de récepteurs membranaires.</p> <p>La présence de substituants méthyle, isopropyle et n-octyle sur des groupements pyridinium augmente la pénétration de ces composés dans la membrane cellulaire.</p> <p>Etude biologique en cours.</p>

N°	Réaction	λ (nm) à Q1	Séparation	Conclusion
14	Modification	Dans CHCl_3 2 : 643 3 : 715 6 : 642 8 : 643 9 : 641 10 : 642 11 : 641 12 : 641	Gel silice 2 : CHCl_3 /acétone (98/2) 6 : CHCl_3 8 : CH_2Cl_2 10 : CHCl_3 /MeOH (99/1) 11 : CHCl_3 /MeOH (95/5) 12 : CHCl_3 /MeOH (10/1)	<p><u>Remarque :</u> Chlorine = dihydroporphyrine Bactéριοchlorine = tétrahydroporphyrine</p> <p>Il apparaît qu'un photosensibilisateur avec des propriétés amphiphiles est intéressant. Ces composés agissent plus en profondeur que le Photofrin, mais besoin d'étudier leur sélectivité d'action afin d'évaluer les effets secondaires qu'ils pourraient occasionner.</p>
15	Synthèse	Dans H_2O 11 : 614	-----	<p>Les porphyrines avec des cycles saccharides présentent non seulement une bonne solubilité dans l'eau mais aussi une bonne interaction membranaire. L'activité photosensibilisante est déterminée par cette réaction :</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>Le composé 11 est presque aussi efficace que l'HP et le Rose bengale.</p>
16	Modification	-----	-----	<p>Les dimères avec liaison ester sont instables ; les trimères sont très stables thermiquement. Les liaisons éther sont cassées par l'acide. Par conséquent, il semblerait que les liaisons éther reliant les oligomères du Photofrin soient scindées dans la tumeur où le pH est acide.</p>
17	Réduction partielle de deutéroporphyrine avec le borohydrure de sodium	6 : 622 12 : 620		<p><u>1^{ère} synthèse</u> de dimères et trimères avec liaison éther. 12 présente une activité anti-tumorale similaire à celle du Photofrin II. 6 est inactif aux mêmes doses. Les composés 6 et 12 ressemblent à des composés de l'HpD et du Photofrin II.</p>

PORPHYRINES COUPLEES A UNE MOLECULE COMPLEXE

N°	Réaction	λ (nm) à Q1	Séparation	Conclusion
1	Méthode de Lindsey	-----	Chromato. répétée sur colonne flash	L'allure de la cinétique de liaison du composé sur un récepteur à l'estradiol est analogue à celle de l'estradiol mais l'affinité est moindre. Etudes biologiques en cours. Ciblage : cancer du sein, cancer de l'ovaire.
2	Modification	Dans CH ₂ Cl ₂ 4a-c : 647-650	Gel silice	L'intercalation et la photosensibilisation peuvent être couplées pour accroître l'activité « nucléase »
3	Modification	Dans CHCl ₃ 10 : 640	-----	Dans les estrogènes, la région phénolique est cruciale pour la fixation aux récepteurs : la chlorine est donc fixée à l'opposé, au niveau du OH (17) avec un bras espaceur diéther de longueur appropriée.

ANNEXE 4

Principe général de synthèse des *méso* porphyrines.

Méthode	Rothemund	Adler/Longo	Little	Lindsey
Article	J. Am. Chem. Soc. 1941, 63, 267-270	J. Org. Chem. 1967, 32, 476	J. Heterocycl. Chem. 1975, 12, 343-345	J. Org. Chem. 1987, 52, 827-836
Réactifs	Benzaldéhyde Pyrrole	Benzaldéhyde Pyrrole	Pyrrole Aldéhyde 1 Aldéhyde 2	Benzaldéhyde Pyrrole
Conditions	Pyridine/150°C Tube scellé/N ₂	Acide propionique Reflux/30 min	Acide propionique Reflux/141°C	1) Dichlorométhane BF ₃ -éthérate, TEOA N ₂ /20°C/1h 2) TCQ ou DDQ Reflux/39°C/1h
Nbre Etapes	1	1	1	2
Rdt	5%	20%	8%	46%

ANNEXE 5

PROTOCOLES

Première voie de synthèse :

Mode opératoire :

La PplX (300 mg ; 0,533 mmol) est placée dans un tricol protégé de la lumière avec de l'aluminium. Le ballon est purgé avec de l'azote et soumis à une circulation d'azote. Du diméthylformamide (7 mL) est ajouté pour solubiliser la PplX. Le 1,3 dicyclohexylcarbodiimide (2,4 éq. mol. ; 263,59 mg ; 1,279 mmol) et le N-hydroxysuccinimide (2,4 éq. mol. ; 147,15 mg ; 1,279 mmol) sont ajoutés à la solution formée. La réaction se poursuit sous agitation à 20°C pendant 24 h et sous atmosphère d'azote pour conduire à la PplX activée.

La PplX activée est filtrée sur du coton. La tétra-O-acétyl-D-glucosamine (2,4 éq. mol. ; 400 mg) est ajoutée à la solution. Le milieu réactionnel est laissé sous agitation et sous atmosphère d'azote, à l'abri de la lumière pendant 4 h. La réaction terminée, la solution est versée dans 30 mL d'eau glacée : le dérivé PplX précipite. Les cristaux récupérés sont mis au dessiccateur sous vide.

Suivi de la réaction :

CCM.

Eluent : éthanol/CHCl₃ (5/95).

Purification :

Colonne de silice.

Eluent : acétone/CH₂Cl₂ (8/92).

RMN :

Les spectres obtenus ne sont pas satisfaisants, dans la mesure où les groupements acétyles ne sont pas correctement retrouvés.

Deuxième voie de synthèse :

Mode opératoire :

La PpIX (250 mg ; 0,44 mmol) placée dans un tricol purgé avec de l'azote est suspendue dans 25 mL de tétrahydrofurane sec contenant 1,5 mL de triéthylamine sèche. Le mélange est refroidi à 0°C et 1,3 mL (13 mmol) de chloroformiate d'éthyle sont ajoutés goutte à goutte dans la solution sous agitation, sous atmosphère d'azote, à 0°C. Le suivi de la réaction par CCM avec chloroforme/méthanol (9/1) comme éluant montre que la réaction est terminée après 45 min.

Dans la solution de PpIX activée, sous agitation, à 0°C, 795 mg (3,68 mmol) de chlorhydrate de D-glucosamine, 3 mL d'éthanol, 1,5 mL (10,7 mmol) de triéthylamine et 0,3 mL d'eau sont ajoutés. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 12 h. La réaction est suivie par CCM avec l'éluant chloroforme/méthanol (9/1).

La réaction terminée, le solvant est évaporé sous pression réduite. Le résidu obtenu est placé dans 20 mL d'un mélange méthanol/eau (4/1). Celui-ci apparaît rouge car la suspension du produit n'est pas totale. Quelques gouttes d'acide acétique 10% sont ajoutées jusqu'à complète précipitation du résidu.

Le mélange est ensuite filtré sur fritté puis lavé plusieurs fois avec une solution de méthanol/eau (2/1) à froid afin de récupérer l'excès de glucosamine.

Les cristaux obtenus sont placés au dessiccateur sous vide puis suspendus dans du chloroforme ; le mélange est placé sous agitation pendant une heure, puis filtré ; des lavages sont répétés jusqu'à ce que le filtrat soit incolore. 543 mg du dérivé PpIX sont récupérés.

Les 543 mg (0,62 mmol) du dérivé PpIX sont dissous dans 50 mL de pyridine. 25 mL d'anhydride acétique sont ajoutés goutte à goutte dans la solution maintenue à 0°C, sous agitation et sous atmosphère d'azote.

La solution est évaporée sous pression réduite. Un mélange toluène/chloroforme (7/3) est ajouté régulièrement à la solution pour faciliter l'évaporation de la pyridine. L'opération dure environ deux heures. Le résidu obtenu est purifié. 230,8 mg du dérivé PpIX sont récupérés.

Purification :

Colonne de silice.

Eluent : chloroforme/méthanol (50/1).

RMN :

Les spectres obtenus ne sont pas satisfaisants, dans la mesure où les groupements acétyles ne sont pas correctement retrouvés.

Troisième voie de synthèse :

Mode opératoire :

La PpIX (250 mg, 0,44 mmol) placée dans un tricol purgé avec de l'azote est suspendue dans 25 mL de tétrahydrofurane sec contenant 1,5 mL de triéthylamine sèche. Le mélange est refroidi à 0°C et 1,3 mL (13 mmol) de chloroformiate d'éthyle sont ajoutés goutte à goutte dans la solution sous agitation, sous atmosphère d'azote, à 0°C. Le suivi de la réaction par CCM avec chloroforme/méthanol (9/1) comme éluant montre que la réaction est terminée après 50 min.

Dans la solution de PpIX activée, sous agitation, à 0°C, 795 mg de glucosamine acétylée, 6 mL d'éthanol sont ajoutés. Le milieu réactionnel est maintenu sous agitation à température ambiante pendant 12 h. La réaction est suivie par CCM avec l'éluant chloroforme/méthanol (9/1).

La réaction terminée, le solvant est évaporé sous pression réduite ; le résidu obtenu est lavé à l'éther, récupéré sur fritté puis placé au dessicateur sous vide. Après purification, on obtient 381 mg du dérivé PplX.

Purification :

Colonne de silice.

Eluent : CH₂Cl₂/Acétone (89/11).

RMN :

Les groupements acétyles sont correctement retrouvés mais le nombre de groupements glucosamine par molécule de porphyrine semble anormalement élevé.

Synthèse de la glucosamine acétylée :

Mode opératoire :

Au chlorhydrate de D-glucosamine (10,03 g ; 46,4 mmol) dissous dans une solution de NaOH 1N (50 mL) et maintenu sous agitation à 20°C, est ajouté le *p*-tolualdéhyde (1 éq. mol. ; 46,4 mmol ; 5,57 g ; 5,5 mL). Après 1 h d'agitation, le précipité obtenu est filtré, lavé successivement avec de l'eau froide, de l'éthanol et de l'éther éthylique, puis mis à sécher au dessicateur sous vide pour conduire à l'imine N-(*p*-méthylbenzylidène)-D-glucosamine (M = 281 g.mol⁻¹ ; 9,7 g ; 34,5 mmol ; 74%).

L'anhydride acétique en excès (9 éq. mol. ; 310 mmol ; 29 mL) est ajouté goutte à goutte à la N-(*p*-méthylbenzylidène)-D-glucosamine (9,67 g ; 34,5 mmol) dissoute dans la pyridine (47 mL) maintenue sous agitation à 0°C et sous atmosphère d'azote. La réaction se poursuit sous agitation à 20°C pendant 24 h. Le milieu réactionnel est jeté sur de l'eau glacée, le précipité obtenu est filtré, lavé à l'eau et à l'éthanol, puis laissé une nuit au dessicateur sous vide pour conduire à la N-(*p*-

méthylbenzylidène)-tétra-O-acétyl-D-glucosamine (5,3 g ; 11,9 mmol) avec un rendement de 41 %.

De l'acide chlorhydrique 5 N (1 éq. mol. ; 2,4 mL) est ajouté à une solution de N-(p-méthylbenzylidène)-tétra-O-acétyl-D-glucosamine (5,3 g ; 11,9 mmol) dans l'actéone (70 mL). Un précipité blanc rapidement formé est dissous dans de l'eau. Après évaporation de l'acétone, l'aldéhyde indésirable est extrait au chlorure de méthylène. La phase aqueuse est ensuite neutralisée par du bicarbonate de sodium et extraite au chlorure de méthylène. La phase organique séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée conduit à la tétra-O-acétyl-D-glucosamine (3,29 g ; 9,49 mmol) avec un rendement de 80 %.

Point de fusion :

F = 138°C



DEMANDE D'IMPRIMATUR

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIEprésenté par **Sébastien AUBERT**Sujet :**Nouveaux photosensibilisants pour la thérapie
photodynamique**Jury :*Président :* M. Alain MARSURA, Professeur*Juges :*

Mme Marie-Christiane CARRE, Chargé de Recherche INSERM

Mme Marie-Laure VIRIOT, Directeur de Recherche CNRS

M. Jean-Louis MERLIN, Pharmacien

Vu,

Nancy, le 12 juillet 2000

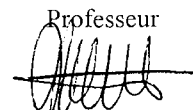
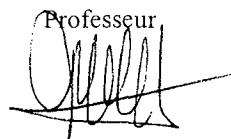
Le Président du Jury

Le Directeur de Thèse

M. Alain MARSURA,**M. Alain MARSURA,**

Professeur

Professeur



Co-directeur de thèse

Co-directeur de thèse

Mme M-C. CARRE,**Mme M-L. VIRIOT,**


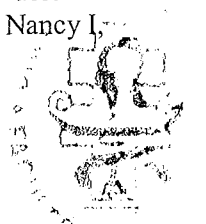
Chargé de Recherche INSERM

Directeur de Recherche CNRS



Vu et approuvé,

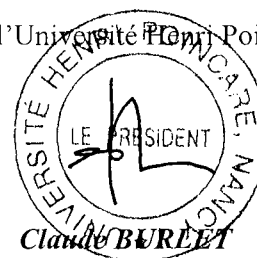
Nancy, le 13 juillet 2000

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré – Nancy I
Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le 24 juillet 2000
n° 832

Le Président de l'Université Henri Poincaré – Nancy I



N° d'identification : PH Nancy 80 n° 68

Nouveaux photosensibilisants pour la thérapie photodynamique

Thèse soutenue le 29 août 2000

Par Sébastien AUBERT

RESUME :

La thérapie photodynamique est une méthode de détection et un mode de traitement des tumeurs. Son mode d'action est basé sur l'utilisation concomitante de la lumière et d'un agent photosensibilisant. Suite à l'absorption d'un quantum d'énergie, le photosensibilisateur va subir des changements d'états d'énergie et parvenir à l'état triplet, élément de départ de réactions de type I et II, avec pour substrat respectivement des molécules réductrices et l'oxygène.

Actuellement, le PHOTOFRIN[®] reste le produit phare de la PDT. Cependant, ses effets secondaires et sa longueur d'onde d'absorption relativement basse ont conduit à l'apparition de divers photosensibilisateurs de deuxième génération plus spécifiques et efficaces, se distinguant par des caractéristiques structurales nombreuses et variées.

En marge d'un panel de différents photosensibilisateurs, différentes voies de synthèse d'un nouvel agent photosensibilisant, la Protoporphyrine IX glucosamidée sont présentées.

MOTS CLES :

Porphyrines, Thérapie photodynamique, Photosensibilisation, Oxygène singulet.

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
M. A. MARSURA	Chimie Thérapeutique Faculté de Pharmacie	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème <input type="checkbox"/>
Co-directeurs de thèse Mme M-L. VIRIOT Mme M-C. CARRE	DCPR-GRAPP Groupe ENSIC	

Thèmes :

- 1 - Sciences fondamentales
③ - Médicament
5 - Biologie

- 2 - Hygiène/Environnement
4- Alimentation – Nutrition
6- Pratique professionnelle