



HAL
open science

Les phtalocyanines utilisées en cancérologie expérimentale et clinique: synthèse d'une métallophtalocyanine de zinc vectorisable pour des applications en thérapie photodynamique

Vincent Manneville

► **To cite this version:**

Vincent Manneville. Les phtalocyanines utilisées en cancérologie expérimentale et clinique: synthèse d'une métallophtalocyanine de zinc vectorisable pour des applications en thérapie photodynamique. Sciences pharmaceutiques. 2006. hal-01734328

HAL Id: hal-01734328

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01734328>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



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>

7 / PH / N / 2006 / 9

Université Henri Poincaré – Nancy I
2006

DOUZE

FACULTE DE PHARMACIE

Les phtalocyanines utilisées en cancérologie expérimentale et clinique
Synthèse d'une métallophtalocyanine de zinc vectorisable
pour des applications en thérapie photodynamique

THESE

Présentée et soutenue publiquement

Le 22 mars 2006

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Vincent Manneville
Né le 10 février 1980



DB 32565

Membres du Jury

Président : M. Jean-Louis Merlin, Professeur,
EA 3452, Laboratoire de biologie cellulaire oncologique, Faculté de
Pharmacie, Nancy

Juges : Mme Muriel Barberi-Heyob, HDR, Chargée de recherche,
Centre Alexis Vautrin-CRAN, UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Vandoeuvre-les-
Nancy

Mlle Céline Frochot, Chargée de recherche CNRS,
DCPR, UMR 7630 CNRS-INPL, groupe ENSIC, Nancy

BU PHARMA-ODONTOL



D

104 071880 6

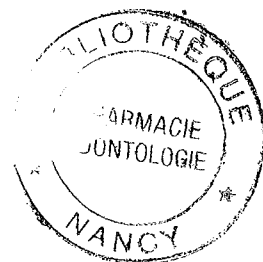
111 21 60 58X

Université Henri Poincaré – Nancy I
2006

FACULTE DE PHARMACIE

**Les phtalocyanines utilisées en cancérologie expérimentale et clinique
Synthèse d'une métallophthalocyanine de zinc vectorisable
pour des applications en thérapie photodynamique**

THESE



Présentée et soutenue publiquement

Le 22 mars 2006

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par Vincent Manneville
Né le 10 février 1980

DB 32565

Membres du Jury

- Président : M. Jean-Louis Merlin, Professeur,
EA 3452, Laboratoire de biologie cellulaire oncologique, Faculté de
Pharmacie, Nancy
- Juges : Mme Muriel Barberi-Heyob, HDR, Chargée de recherche,
Centre Alexis Vautrin-CRAN, UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Vandoeuvre-les-
Nancy
- Mlle Céline Frochot, Chargée de recherche CNRS,
DCPR, UMR 7630 CNRS-INPL, groupe ENSIC, Nancy

Membres du personnel enseignant 2005/2006

Doyen

Chantal FINANCE

Vice Doyen

Francine PAULUS

Président du Conseil de la Pédagogie

Pierre LABRUDE

Responsable de la Commission de la Recherche

Jean-Claude BLOCK

Directeur des Etudes

Gérald CATAU

Responsable de la Filière officine

Gérald CATAU

Responsables de la Filière industrie

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Isabelle LARTAUD

Responsable de la Filière hôpital

Jean-Michel SIMON

DOYEN HONORAIRE

M. VIGNERON Claude

PROFESSEURS HONORAIRES

Mle BESSON Suzanne

Mle GIRARD Thérèse

M. JACQUE Michel

M. LECTARD Pierre

M. LOPPINET Vincent

M. MARTIN Jean-Armand

M. MORTIER François

M. MIRJOLET Marcel

M. PIERFITTE Maurice

PROFESSEURS EMERITES

M. BONALY Roger

M. HOFFMAN Maurice

M. SIEST Gérard

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Mme FUZELLIER Marie-Claude

Mle IMBS Marie-Andrée

M. MONAL Jean-Louis

Mme POCHON Marie-France

Mme ROVEL Anne

Mme WELLMAN-ROUSSEAU Marie Monica

PROFESSEURS

M. ASTIER Alain

M. ATKINSON Jeffrey

M. AULAGNER Gilles

M. BAGREL Alain

Mle BATT Anne-Marie

M. BLOCK Jean-Claude

Mme CAPDEVILLE-ATKINSON Christine

Mme FINANCE Chantal

Mme FRIANT-MICHEL Pascale

Mle GALTEAU Marie-Madeleine

M. HENRY Max

M. JOUZEAU Jean-Yves

M. LABRUDE Pierre

Mme LARTAUD Isabelle

Mme LAURAIN-MATTAR Dominique

M. LALLOZ Lucien

M. LEROY Pierre

M. MAINCENT Philippe

M. MARSURA Alain

M. MERLIN Jean-Louis

M. NICOLAS Alain

M. REGNOUF de VAINS Jean-Bernard

M. RIHN Bertrand

Mme SCHWARTZBROD Janine

M. SIMON Jean-Michel

M. VIGNERON Claude

Pharmacie clinique

Pharmacologie cardiovasculaire

Pharmacie clinique

Biochimie

Toxicologie

Santé publique

Pharmacologie cardiovasculaire

Virologie, immunologie

Mathématiques, physique, audioprothèse

Biochimie clinique

Botanique, mycologie

Bioanalyse du médicament

Physiologie, orthopédie, maintien à domicile

Pharmacologie

Pharmacognosie

Chimie organique

Chimie physique générale

Pharmacie galénique

Chimie thérapeutique

Biologie cellulaire oncologique

Chimie analytique

Chimie Thérapeutique

Biochimie

Bactériologie, parasitologie

Droit officinal, législation pharmaceutique

Hématologie, physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

| | | |
|-----|---------------------------|--|
| Mme | ALBERT Monique | Bactériologie - virologie |
| Mme | BANAS Sandrine | Parasitologie |
| Mme | BENOIT Emmanuelle | Communication et santé |
| M. | BOISBRUN Michel | Chimie Thérapeutique |
| Mme | BOITEUX Catherine | Biophysique, Audioprothèse |
| M. | BONNEAUX François | Chimie thérapeutique |
| M. | CATAU Gérard | Pharmacologie |
| M. | CHEVIN Jean-Claude | Chimie générale et minérale |
| M | CLAROT Igor | Chimie analytique |
| Mme | COLLOMB Jocelyne | Parasitologie, conseils vétérinaires |
| M. | COULON Joël | Biochimie |
| M. | DANGIEN Bernard | Botanique, mycologie |
| M. | DECOLIN Dominique | Chimie analytique |
| M. | DUCOURNEAU Joël | Biophysique, audioprothèse, acoustique |
| M. | DUVAL Raphaël | Microbiologie clinique |
| Mme | FAIVRE Béatrice | Hématologie |
| M. | FERRARI Luc | Toxicologie |
| Mle | FONS Françoise | Biologie végétale, mycologie |
| M. | GANTZER Christophe | Virologie |
| M. | GIBAUD Stéphane | Pharmacie clinique |
| Mle | HINZELIN Françoise | Mycologie, botanique |
| M. | HUMBERT Thierry | Chimie organique |
| M. | JORAND Frédéric | Santé, environnement |
| Mme | KEDZIEREWICZ Francine | Pharmacie galénique |
| Mle | LAMBERT Alexandrine | Biophysique, biomathématiques |
| Mme | LEININGER-MULLER Brigitte | Biochimie |
| Mme | LIVERTOUX Marie-Hélène | Toxicologie |
| Mle | MARCHAND Stéphanie | Chimie physique |
| Mme | MARCHAND-ARVIER Monique | Hématologie |
| M. | MENU Patrick | Physiologie |
| M. | MERLIN Christophe | Microbiologie environnementale et moléculaire |
| M. | NOTTER Dominique | Biologie cellulaire |
| Mme | PAULUS Francine | Informatique |
| Mme | PERDICAKIS Christine | Chimie organique |
| Mme | PERRIN-SARRADO Caroline | Pharmacologie |
| Mme | PICHON Virginie | Biophysique |
| Mme | SAUDER Marie-Paule | Mycologie, botanique |
| Mle | THILLY Nathalie | Santé publique |
| M. | TROCKLE Gabriel | Pharmacologie |
| M. | ZAIYOU Mohamed | Biochimie et biologie moléculaire appliquées aux médicaments |
| Mme | ZINUTTI Colette | Pharmacie galénique |

PROFESSEUR ASSOCIE

| | | |
|-----|------------------|---------------------|
| Mme | GRISON Geneviève | Pratique officinale |
|-----|------------------|---------------------|

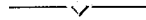
PROFESSEUR AGREGE

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

ASSISTANTS

| | | |
|-----|------------------------|-------------------------------|
| Mme | BEAUD Mariette | Biologie cellulaire |
| Mme | BERTHE Marie-Catherine | Biochimie |
| Mme | MOREAU Blandine | Pharmacognosie, phytothérapie |
| Mme | PAVIS Annie | Bactériologie |

SERMENT DES APOTHICAIRES



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

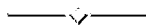
D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

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 ».

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier les personnes qui ont fait que ce mémoire aboutisse :

- Céline Frochot, initiatrice du sujet, qui m'a accompagné dans la réalisation de cette thèse à tous les instants de son élaboration. Je te remercie très affectueusement pour ta présence, ta gentillesse, et ton réconfort,
- Muriel Barberi-Heyob, qui m'a accordé toute son attention dans ses commentaires et ses propositions,
- Jean-Louis Merlin qui a accepté la présidence du Jury et le suivi de ce travail,
- Marie-Laure Viriot pour sa relecture affûtée,
- Marie-Jo Belgy pour son aide précieuse dans les manipulations expérimentales,
- Sébastien Hupont pour son soutien technique dans les analyses photochimiques,
- Michel Georges pour les différents travaux de reprographie.

Je souhaite adresser un grand merci et à ma sincère reconnaissance à ma famille, mes amis et les personnes qui ont été présents à mes côtés tout au long de ce parcours étudiant.

RESUME / ABSTRACT

One of the most prominent new application of phthalocyanine derivatives is their application in medicine for treatment of malignant tumors. This document discusses various phthalocyanines, in particular targeted phthalocyanines, and their applications, and summarizes the results obtained to date.

Phthalocyanines are synthetic porphyrins, with a well-defined identity, whose pyrrol moieties are extended by condensation with extra benzene rings, and bridged by aza nitrogens of methane groups. The elongated conjugated chromophore enables a substantial increase in the extinction coefficient of the Q absorption bands in the visible range of 675-700 nm ($\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). The phthalocyanine macrocycle can chelate with virtually any element from the periodic table and also be substituted at the periphery with diverse substituents. However, aluminium, zinc and silicon phthalocyanines have emerged as the most common photosensitizers of this class. Since a hydrophilic character benefits the transport of a drug in the body, and its lipophilicity benefits its uptake by tumor cells, the amphiphilicity of a photosensitizer is therefore considered to be an important factor in the design of new phthalocyanines.

Phthalocyanines are promising photosensitizers for use in photodynamic therapy (PDT) of tumors, because of both their high selectivity of tumor targeting and their high efficiency of photogeneration of cytotoxic singlet oxygen. PDT requires a sensitizing agent, light energy, and oxygen which when successfully combined create a photodynamic reaction, with cyto and vasculo toxicity. Targeted photodynamic therapy offers the opportunity of enhancing photodynamic efficiency by directly targeting diseased cells and tissues. Photochemical internalisation (PCI) is a unique procedure for site-specific delivery of several types of membrane-impermeable molecules to the cytosol of targeted cells. Several photosensitizers, including phthalocyanines, can activate this PCI. Phthalocyanines are mentioned to be used in boron neutron capture therapy (BNCT), associated with magnetic drug targeting or electroporation, in combined treatment of cancer with hyperthermia. The fluorescence of the phthalocyanines could be used as optical biopsy or as diagnostic agent.

In the last part, the synthesis, purification and optical properties of the 2-(4-carboxyphenoxy) zinc phthalocyanine will be discussed. The aim of this synthesis is to obtain a phthalocyanine with a single chemical functional group. This work should be prolonged with a covalent attachment of biological targeting agent on the phthalocyanine ring.

ABBREVIATIONS

| | |
|--------------------------------|---|
| Φ_f | rendement quantique de fluorescence |
| Φ_T | rendement quantique de formation de l'état triplet |
| Φ_v | rendement quantique de formation d'oxygène singulet |
| 5 ALA | acide $\Delta 5$ -aminolévulinique |
| ADN | acide désoxyribonucléique |
| AlPc | métallophthalocyanine d'aluminium |
| AzaPc | azaphthalocyanine |
| BNCT | <i>boron neutron capture therapy</i> (thérapie de capture de neutron de bore) |
| BSA | albumine sérique bovine |
| DBU | 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène |
| DMAE | diméthylaminoéthanol |
| DMF | N,N-diméthylformamide |
| DMSO | diméthylsulfoxyde |
| DO | densité optique |
| DOPS | 1,2 dioléylphosphatidylsérine |
| DPPC | DL- α -dipalmitoyl phosphatidylcholine |
| EGF | <i>epidermal growth factor</i> |
| GSH | glutathion sous forme réduite |
| GSSG | glutathion sous forme oxydée |
| HDL | <i>high density lipoprotein</i> |
| HNSCC | <i>head and neck squamous cell carcinoma</i> (carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou) |
| HpD | <i>hematoporphyrin derivatives</i> (hématoporphyrine dérivée) |
| HPLC | <i>high pressure liquid chromatography</i> (chromatographie liquide haute pression) |
| K ₂ CO ₃ | carbonate de potassium |
| LDL | <i>low density lipoprotein</i> |
| MAb | anticorps monoclonaux |
| NADPH | nicotinamide adénine dinucléotide phosphate |
| Pc | <i>phthalocyanine</i> (phtalocyanine) |
| PCI | <i>photochemical internalisation</i> (internalisation photochimique) |
| PDT | <i>photodynamic therapy</i> (thérapie photodynamique) |

| | |
|---------|---|
| POPC | 1-palmitoyl, 2-oléoylphosphatidylcholine |
| PS | photosensibilisant |
| RAF | récepteur à l'acide folique |
| RMN | résonance magnétique nucléaire |
| ROS | espèces oxygénées réactives |
| SDS | dodécyle sulfate de sodium |
| SiPc | métallophthalocyanine de silicium |
| SOD | superoxyde dismutase |
| TDiBOPc | tétradibenzobarréleno-octabutoxy phtalocyanines |
| THF | tétrahydrofurane |
| UV | ultraviolet |
| ZnPc | métallophthalocyanine de zinc |

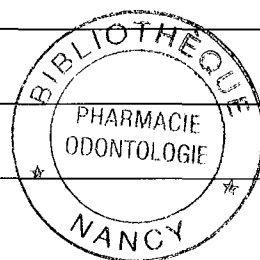


TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| Introduction | 1 |
| <hr/> | |
| 1^{ère} partie : | |
| Structure, modes d'obtention, caractéristiques, propriétés des phtalocyanines | 3 |
| <hr/> | |
| 11. Structure..... | 3 |
| 12. Voies de synthèse..... | 3 |
| 121. Voies de synthèses usuelles | 3 |
| 122. Voies de synthèses spécifiques de phtalocyanines non symétriques | 6 |
| 1221. Condensation statistique (<i>statistical condensation</i>) | 6 |
| 1222. Approche par subphtalocyanines | 7 |
| 1223. Synthèse sur support solide | 8 |
| 1224. Autres méthodes | 8 |
| 123. Purification | 9 |
| 13. Caractéristiques photophysiques et photochimiques..... | 9 |
| 131. Spectre d'absorption | 9 |
| 132. Spectre d'émission de fluorescence | 10 |
| 133. Rendement quantique de fluorescence | 10 |
| 134. Influence de l'ion métallique central | 10 |
| 14. Comportement en milieu biologique..... | 11 |
| 141. Agrégation | 11 |
| 142. Sélectivité | 12 |
| 143. Hydrophilie / Lipophilie | 12 |
| 144. Influence de la structure des phtalocyanines | 12 |
| 1441. Sur l'agrégation | 12 |
| 1442. Sur la balance hydrophile / lipophile | 13 |
| | |
| 2^{ème} partie : | |
| Applications des phtalocyanines en cancérologie | 15 |
| <hr/> | |
| 21. La thérapie photodynamique : PDT..... | 15 |
| 211. Les grandes lignes de la PDT..... | 15 |
| 2111. Principes photochimiques de la PDT | 16 |
| 2112. L'oxygène dans la PDT | 18 |
| 21121. L'oxygène singulet | 18 |
| 21122. L'oxygénation tissulaire | 19 |
| 2113. Les photosensibilisants | 19 |
| 2114. La lumière | 22 |
| 2115. Action cellulaire | 23 |
| 2116. Choix du véhicule | 24 |
| 212. Les phtalocyanines utilisées comme photosensibilisants de 2 ^{de} génération..... | 24 |
| 2121. Les phtalocyanines non métalliques | 24 |
| 2122. Les métallophtalocyanines d'aluminium | 25 |
| 21221. La métallophtalocyanine d'aluminium non substituée | 25 |
| 21222. Les métallophtalocyanines d'aluminium sulfonées | 28 |

| | |
|---|-----------|
| 2123. Les métallophthalocyanines de zinc | 32 |
| 21231. Structure | 32 |
| 21232. Administration | 32 |
| 21233. Pénétration et localisation cellulaire | 32 |
| 21234. Mécanisme d'action | 33 |
| 21235. Propriétés pharmacocinétiques | 33 |
| 21236. Les métallophthalocyanines de zinc sulfonées | 34 |
| 21237. Développement <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> | 35 |
| 21238. Développement structural | 38 |
| 2124. Les métallophthalocyanines de silicium | 42 |
| 21241. Structure | 42 |
| 21242. Développement | 42 |
| 21243. Pc4 | 44 |
| 2125. Les autres phtalocyanines métallées | 47 |
| 2126. Les tétradibenzobarréleno-octabutoxy phtalocyanines | 47 |
| 2127. Les analogues des phtalocyanines | 49 |
| 21271. Azaphtalocyanines | 49 |
| 21272. Naphtalocyanines | 49 |
| 213. Les phtalocyanines utilisées comme photosensibilisants de 3 ^{ème} génération..... | 50 |
| 2131. Protéines sériques | 50 |
| 21311. Albumine | 50 |
| 21312. Lipoprotéines | 51 |
| 21313. Autres protéines sériques | 52 |
| 2132. Stéroïdes | 53 |
| 21321. Cholestérol | 53 |
| 21322. Oestrogènes | 53 |
| 2133. <i>Epidermal growth factor</i> (EGF) | 54 |
| 2134. Acides aminés | 54 |
| 2135. Adénovirus ou protéines adénovirales | 55 |
| 2136. Anticorps monoclonaux | 56 |
| 2137. Autres vecteurs | 57 |
| 22. L'internalisation photochimique : PCI..... | 57 |
| 221. Principe | 57 |
| 222. Perspectives d'utilisation | 58 |
| 2221. Association ALPcS _{2a} et gélonine | 58 |
| 2222. Stimulation de lymphocytes T cytotoxiques | 59 |
| 2223. Thérapie génique | 60 |
| 23. La thérapie de capture de neutron de bore : BNCT..... | 60 |
| 231. Principe | 60 |
| 232. Synthèse de phtalocyanine borée | 61 |
| 233. Propriétés | 62 |
| 234. Perspectives | 62 |
| 24. Stratégies de ciblage par action extérieure..... | 62 |
| 241. Liposomes magnétiques | 62 |
| 242. Hyperthermie | 63 |
| 243. Electroporation | 64 |

| | |
|---|-----------|
| 25. Photodiagnostic..... | 65 |
| 3^{ème} partie : | |
| Synthèse d'une métallophthalocyanine de zinc vectorisable pour des applications en thérapie photodynamique | 66 |
| <hr/> | |
| 31. Introduction..... | 66 |
| 32. Matériel et méthodes..... | 67 |
| 321. Méthode de synthèse | 67 |
| 3211. Schéma global | 67 |
| 3212. Synthèse de l'acide 4-(3,4-dicyanophénoxy)benzoïque | 67 |
| 3213. Synthèse de la 2-(4-carboxyphénoxy) phtalocyanine de zinc | 68 |
| 3214. Méthode de purification | 68 |
| 322. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence, spectre RMN | 69 |
| 323. Coefficients d'extinction molaire | 69 |
| 324. Rendement quantique de fluorescence | 70 |
| 325. Production d'oxygène singulet | 70 |
| 33. Résultats et discussion..... | 71 |
| 331. Synthèse et purification | 72 |
| 332. Propriétés photophysiques | 73 |
| 333. Spectre d'absorption biphotonique | 74 |
| 334. Production d'oxygène singulet | 75 |
| 34. Conclusion et perspectives..... | 76 |
| Conclusion | 77 |
| <hr/> | |
| Bibliographie | 78 |
| <hr/> | |
| Annexe | 87 |
| <hr/> | |



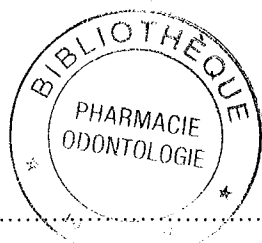


TABLE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| <u>Figure 1</u> : métallophthalocyanine de métal M..... | 3 |
| <u>Figure 2</u> : cyclisation des phthalonitriles en phthalocyanine..... | 4 |
| <u>Figure 3</u> : subphthalocyanine utilisée comme intermédiaire de synthèse de phthalocyanine..... | 7 |
| <u>Figure 4</u> : exemples de phthalocyanine (a) de type ABAB, (b) de type AABB..... | 8 |
| <u>Figure 5</u> : structure chimique (a) de la 1,3-diiminoisoindoline (b) et de la 1,3,3-trichloroisoindoléline.... | 8 |
| <u>Figure 6</u> : spectres d'absorption des H ₂ Pc, ZnPc et AlPc dans le DMSO..... | 9 |
| <u>Figure 7</u> : radical nitroxyde..... | 11 |
| <u>Figure 8</u> : comparaison des spectres d'absorption d'une ZnPc sous forme agrégée ou monomérique..... | 11 |
| <u>Figure 9</u> : métallophthalocyanine de zinc octa-cationique..... | 13 |
| <u>Figure 10</u> : diagramme de Jablonski modifié..... | 16 |
| <u>Figure 11</u> : mécanisme de production de l'ion superoxyde..... | 18 |
| <u>Figure 12</u> : mécanisme de production du radical hydroxyle..... | 18 |
| <u>Figure 13</u> : structure chimique de base des porphyrine, chlorine et bactériochlorine..... | 20 |
| <u>Figure 14</u> : photosensibilisants utilisés en thérapie photodynamique..... | 20 |
| <u>Figure 15</u> : photosensibilisants utilisés en thérapie photodynamique..... | 21 |
| <u>Figure 16</u> : pénétration tissulaire de la lumière à différentes longueurs d'onde..... | 22 |
| <u>Figure 17</u> : action cellulaire des PS en PDT..... | 23 |
| <u>Figure 18</u> : métallophthalocyanines d'aluminium, (a) chloro-métallophthalocyanine d'aluminium (CIAIPc) (b) métallophthalocyanine d'aluminium sulfonée (AlPcS ₄) | 25 |
| <u>Figure 19</u> : formation d'ion superoxyde en présence de PHOTOSENSE, d'oxygène et d'acide ascorbique..... | 30 |
| <u>Figure 20</u> : métallophthalocyanine d'aluminium trisulfonée substituée par deux groupements de biotine... | 31 |
| <u>Figure 21</u> : schéma d'une métallophthalocyanine de zinc non substituée..... | 32 |
| <u>Figure 22</u> : mécanisme proposé pour la pénétration cellulaire de la ZnPc..... | 32 |
| <u>Figure 23</u> : métallophthalocyanines de zinc, (a) ZnPcS _{2a} (b) ZnPcS ₃ C ₆ | 34 |
| <u>Figure 24</u> : ZnPc substituée par quatre groupements sulfonaphoxy..... | 35 |
| <u>Figure 25</u> : ZnPc, octapentyl (ZnOPPc) et octadécyl (ZnODPc) ZnPcs..... | 36 |
| <u>Figure 26</u> : 2,3,9,10,16,17,23,24-octa[(3,5-biscarboxylate)-phenoxy] phthalocyanine de zinc..... | 37 |
| <u>Figure 27</u> : structure des phthalocyanines testées <i>in vitro</i> sur des fibroblastes et des kératinocytes..... | 38 |

| | |
|---|----|
| <u>Figure 28</u> : bis(1,4-didécylbenzo)-bis(3,4-pyrido)porphyrzine de zinc..... | 39 |
| <u>Figure 29</u> : tétra-trifluoroéthoxyl phtalocyanine de zinc..... | 39 |
| <u>Figure 30</u> : 1,4,8,11,15,18-hexahehexyl-22-méthyl-25-(11-mercaptoundecyl) phtalocyanine de zinc..... | 40 |
| <u>Figure 31</u> : système ZnPc-Ru(bpy) ₃ | 41 |
| <u>Figure 32</u> : 2-carboxy métallophtalocyanine de zinc..... | 41 |
| <u>Figure 33</u> : exemples de métallophtalocyanines de silicium..... | 42 |
| <u>Figure 34</u> : bis(4-N-méthylpyridiniumoxy)phtalocyanine de silicium..... | 43 |
| <u>Figure 35</u> : 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy phtalocyanine de silicium..... | 44 |
| <u>Figure 36</u> : Pc4, 3-(diméthylamino-propyl)-diméthyl siloxy hydroxy métallophtalocyanine de silicium.... | 45 |
| <u>Figure 37</u> : structure chimique de la Si-TDiBOPc portant six hexyl comme substituants axiaux..... | 48 |
| <u>Figure 38</u> : (a) azaphtalocyanine de métal M, (b) naphtalocyanine de métal M..... | 49 |
| <u>Figure 39</u> : SiPcs conjuguées de manière non covalente à de la BSA ou de la maleyl-BSA..... | 51 |
| <u>Figure 40</u> : dicholestéryl métallophtalocyanine de silicium..... | 53 |
| <u>Figure 41</u> : ZnPc couplée à du 17 α -éthynylœstradiol..... | 54 |
| <u>Figure 42</u> : ZnPc couplée à différents acides aminés..... | 55 |
| <u>Figure 43</u> : conjugué AlPcS ₄ -penton..... | 55 |
| <u>Figure 44</u> : conjugué AlPcS ₄ -MAb..... | 56 |
| <u>Figure 45</u> : principe de l'internalisation photochimique..... | 58 |
| <u>Figure 46</u> : métallophtalocyanine de zinc liée à 4 cages carboranes..... | 61 |
| <u>Figure 47</u> : TERAPHTHAL, octa 4,5 carboxy métallophtalocyanine de cobalt..... | 63 |
| <u>Figure 48</u> : 2-(4-carboxyphénoxy) métallophtalocyanine de zinc..... | 66 |
| <u>Figure 49</u> : schémas de la Pc expérimentale et de la Pc de référence utilisée..... | 71 |
| <u>Figure 50</u> : spectre de ¹ H RMN et spectre de masse de la 2-(4-carboxyphénoxy) phtalocyanine de zinc... | 72 |
| <u>Figure 51</u> : spectres dans l'éthanol (a) d'absorption et (b) d'émission de fluorescence..... | 73 |
| <u>Figure 52</u> : absorption en fonction de la concentration en ZnPc..... | 74 |
| <u>Figure 53</u> : spectre (a) d'absorption biphotonique de la ZnPc étudiée dans l'éthanol et (b) spectre d'émission de l'oxygène singulet..... | 75 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|--|----|
| <u>Tableau 1</u> : propriétés photophysiques des Pcs..... | 10 |
| <u>Tableau 2</u> : génération d'oxygène singulet par différentes Pcs..... | 47 |
| <u>Tableau 3</u> : rendement quantique de génération du radical superoxyde..... | 47 |
| <u>Tableau 4</u> : paramètres utilisés pour déterminer le rendement quantique de formation d'oxygène singulet..... | 71 |
| <u>Tableau 5</u> : comparaison des bandes d'absorption relevées à celles de la référence..... | 73 |
| <u>Tableau 6</u> : comparaison des coefficients d'extinction molaire aux valeurs relevées pour la référence..... | 74 |

INTRODUCTION

L'origine du mot phtalocyanine (Pc) vient du mot grec « naphta » qui décrit un caractère visqueux ou huileux, et « cyanine » qui traduit une couleur bleue foncée portant sur le vert. Ce nom a été utilisé en premier dès 1933 par Sir Reginald Linstead qui fut un pionnier sur le sujet. On note cependant que les premiers écrits sur les phtalocyanines remontent à 1907. En synthétisant du o-cyanobenzamide à partir de phtalamide et d'anhydride acétique, Braun et Tcheriac ont observé la production d'une impureté colorée dont la structure et l'origine restent inconnues à l'époque. Ce sous-produit ne sera pas étudié avant 1927 où l'on rapporte la préparation de phtalocyanines par Scottish Dyes. Alors utilisées comme colorant ou teinture, les phtalocyanines semblent rencontrer un intérêt qui ouvre un certain nombre d'études. Linstead détermine leur structure dans les années trente, puis on étudiera alors leur synthèse, leur complexation avec les métaux, leur stabilité, et leur nature plane. Cette structure sera confirmée plus tard par Roberston à l'aide de la cristallographie par rayons X.

Pendant 70 ans, des études concernant leurs propriétés photochimiques et photophysiques, ainsi que d'autres voies de synthèse compléteront ces premières approches, puis plus récemment, les phtalocyanines ont trouvé leurs premières applications industrielles comme agents photoconducteurs dans les photocopieurs, détecteurs chimiques, catalyseurs, et dans des polymères [1].

Depuis plus d'une vingtaine d'années maintenant, les phtalocyanines ont été proposées comme photosensibilisants pour la thérapie photodynamique anti-cancéreuse. L'utilisation des phtalocyanines dans des domaines médicaux autres que la cancérologie est aussi envisageable et en cours d'études. On note des applications en hyperplasie intinale avec les métallophtalocyanines de zinc dans les cas de resténoses qui font suite à une angioplastie coronaire [2], le traitement de maladies infectieuses ou mycosiques (notamment sur *C. albicans* [3]), le traitement de l'acné ou de lésions cutanées pré-cancéreuses [4]. On relève aussi l'utilisation d'une métallophtalocyanine d'aluminium disulfonée comme antibactérien actif sur *E. coli* [5], et l'utilisation de métallophtalocyanines d'aluminium ou de silicium actives sur le virus Herpes simplex de type 1 [6]. Au cours de ce travail, nous nous intéresserons particulièrement aux phtalocyanines utilisées en cancérologie, principalement sous forme expérimentale, puisque peu de molécules ont, pour le moment, franchi les

premiers stades des essais cliniques. Dans une dernière partie, nous étudierons la synthèse d'une métallophthalocyanine de zinc portant un groupe fonctionnel permettant une conjugaison avec un vecteur biologique.

STRUCTURE, MODES D'OBTENTION, CARACTERISTIQUES, PROPRIETES DES PHTALOCYANINES

11. Structure

Les phtalocyanines (Pcs) sont des porphyrines de synthèse (tétrabenzo[5,10,15,20] tétraazaporphyrines), qui n'existent que sous forme de traces à l'état naturel. Il s'agit de macrocycles aromatiques plans de 18 électrons π comprenant 4 groupements indoles liés en position 1-3 par des ponts azones : macrocycle tétraazaisoindole (fig.1) [7]. La remarquable délocalisation bidimensionnelle des électrons π sur ces macrocycles leur confère des propriétés physiques uniques. Par ailleurs, les phtalocyanines sont stables chimiquement et thermiquement. Le macrocycle leur confère une grande stabilité thermodynamique [8]. Les phtalocyanines ont la possibilité d'incorporer au sein de leur cavité 70 différents cations métalliques ou non. Il est aussi possible de leur greffer différents substituants.

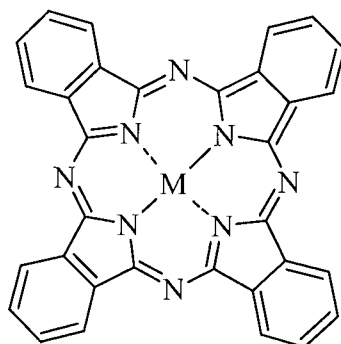


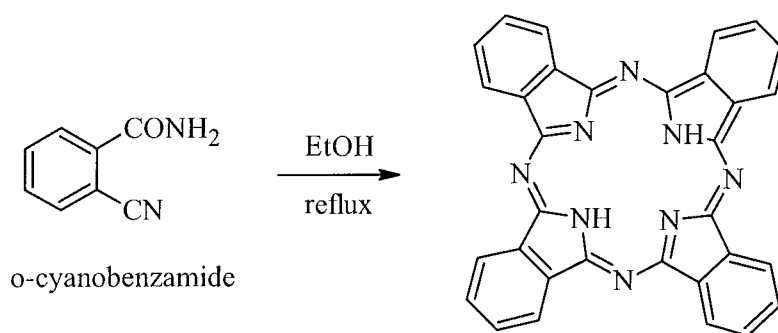
Figure 1 : métallophtalocyanine de métal M

12. Voies de synthèse

Les modes de synthèse et les produits de départ sont très nombreux, nous nous limiterons donc aux voies les plus couramment suivies.

12.1. Voies de synthèses usuelles

Braun et Tcherniac sont les premiers à avoir synthétisé, sans la caractériser, la phtalocyanine d'hydrogène H_2Pc , par chauffage d'*o*-cyanobenzamide dans l'éthanol à reflux [9].



Tomoda et al. ont proposé une autre voie de synthèse pour la phthalocyanine d'hydrogène. Cette réaction met en jeu du phtalonitrile et une base, le 1,8-diazabicyclo[5,4,0]undec-7-ène (DBU), dans l'éthanol à reflux. Le DBU enlève le proton du solvant pour former l'éthanolate nécessaire à la cyclisation. Pour obtenir des Pcs non métallées, on peut aussi faire réagir un phtalonitrile avec un alkoxide de sodium ou de lithium qui donne l'alkalimétal Pc correspondante, démétallisable par un acide minéral [8].

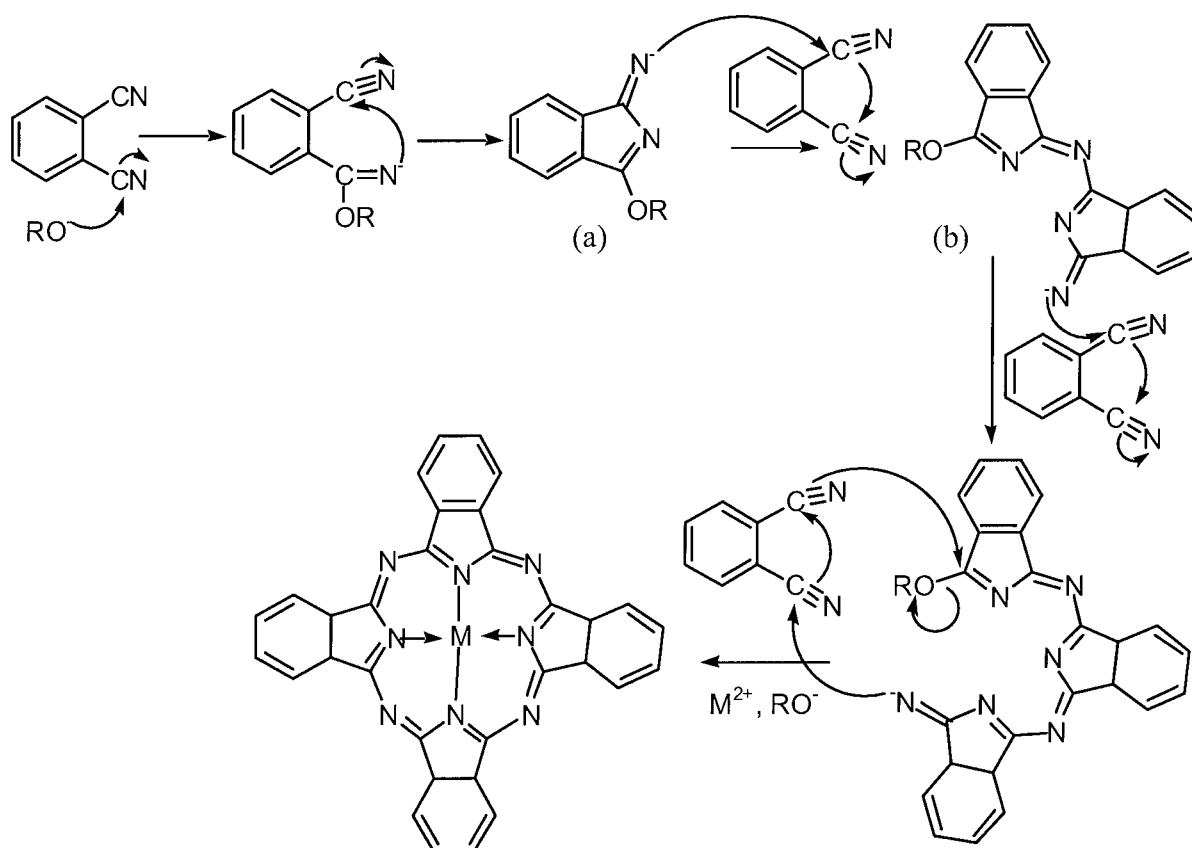
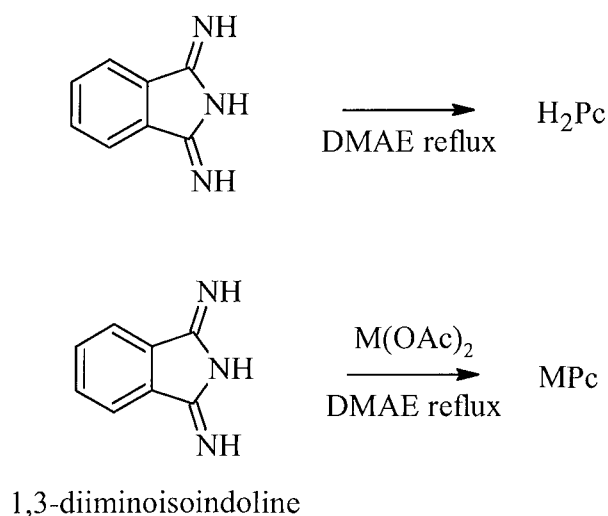


Figure 2 : cyclisation des phtalonitriles en phthalocyanine [9]

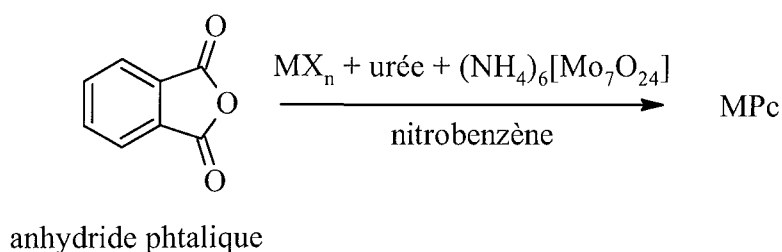
Une première méthode de synthèse de Pc métallée consiste en la cyclisation du 1,2-dicyanobenzène (phtalonitrile), ou l'un de ses analogues, autour de différents ions

métalliques, les réactifs employés étant un sel du métal, le métal lui-même ou un de ses oxydes [9]. La première étape de la cyclisation (fig.2) est la formation de l'alcoolate RO⁻ qui réagit par addition nucléophile sur le carbone d'une des fonctions nitrile du 1,2-dicyanobenzène pour former l'intermédiaire (a). La seconde étape est la réaction entre l'intermédiaire (a) et le phtalonitrile qui conduit à l'intermédiaire (b). A partir de cet intermédiaire, le processus se poursuit par la réaction de (b) sur une nouvelle molécule de phtalonitrile [9].

La 1,3-diiminoisoindoline est également utilisée comme réactif de départ pour la synthèse de phtalocyanines. Ce composé, condensé sur lui-même, forme la phtalocyanine d'hydrogène, ou une phtalocyanine métallée si la réaction a lieu en présence d'ion métallique. L'utilisation d'un solvant comme le diméthylaminoéthanol (DMAE) permet d'augmenter le rendement.



Enfin, l'anhydride phtalique par réaction avec un sel d'ion métallique, en présence d'urée et d'un sel de molybdène jouant le rôle de catalyseur, conduit à l'obtention d'une phtalocyanine métallique [9].



Une autre méthode conventionnelle de préparation des Pcs a été décrite par Assour et al. [10]. Il s'agit d'une cyclisation directe de phtalonitrile et d'hydroquinone.

122. Voies de synthèses spécifiques de phtalocyanines non symétriques

Dans la perspective d'une liaison avec un porteur adéquat qui permettra un ciblage tumoral, l'objectif est de synthétiser une Pc non symétrique type A_3B , avec 3 isoindoles similaires et un différent portant un groupement réactif. La difficulté de synthétiser des Pcs non symétriques réside dans les faibles rendements de synthèse et dans l'isolement des différents produits obtenus [3]. Compte tenu de la difficulté des étapes de purification, différentes méthodes sont utilisées pour préparer des Pcs non symétriques.

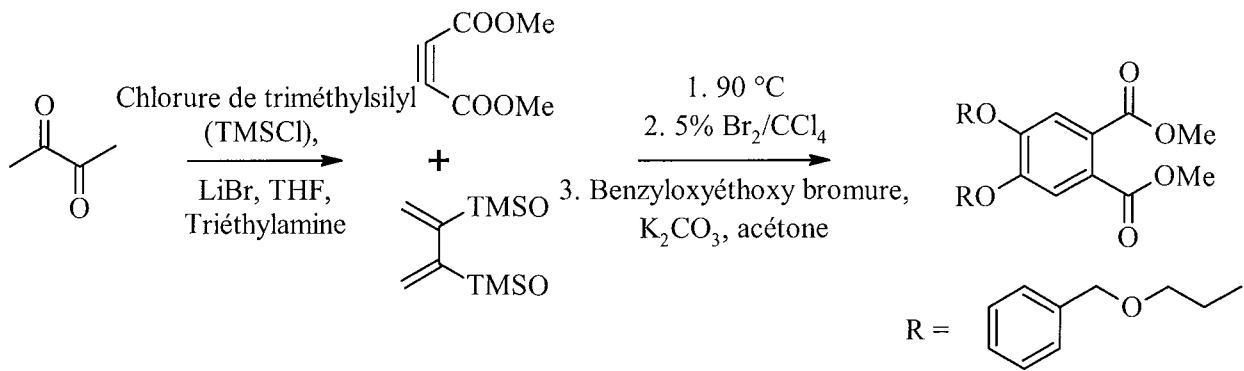
Notons qu'il est difficile d'établir précisément les mécanismes réactionnels en jeu du fait des différentes conditions expérimentales employées (solvant, température...). Il est ainsi difficile de contrôler la formation de composés spécifiques [8].

1221. Condensation statistique (*statistical condensation*)

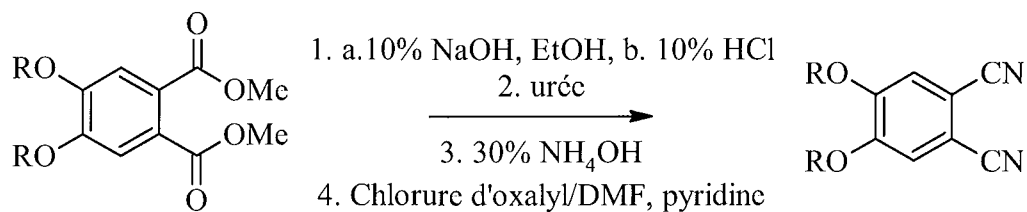
Il s'agit de la méthode la plus utilisée qui voit la réaction statistique de 2 phtalonitriles A et B différents ou de 1,3-diiminoisoindolines avec un ratio de 3:1. Ce rapport 3:1 donne A_4 (33%), A_3B (44%) et 23% de combinaisons différentes. La séparation doit ensuite s'effectuer par chromatographie [7]. La condensation de phtalonitriles avec des substituants volumineux peut conduire à une diminution du rendement des produits désirés. Le ratio A:B peut alors devenir 9:1 si A est très encombré, ou inversement 1:5 si B est plus encombré que A [8].

De nouvelles méthodes de synthèse sont actuellement développées afin d'améliorer les rendements, et de faciliter la séparation des molécules substituées. Parmi ces méthodes, on notera une nouvelle voie de synthèse en 8 étapes avec un rendement global de 45%, qui a l'avantage de ne nécessiter qu'une seule étape chromatographique de purification, laissant envisager une transposition d'échelle. Cette méthode permet aussi de placer une grande variété de substituants différents sur le phtalonitrile sans production de sous-produits, d'où l'obtention de phtalonitriles très purs. Cette méthode se déroule ainsi [11] :

- synthèse du précurseur diestérifié du phtalonitrile avec la substitution désirée pour la Pc par méthode de Diels-Alder à partir de 2,3-butadione, qui aboutit à l'obtention du noyau aromatique substitué par des groupements alkoxy,



- conversion du diester en phtalonitrile,



- cyclisation des phtalonitriles en phtalocyanine.

1222. Approche par subphtalocyanines

Cette méthode consiste en une réaction entre une subphtalocyanine et une 1,3-diiminoisindoline. Les subphtalocyanines (fig.3) sont des macrocycles de 14 électrons π , composées de trois unités isoindoles enfermant un atome central de bore.

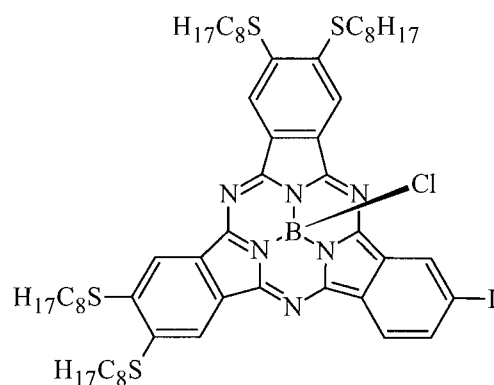


Figure 3 : subphtalocyanine utilisée comme intermédiaire de synthèse de phtalocyanine

Cette technique a les avantages de conduire à de bons rendements, la purification est facile par chromatographie sur colonne ou HPLC, et surtout, elle possède une bonne sélectivité puisqu'un seul composé est obtenu. Ce dernier point semble discuté, et dépend beaucoup des conditions expérimentales [8].

1223. Synthèse sur support solide

Une 1,3-diiminoisoindoline ou un phthalonitrile est tout d'abord couplé à un polymère insoluble, avant de réagir avec un large excès de 1,3-diminoisoindoline. Après élimination des espèces symétriques, le composé A₃B est isolé. Cette méthode mise au point par Leznoff et al. est peu développée mais est prometteuse compte tenu des nouvelles méthodes de synthèse sur phase solide disponibles aujourd'hui [12].

1224. Autres méthodes

D'autres variantes de Pcs non symétriques peuvent être synthétisées par des méthodes sélectives :

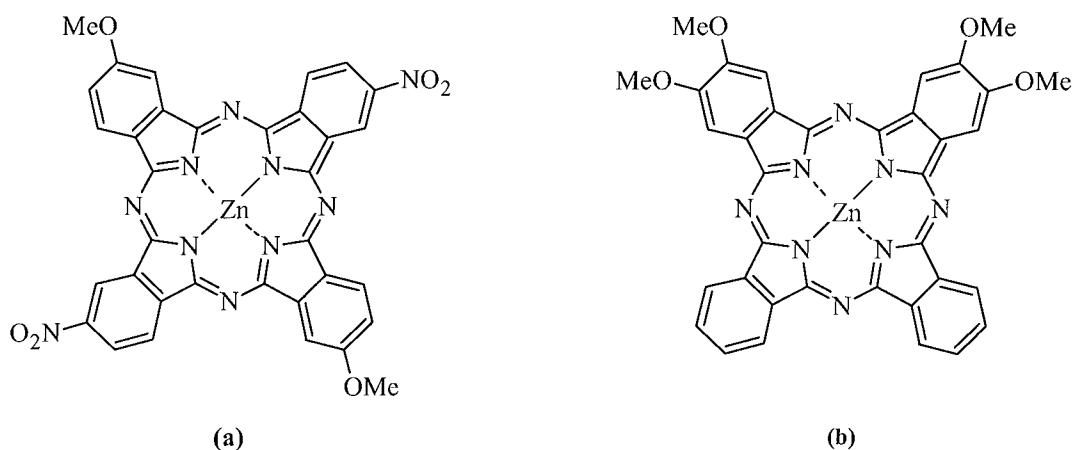


Figure 4 : exemples de phthalocyanine (a) de type ABAB, (b) de type AABB

- structure ABAB (fig.4a) : « *crossed condensation* » [8].

Il s'agit d'une condensation croisée de 1,3-diiminoisoindoline avec de la 1,3,3-trichloroisoindolénine (fig.5). Le composé ABAB est facilement isolable.

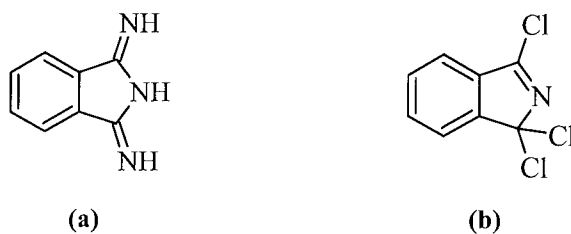


Figure 5 : structure chimique (a) de la 1,3-diiminoisoindoline (b) et de la 1,3,3-trichloroisoindolénine

- structure AABB : « *Half-Pc intermediate method* », développée par Nolan et al. Le composé AABB (fig.4b) est majoritairement obtenu [13].

123. Purification

La synthèse de Pcs non symétriques aboutit à un mélange de différents isomères structuraux. La séparation de ces composés est difficile compte tenu de l'agrégation de ces molécules en solution, de leur faible solubilité dans les solvants organiques ou aqueux, mais elle est possible par des techniques chromatographiques (colonne de silice, HPLC...). Les nouvelles voies de synthèse recherchées tendent à diminuer ces purifications chromatographiques au profit de séparations plus simples à mettre en œuvre [11], voire à limiter les purifications à l'aide de synthèse sélective [7-8].

Cependant, les techniques chromatographiques sont aussi en développement en élaborant de nouvelles phases de séparation. On citera par exemple la séparation des 4 isomères de 1(4),8(11),15(18),22(25)-phtalocyanines tétrasubstituées avec une colonne nitrophényl disponible commercialement, ou le développement d'une technologie permettant de séparer les 4 isomères de 2(3),9(10),16(17),23(24)-phtalocyanines tétrasubstituées à l'aide d'une phase constituée d'une molécule π accepteur reliée à de la silice par un bras espaceur [14].

13. Caractéristiques photophysiques et photochimiques

131. Spectre d'absorption

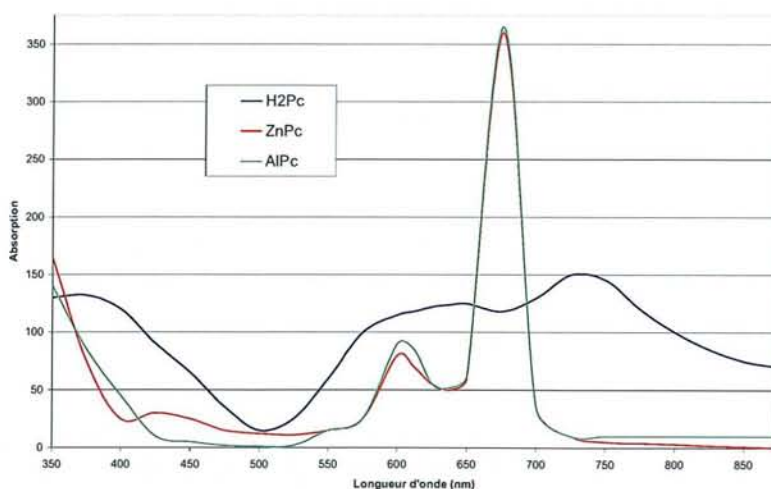


Figure 6 : spectres d'absorption des H₂Pc, ZnPc et AlPc dans le DMSO [22]

Les phtalocyanines monomériques ont un spectre d'absorption caractéristique avec un fort pic d'absorption vers 350 nm (bande de Soret), un pic plus faible vers 600 nm, et un maximum à

proximité du rouge du spectre visible à environ 680 nm (fig.6). Ces dernières bandes sont appelées bandes Q [1]. La localisation de ces bandes Q dépend de la substitution de la Pc [15], et varie entre 600 et 800 nm. C'est dans cette région des bandes Q que la pénétration tissulaire du spectre visible est la meilleure [1]. La pénétration tissulaire de la lumière est de 1 mm à la longueur d'onde de 400 nm, alors qu'elle passe à 10 mm à 630 nm [16]. La lumière bleue ne pénètre pas assez profondément les tissus, la bande d'absorption de Soret est donc inutilisable pour les applications recherchées [17].

Tableau 1 : propriétés photophysiques des Pcs : (a) dans l'alcool polyvinylique/DMSO [15] (b) dans la DMF [18,19,20,21], (c) dans le DMSO [21,22], (d) dans le méthanol [23]

| Molécule | Longueur d'onde d'absorption λ_{\max} (nm) | Coefficient d'extinction molaire ϵ ($10^5 \cdot M^{-1} \cdot cm^{-1}$) | Longueur d'onde maximale de fluorescence λ_{\max} (nm) | Rendement quantique de fluorescence |
|------------------------|--|---|--|-------------------------------------|
| ZnPc (a) | 673 | 0,681 | 678 | 0,11 |
| ZnPc (b) | 675 | 1,85 | | |
| ClAlPc (c) | 672 | 2,5 | 684 | 0,17 |
| AlPcS (d) | 674 | 1,2 | | |
| AlPcS ₄ (b) | 680 | 2,5 | | |
| SiPc (b) | 675 | 2,3 | | |
| H ₂ Pc (d) | 686 | 0,95 | | |

Nous pouvons noter que les Pcs métallées ont 2 bandes Q, alors qu'il n'y en a qu'une pour les Pcs non métallées. Les propriétés photophysiques de différentes Pcs sont rassemblées dans le tableau 1.

132. Spectre d'émission de fluorescence

Les phtalocyanines émettent de la fluorescence à des longueurs supérieures à 650 nm (tab.1) [15]. La fluorescence des Pcs en milieu aqueux est rarement observée du fait de fortes interactions hydrophobes qui conduisent à la formation de molécules agrégées non fluorescentes.

133. Rendement quantique de fluorescence

Le rendement quantique de fluorescence est en général assez faible pour les Pcs (inférieur à 0,28 dans l'éthanol). La perte d'énergie par fluorescence est donc limitée, et le retour à l'état fondamental est préférentiel par le passage *via* l'état triplet excité recherché [24].

134. Influence de l'ion métallique central

La nature de l'ion métallique central influence les propriétés photophysiques des Pcs (rendement quantique de l'état triplet, durée de vie). La complexation avec des ions

paramagnétiques comme Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , VO^{2+} (complexe vanalyl), Cr^{3+} ou Pd^{2+} conduit à des Pcs dont la durée de vie de l'état triplet est courte, proche de la nanoseconde, rendant la Pc inactive [1]. Cependant, la substitution périphérique de ces chromophores aux durées d'état excité plutôt courtes par des radicaux organiques paramagnétiques, du type radical nitroxyde (fig.7), permet d'obtenir des molécules avec une activité phototoxique [20].

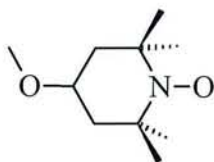


Figure 7 : radical nitroxyde

A l'inverse, des ions métalliques diamagnétiques comme Zn^{2+} , Al^{3+} ou Ga^{3+} produisent des Pcs à haut rendement triplet ($\Phi_T > 0,4$) et à longue durée de vie ($\tau > 200 \mu\text{s}$). Ces triplets ont une énergie de 110-126 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, ce qui est amplement suffisant pour générer de l'oxygène singulet (94 $\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$) avec de bons rendements quantiques de 0,3 à 0,5 [1].

14. Comportement en milieu biologique

141. Agrégation

L'agrégation est un phénomène commun dans ce groupe de composés du fait du système d'électrons π conjugués. En solution aqueuse, les Pcs non substituées ou substituées avec des groupements hydrophiles, ont tendance à s'agréger ou dimériser, modifiant ainsi leur propriété de pénétration cellulaire [25]. Cette agrégation diminue le temps de vie de l'état triplet et le rendement quantique de formation d'oxygène singulet par dissipation de l'énergie par conversion interne. L'agrégation peut être diminuée par insertion des Pcs dans des émulsions lipidiques, des cyclodextrines ou des liposomes [26], mais aussi, par préparation dans des solutions de sérum ou de protéines plasmatiques [1].

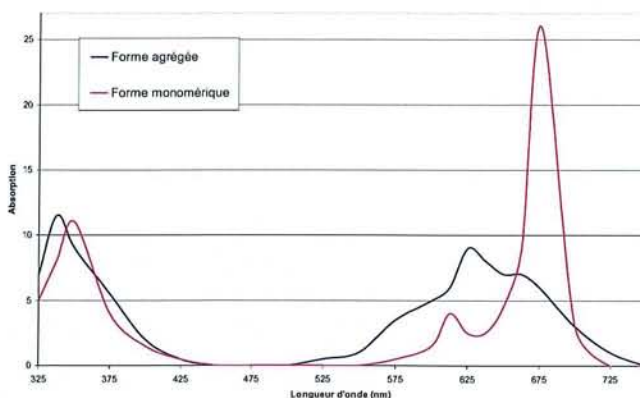


Figure 8 : comparaison des spectres d'absorption d'une ZnPc sous forme agrégée ou monomérique [27]

L'agrégation des Pcs est facilement détectable par spectroscopie UV-visible (fig.8) par une absorption à de plus faibles longueurs d'onde dans la région de Soret, et de la bande Q (diminution de 30-50 nm de la longueur d'onde d'absorption) ; le coefficient d'extinction molaire de cette bande Q diminue également [1].

142. Sélectivité

La rétention préférentielle des Pcs par les tissus tumoraux est basée sur les différences entre les propriétés physiologiques de la tumeur et celles des tissus sains. Il ne s'agit pas d'un phénomène basé essentiellement sur l'action de récepteurs, même si les récepteurs aux *Low-Density Lipoprotein* (LDL) semblent entrer en jeu [19]. Par ailleurs, les cellules saines ont une meilleure capacité à réparer les dommages oxydatifs (phénomène connu en radiothérapie) par rapport aux cellules malades. Enfin, certaines lignées cellulaires, comme les cellules leucémiques par exemple, montrent aussi une affinité accrue pour les photosensibilisants (PS), permettant une capture plus rapide [28].

143. Hydrophilie / Lipophilie

La localisation des Pcs et leur action sur les cibles cellulaires sont influencées par la structure physicochimique de la molécule, et en particulier par son degré d'hydrophobie. Ce paramètre détermine souvent les interactions des Pcs avec les protéines sériques, les membranes cellulaires, ainsi que leur localisation intracellulaire [29]. Néanmoins, on a montré que si l'hydrophobie est un caractère qui conditionne l'efficacité des Pcs, les PS amphiphiles (à la fois hydrophiles et lipophiles) sont généralement plus actifs photodynamiquement que des molécules purement hydrophiles ou hydrophobes. Cette activité plus élevée est due aux interactions entre les groupes hydrophiles/hydrophobes avec les membranes cellulaires ou la surface des protéines [17].

144. Influence de la structure des phtalocyanines

1441. Sur l'agrégation

Les Pcs dont l'atome métallique présente des sites de coordination tels que Al, Si, Ge, Ga, Sn, sont capables d'accepter des ligands axiaux qui empêchent leur agrégation, augmentant ainsi le nombre de monomères et facilitant leur solvabilité [30].

Dans un environnement aqueux, on retrouve essentiellement les Pcs sous forme agrégée. Différentes approches sont utilisées pour éviter cette agrégation. L'une d'entre elles utilise les

forces de répulsion entre les Pcs sous forme ionisées. L'introduction de 8 substituants anioniques ou cationiques (fig.9) en périphérie de la Pc permet d'obtenir la molécule entièrement sous forme monomérique en milieu aqueux. Une agrégation partielle est observée en présence de seulement 4 de ces substituants ioniques, mais une monomérisation complète peut alors être observée en solubilisant le composé dans la diméthylformamide (DMF), le dodécyle sulfate de sodium (SDS), ou le diméthylsulfoxyde (DMSO) [30].

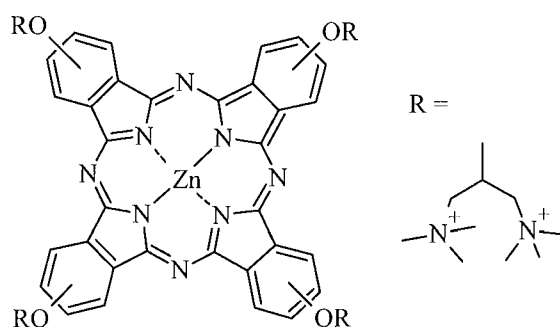


Figure 9 : métallophthalocyanine de zinc octa-cationique [31]

D'une manière générale, l'agrégation est évitée par l'utilisation de substituants stériquement encombrants plutôt que de longues chaînes alkyles. On peut citer l'utilisation de substituants, de type n-octylsulfanyl ou mieux encore de type tertio-butylsulfanyl, qui empêchent l'agrégation des Pcs, même à haute concentration [30].

1442. Sur la balance hydrophile / lipophile

Les Pcs non substituées sont très hydrophobes et insolubles dans l'eau. Il convient donc d'essayer de les rendre plus hydrophiles, afin de permettre une utilisation dans les milieux biologiques, tout en conservant un caractère amphiphile qui donne aux Pcs une activité accrue.

Un grand nombre de groupements est utilisé pour augmenter l'hydrophilie des Pcs comme les carboxylates, les sulfonates, le glucose, les phosphonates, le polyoxyéthylène, les groupements amines ou carboranyl [27]. Il semble cependant que l'introduction de groupes sulfonates est la technique la plus utilisée car la plus facile du point de vue synthèse [32]. Le degré de sulfonation d'une Pc conditionne son degré d'hydrophilie (plus une Pc est sulfonée, plus elle est hydrophile) [32], mais l'augmentation du nombre de groupes sulfonés sur les Pcs métallées diminue l'accumulation intracellulaire. Parmi les phthalocyanines disulfonées

latéralement, les molécules dont les 2 groupes sulfonés sont placés de manière adjacente sur le macrocycle, ont les propriétés amphiphiles appropriées pour leur permettre une pénétration cellulaire efficace. Cependant, ces produits sont difficiles à purifier [33].

L'addition de groupes hydrophobes sur des Pcs trisulfonées améliore le caractère amphiphile et donc leur action photocytotoxique. Ces chaînes ne doivent pas être supérieures à 9 atomes de carbone. La position de ces groupes alkyles influence l'efficacité *in vivo* du PS. Un encombrement stérique trop important diminue aussi l'activité photocytotoxique (par exemple groupe pentoxy) [33]. Plus généralement, l'augmentation de la longueur des chaînes alkyles substituant les Pcs entraîne un renforcement du caractère hydrophobe des Pcs [29].

Quelques métallophthalocyanines de zinc chargées positivement, substituées par des chaînes aliphatiques contenant des ammoniums quaternaires ou d'autres groupes aminés montrent une activité intéressante. La substitution par des groupements carboxyliques de chloro-métallophthalocyanines d'aluminium ou de gallium les rend inactives. Les hydroxy-alkyl-métallophthalocyanines de zinc ne semblent pas présenter une activité significative [32].

APPLICATIONS DES PHTALOCYANINES EN CANCEROLOGIE

21. La thérapie photodynamique : PDT

211. Les grandes lignes de la PDT

L'utilisation de la lumière à des fins thérapeutiques est connue depuis 1900, lorsque Oscar Raab montre la destruction d'organismes vivants à l'aide de la combinaison acridine orange/lumière.

Tout au long de la première moitié du 20^{ème} siècle, plusieurs essais de traitements de tumeur ont été menés à l'aide d'agents photosensibilisants. C'est dans les années soixante que Richard Lipson et Samuel Schwartz aboutissent à des travaux plus concrets. Samuel Schwartz isole dans un premier temps, à partir de tumeur, un mélange d'hématoporphyrines nommé HpD (*Hematoporphyrin derivatives* ou hématoportorphyrine dérivée). Richard Lipson montre que les tissus tumoraux chez les patients à qui l'on a administré de l'HpD, émettent de la fluorescence sous la lumière UV. Il utilise alors l'HpD afin de détecter des tumeurs, et reconnaît leur potentielle utilité comme agent photosensibilisant dans la destruction de tissus tumoraux.

Plus tard, c'est T.J. Dougherty qui reprend l'étude de l'HpD. Après plusieurs années de travail, il arrive à identifier et isoler la fraction active au sein de l'HpD, et développe ainsi le premier médicament mis sur le marché PHOTOFRIN (Laboratoire Axcan Pharma, autorisation de mise sur le marché en 1996 en France).

Actuellement la recherche dans le domaine de la PDT se poursuit afin d'affiner les mécanismes d'action de celle-ci, et découvrir de nouveaux photosensibilisants [17].

La PDT a l'avantage de présenter peu d'effets secondaires, limités à quelques réactions cutanées de photosensibilisation. On rapporte tout de même des douleurs secondaires au traitement qui sont fonction de la taille des zones nécrosées, à traiter par des antalgiques.

2111. Principes photochimiques de la PDT

La PDT implique une combinaison de 3 éléments qui sont la lumière, l'oxygène et un photosensibilisant. Ces 3 composants associés entraînent la formation d'espèces réactives, qui aboutissent à des réactions d'oxydation au sein des cellules et à la mort cellulaire. La PDT permet une très bonne sélectivité des tissus à traiter puisqu'elle nécessite simultanément :

- la présence du PS qui possède une sélectivité intrinsèque pour les tumeurs, éventuellement accrue par adjonction d'un vecteur biologique adéquat,
- une illumination restreinte, sur le même principe que la radiothérapie, aux sites à traiter.

Ainsi la PDT permet de cibler spécifiquement les tumeurs et d'épargner au maximum les tissus sains [1].

Un photosensibilisant est un chromophore qui, illuminé par une lumière de longueur d'onde appropriée, passe de son niveau fondamental (état singulet) à l'état singulet excité. Son retour à l'état initial peut se faire par différentes voies (fig.10) [17] :

- émission de fluorescence,
- perte d'énergie par conversion interne ou transition sans radiation par collision avec d'autres molécules.

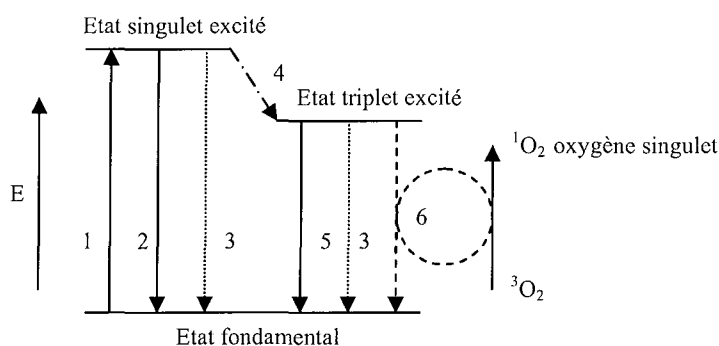


Figure 10 : diagramme de Jablonski modifié

**1 : absorption, 2 : fluorescence, 3 : conversion interne, 4 : conversion intersystème
5 : phosphorescence, 6 : transfert d'énergie non radiatif à l'oxygène (mécanisme de type II)**

Cependant, le photosensibilisant peut passer par un état triplet excité par conversion intersystème. Là encore, le retour à l'état fondamental peut se faire par :

- émission de phosphorescence,

- perte d'énergie par conversion interne ou transition sans radiation par collision avec d'autres molécules,
- transfert de l'énergie à l'oxygène triplet environnant $^3\text{O}_2$ (mécanisme de type II), ou à des radicaux environnants (mécanisme de type I).

Le transfert d'énergie de l'état triplet excité du PS à l'oxygène triplet $^3\text{O}_2$ permet à ce dernier de passer à l'état excité $^1\text{O}_2$ (oxygène singulet). On appelle cette réaction qui voit un transfert d'énergie sur une molécule d'oxygène, un mécanisme de type II. Il en résulte une molécule réactive : l'oxygène singulet, qui est un zwitterion qui réagit rapidement sur différents substrats, et qui entraîne aussi une oxydation cellulaire pour aboutir à la mort cellulaire. Il est reconnu que lors de la PDT, c'est le mécanisme de type II qui prédomine, et que l'oxygène singulet est l'espèce cytotoxique la plus importante, même si plus récemment, il a été montré que les mécanismes de type I ou de type II agissent ensemble [1].

Le photosensibilisant et l'oxygène interagissent au niveau triplet excité car l'oxygène a un unique niveau de base triplet, et des niveaux excités de faible niveau énergétique. Une énergie de 22 kcal.mol^{-1} est nécessaire pour que l'oxygène réalise une transition de l'état triplet à l'état singulet [17].

L'état triplet excité du PS peut par ailleurs réagir selon un autre type de mécanisme, un mécanisme de type I, qui implique l'élimination d'un atome d'hydrogène ou un transfert d'électron permettant la création de radicaux libres. Certaines espèces peuvent facilement réagir avec l'oxygène et entraînent ainsi une oxydation cellulaire ou la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS). Les réactions de type I deviennent plus importantes quand la concentration en oxygène diminue ou dans des milieux polaires, et elles produisent des ROS comme des anions superoxydes ou des radicaux hydroxyles.

Différentes hypothèses conduisent à la formation de l'ion superoxyde $\text{O}_2^{\bullet-}$ (fig.11). Elle peut avoir lieu en présence (4 et 5) ou en absence (2, 3 et 6) de donneur d'électrons comme le glutathion (GSH) ou le nicotinamide-adénine-dinucléotide-phosphate (NADPH). Le processus 1 conduit à la formation de Pc à l'état triplet par irradiation lumineuse. Au cours du processus 3, et en plus faible probabilité, au cours du processus 2, la Pc formée à l'état triplet entre en collision avec une autre molécule à l'état fondamental conduisant à un transfert

d'électron. Le radical obtenu $ZnPc^{\bullet-}$ (3) donne alors son électron à O_2 . $O_2^{\bullet-}$ peut aussi être obtenu par les processus 4 et 5, à l'aide d'un transfert d'électron entre 3ZnPc et NADPH dont les produits ($ZnPc^{\bullet-}$ ou $NADP^{\bullet}$) peuvent alors réduire l' O_2 . Il en est de même avec GSH qui conduit à l'obtention de GS^{\bullet} capable de réduire O_2 . Le transfert d'un électron directement sur O_2 de 3ZnPc est aussi envisageable (6).

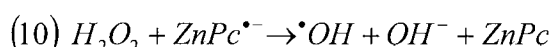
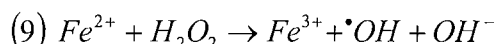
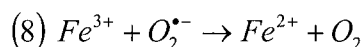
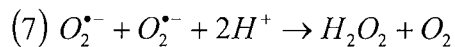
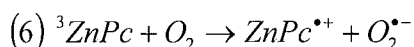
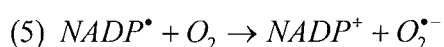
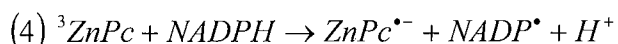
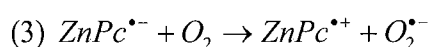
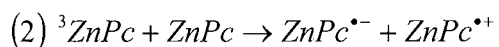
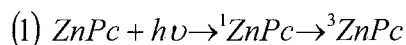


Figure 11 : mécanisme de production de l'ion superoxyde [34]

Figure 12 : mécanisme de production du radical hydroxyle [34]

On peut aussi, en conservant l'exemple de la $ZnPc$, s'intéresser à la formation du radical hydroxyle $\bullet OH$. Les ions superoxydes peuvent entraîner la formation du peroxyde d'hydrogène (7) (fig.12). Ce dernier peut alors être réduit par la réaction de Fenton (8 et 9) ou aussi par le radical $ZnPc^{\bullet-}$ (10).

Le PS peut générer de grandes quantités d'espèces réactives car il retourne à chaque fois à l'état fondamental, pouvant être de nouveau excité. Cependant, il peut être dégradé par la lumière (phénomène de *photobleaching* ou photoblanchiment).

2112. L'oxygène dans la PDT

21121. L'oxygène singulet

L'oxygène singulet, qui est l'agent cytotoxique prédominant en PDT, est une espèce très réactive dont la durée de vie varie de 10 à 100 μs dans les solvants organiques, et est réduite à 2 μs dans les milieux aqueux. Son activité est donc limitée à un volume sphérique relativement confiné, pas plus large que l'épaisseur d'une membrane cellulaire (cible importante en PDT) [17]. Les cellules humaines ont un diamètre d'environ 10 à 100 μm , ainsi des cibles extracellulaires sont touchées initiant la nécrose ou l'apoptose des cellules [1].

La capacité à produire de l'oxygène singulet est une quantité déterminée empiriquement que l'on appelle le rendement quantique de l'oxygène singulet (Φ_v). Il correspond au nombre de molécules d'oxygène singulet formées par nombre de photons absorbés [17].

21122. L'oxygénation tissulaire

L'oxygénation tissulaire est essentielle dans la réussite de la PDT. Des cellules hypoxiques, dont l'oxygène est inférieur à 5%, sont résistantes à la PDT [17].

2113. Les photosensibilisants

On définit 3 types de photosensibilisants :

- les photosensibilisants de 1^{ère} génération : cette catégorie regroupe la première génération de PS historiquement utilisée, composée de l'HpD et du produit PHOTOFRIN,
- les photosensibilisants de 2^{de} génération : il s'agit de l'ensemble des PS que sont les porphyrines, les chlorines, les bactériochlorines ou les phtalocyanines *etc...* sous forme substituée ou non par des groupements ou fonctions chimiques modifiant leurs propriétés chimiques et/ou photophysiques,
- les photosensibilisants de 3^{ème} génération : ce sont tous les PS qui sont conjugués à un vecteur permettant un ciblage actif des cellules tumorales.

Un PS idéal doit répondre à différents critères [1,16] :

- il doit être chimiquement pur, conserver sa structure chimique lors du traitement, avec un phénomène de *photobleaching* minimal,
- il doit être non toxique lorsqu'il n'est pas illuminé et ne pas être à l'origine de phénomènes de mutagénicité ou carcinogénicité,
- le PS doit être retenu par le tissu ciblé et s'y accumuler sélectivement, afin de préserver au maximum l'environnement sain. Il est possible de le vectoriser. De plus, l'excès de PS doit être rapidement et entièrement éliminé de l'organisme afin de prévenir tout effet systémique,
- le PS doit avoir une grande réactivité photochimique avec un grand rendement quantique de production d'état triplet, qui doit, de plus, être assez énergétique pour produire de l'oxygène singulet,

- le PS doit avoir un grand coefficient d'absorption molaire à une longueur d'onde de 600-800 nm qui permet une pénétration de la lumière optimale avec une absorption minimale par l'hémoglobine, la mélanine et l'eau,
- le PS doit pouvoir être administré sans douleur à l'aide de la forme galénique adéquat (topique, intraveineuse, inhalation...).

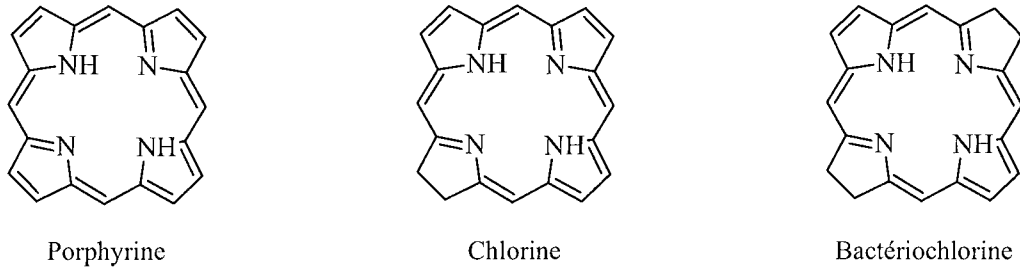


Figure 13 : structure chimique de base des porphyrine, chlorine et bactérochlorine

Les photosensibilisants les plus utilisés en PDT *in vivo* sont les porphyrines, les chlorines ou les bactérochlorines. Ces trois composés ont un maximum d'absorption dans le rouge et sont de bons générateurs d'oxygène singulet ($\Phi_v = 0,55$ pour la tétraphényl porphyrine dans le chloroforme). Les porphyrines présentent en général un maximum d'absorption vers 630 nm, alors que les chlorines ou les bactérochlorines (fig.13) ont respectivement un maximum d'absorption vers 650 nm et 710 nm.

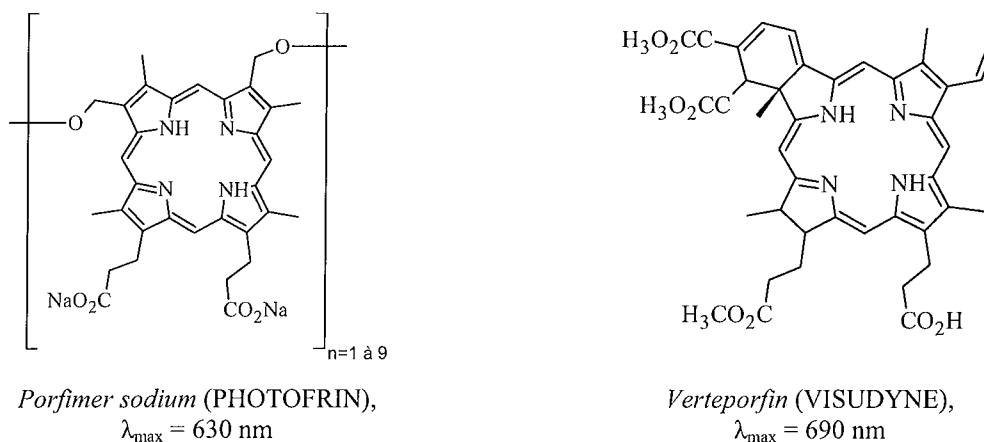


Figure 14 : photosensibilisants utilisés en thérapie photodynamique (λ_{\max} = longueur d'onde maximale d'absorption)

PHOTOFRIN (fig.14) a été le premier photosensibilisant mis sur le marché utilisé en PDT et est actuellement indiqué pour le traitement des récurrences des cancers bronchiques à petites cellules et des cancers de l'œsophage. Il est composé d'un mélange d'hématoporphyrines

(HpD). PHOTOFRIN présente une bonne efficacité sur un large nombre de tumeurs, et ne présente pas les effets secondaires des chimiothérapies standards. Il s'accumule cependant dans la peau, entraînant des complications en cas d'exposition solaire jusqu'à 6 semaines après le traitement, qui se traduisent par de sévères réactions cutanées, voire des brûlures.

Parmi les benzoporphyrines (fig.14), on note le développement de la *verteporfin* (VISUDYNE) recommandée par l'administration américaine *Food and Drug Administration* (FDA) et autorisée en Europe pour le traitement des néovascularisations de la rétine, et en essais cliniques de phase III en Amérique du Nord pour le traitement du cancer de la peau [annexe1-1].

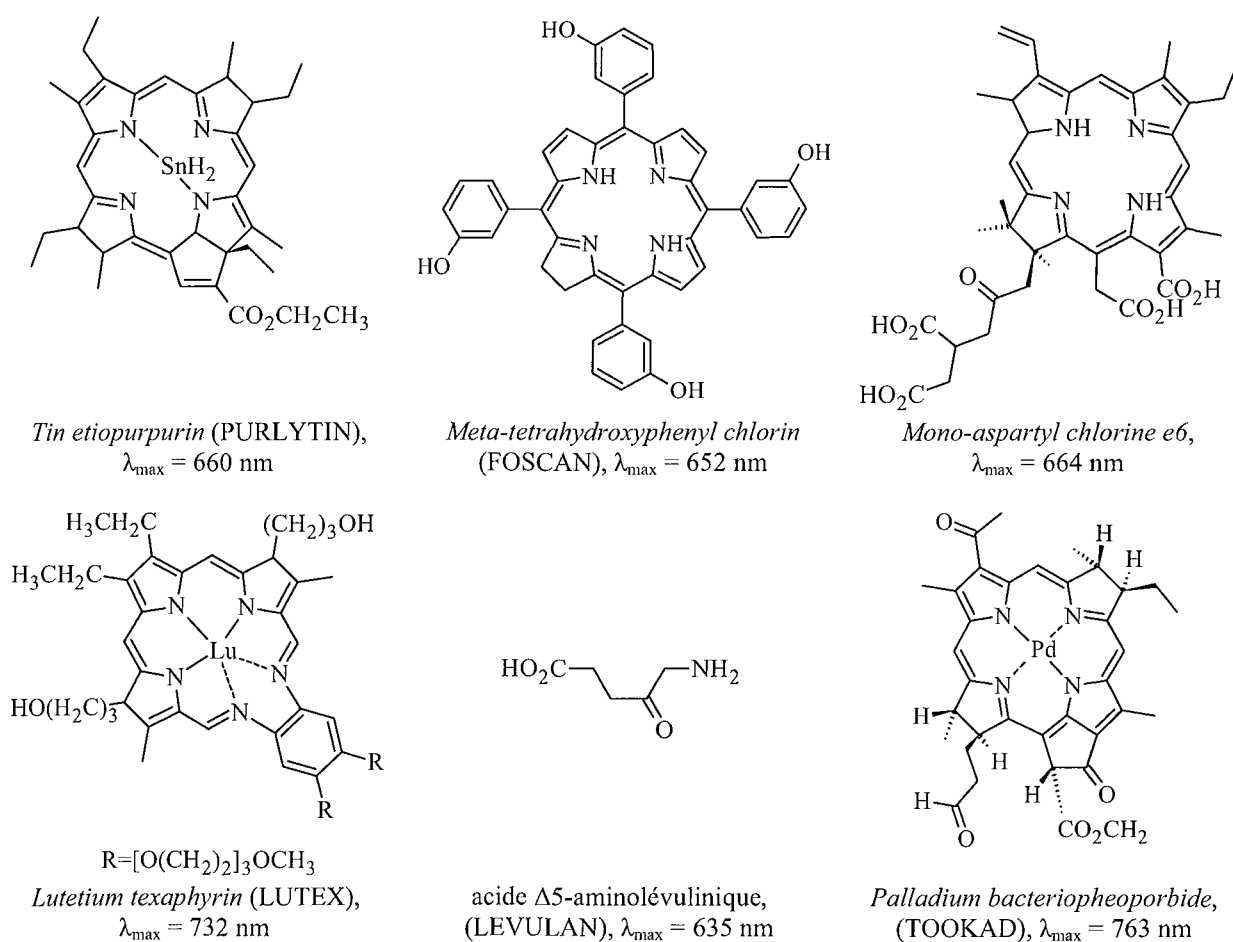


Figure 15 : photosensibilisants utilisés en thérapie photodynamique
(λ_{\max} = longueur d'onde maximale d'absorption)

Le PURLYTIN (*tin etiopurpurin*) est une chlorine utilisée dans le traitement de métastases du cancer du sein (fig.15). Une autre chlorine très active est la méta-tétrahydroxyphényl chlorine (FOSCAN, laboratoire Biolitec Pharma, autorisation de mise sur le marché en 2001 pour le

traitement palliatif des cancers de la tête et du cou qui ont échappé aux thérapies standards et qui ne peuvent pas être traités par radiothérapie, chirurgie ou chimiothérapie) (fig.15). Cette chlorine a l'avantage de pouvoir s'utiliser en faible quantité et à de faibles doses de lumière. Parmi les chlorines, on cite aussi la chlorine e6 (*mono-aspartyl chlorin e6*) (fig.15) proposée pour le traitement de cancers cutanés ou sous-cutanés, et en ophtalmologie.

La *lutetium texaphyrin* (LUTEX ou ANTRIN) a atteint des essais de phase II dans le traitement de mélanomes ou de prévention des resténoses en cardiologie, du fait de sa forte sélectivité pour les tissus tumoraux, et d'un maximum d'absorption à 732 nm (fig.15).

L'acide $\Delta 5$ -aminolévulinique (5 ALA) est une prodrogue (fig.15), qui forme un précurseur de l'hème (la protoporphyrine-IX). La saturation des cellules en 5 ALA les force à produire de la protoporphyrine-IX (qui est le PS lors de la PDT), plus rapidement que sa transformation enzymatique en hème totalement inactive en PDT. Son utilisation est limitée à des tumeurs superficielles [17].

Les bactériochlorophylles sont une autre famille de molécules utilisées en PDT. La plus active d'entre elles est la *palladium bacteriopheoporbide* (TOOKAD) (fig.15), qui a atteint les essais cliniques de phase II pour le traitement du cancer de la prostate [35,annexe1-1].

2114. La lumière

La destruction sélective de la tumeur se fait à l'aide d'un PS ciblant la tumeur. Cependant, les tissus sains peuvent accumuler ce PS. Ainsi les zones illuminées sont, elles aussi, délimitées afin de préserver au maximum les tissus sains [17].

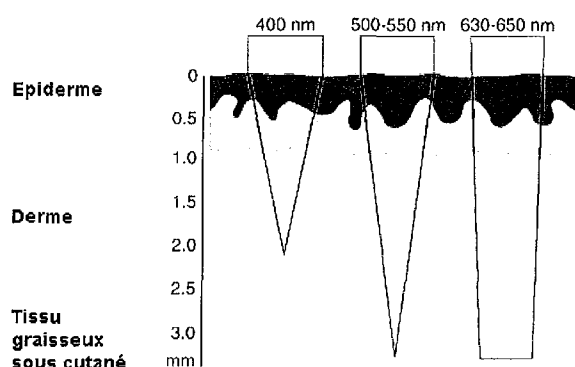


Figure 16 : pénétration tissulaire de la lumière à différentes longueurs d'onde

On remarque que la pénétration tissulaire de la lumière est fonction de la longueur d'onde utilisée. Elle est d'autant plus profonde et plus intense que la lumière est proche de l'infrarouge (fig.16). Quand les photons entrent dans un tissu, une partie est réfléchi par la surface, et le reste pénètre dans les tissus et est perdu ou absorbé par le chromophore (chromophore endogène ou exogène comme un PS) [17].

Le laser ou les diodes laser sont la source optimale pour une photoirradiation, car leur lumière est très intense, monochromatique et bien transmise par fibre optique [36].

2115. Action cellulaire

Malgré plus de 20 ans de recherche, les mécanismes de la PDT ne sont pas complètement expliqués. La PDT produit la mort cellulaire par nécrose ou apoptose. La nécrose est un phénomène non contrôlé et aléatoire, alors que l'apoptose est un processus ciblé et régulé par des étapes spécifiques (métabolique et génique), nécessitant une participation active de la cellule (déformation du noyau, condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN...). L'apoptose en PDT n'est pas universelle dans les cellules, et n'est pas observée sur toutes les lignées cellulaires [37].



Figure 17 : action cellulaire des PS en PDT

En plus de la mort cellulaire directe, la PDT induit une action indirecte (fig.17). Les lésions phototoxiques de l'endothélium des vaisseaux de la tumeur déclenchent une série de réactions menant rapidement à un collapsus microvasculaire. Même si un apport d'oxygène à la tumeur est nécessaire au cours de la PDT, la destruction éventuelle de la microvascularisation de la tumeur est aussi importante pour la priver d'oxygène et de nutriments [17].

Les lésions induites à la fois sur les membranes cellulaires et sur les vaisseaux déclenchent la libération de médiateurs de l'inflammation au niveau du site de traitement, ainsi que

l'activation de macrophages impliqués dans la phagocytose des cellules tumorales. Les macrophages et les lymphocytes qui ont infiltré la tumeur contribuent à l'accumulation des PS dans la tumeur [17].

2116. Choix du véhicule

La pénétration cellulaire d'un PS est fortement influencée par sa nature chimique et par l'utilisation de véhicules. Le choix du véhicule est important puisqu'il peut moduler la localisation du PS et optimiser son action [38]. On note que le Cremophor est un véhicule très utilisé pour l'administration *in vivo* des Pcs hydrophobes ; pourtant, il est à l'origine de chocs anaphylactiques et il n'y a pas de données sur la stabilité de ces micelles *in vivo*. L'utilisation de nanoparticules [1] ou de micelles polymériques sensibles au pH [21] a été relevée pour le véhicule des Pcs. D'autres solubilisants comme le Tween 20 ou 80, des liposomes de vésicules unilamellaires de DL- α -dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC) [39], ou de petits liposomes composés de 1-palmitoyl, 2-oléoylphosphatidylcholine (POPC) et de 1,2 dioléylphosphatidylsérine (DOPS) [40], peuvent aussi être utilisés.

212. Les phtalocyanines utilisées comme photosensibilisants de 2^{de} génération

Nous allons voir au cours de cette partie les phtalocyanines les plus étudiées dans le cadre de la recherche sur la PDT. Historiquement et d'une manière très générale, on peut observer que les premières études se sont portées sur des molécules à caractère hydrophile, et plus particulièrement sur les métallophtalocyanines d'aluminium sulfonées. Par la suite, l'intérêt pour les Pcs s'est tourné vers les molécules complexées par le zinc, non sulfonées, au caractère bien plus hydrophobe. Les métallophtalocyanines de silicium apparaissent un peu plus tard dans la littérature. A ce jour, ces Pcs restent toutes étudiées notamment quand celles-ci possèdent un caractère amphiphile marqué.

2121. Les phtalocyanines non métalliques

Quelques recherches sur les Pcs non métalliques ont montré leur inactivité comme sensibilisants photohémolytiques des cellules du sang, une faible activité *in vitro* sur la cytotoxicité cellulaire des glioblastomes humains et d'autres lignées cellulaires (EMT-6, cellules de cancer mammaire de souris), suggérant la nécessité d'un atome central pour obtenir des Pcs efficaces [32]. Il semblerait donc que l'efficacité de la PDT est bien meilleure avec des métallophtalocyanines que des Pcs non métallées [25].

2122. Les métallophthalocyanines d'aluminium

Les métallophthalocyanines d'aluminium (AlPcs) sont stables et relativement simples à synthétiser en grande quantité avec un bon rendement. De plus, elles n'existent que sous un seul isomère. Beaucoup d'études ont été réalisées sur les AlPcs sulfonées mais peu sur les AlPcs non substituées. Les AlPcs non substituées, les AlPcs mono- et bisulfonées ont l'avantage de peu absorber dans le spectre solaire, si ce n'est entre 600 et 700 nm. Il y a donc peu de risque de photoréaction cutanée [41].

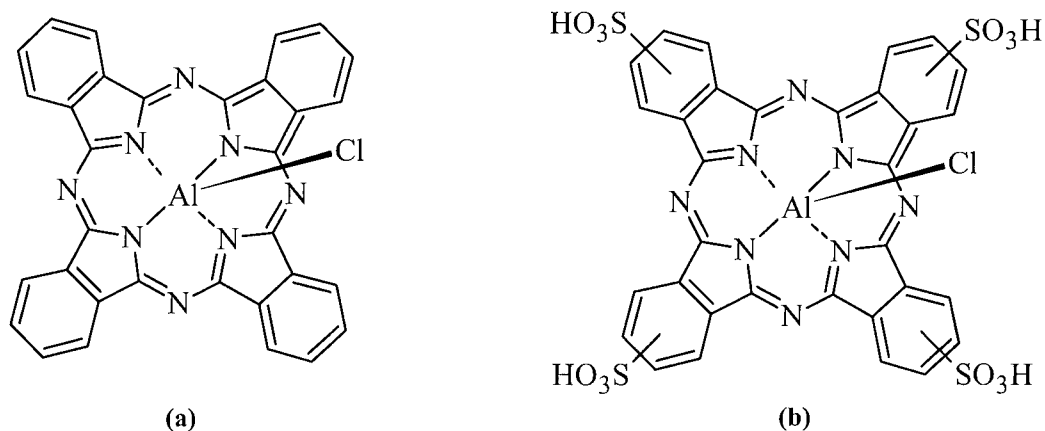


Figure 18 : métallophthalocyanines d'aluminium,
(a) chloro-métallophthalocyanine d'aluminium (CIAIPc),
(b) métallophthalocyanine d'aluminium sulfonée (AlPcs₄)

Ces molécules ont tendance à s'agréger en solution aqueuse, mais ce phénomène n'est pas observé en milieu organique.

21221. La métallophthalocyanine d'aluminium non substituée

La forme principale des AlPcs non substituées est la chloro-métallophthalocyanine d'aluminium (CIAIPc) qui a l'avantage d'être un bon agent pour les études *in vitro*, disponible commercialement, peu chère, présente sous une seule espèce moléculaire, et hautement cytotoxique (fig.18a). CIAIPc est plus efficace que les dérivés sulfonés *in vitro* et *in vivo*, mais elle est hydrophobe, ce qui explique sa faible utilisation en recherche clinique [21]. Nous allons successivement envisager l'application de cette Pc dans le traitement éventuel de tumeurs solides et des leucémies myéloïdes aigues.

❖ Applications envisageables dans le traitement de tumeurs solides

Parmi les faibles essais réalisés avec CIAIPc, on peut noter une étude qui porte sur le modèle de tumeur EMT-6 implantée chez des souris Balb/c. Du fait de son caractère hydrophobe, il est nécessaire d'administrer CIAIPc à l'aide d'un véhicule, qui est dans ce cas le Cremophor. La CIAIPc agit par anoxie de la tumeur selon un mécanisme indirect, en privant la tumeur d'oxygène et de nutriments par dommages sur sa vascularisation. Les premiers effets sur la vascularisation sont observés dans les 3 heures qui suivent le traitement. Les résultats montrent une destruction massive de la tumeur traitée, et l'absence de récurrence pour une dose de 0,25 $\mu\text{mol/Kg}$. La même Pc mono- ou bi-sulfonée (AIPcS₁ et AIPcS₂) ne donne pas de réponse à la dose de 0,25 $\mu\text{mol/Kg}$. Un effet significatif sur la tumeur n'apparaît qu'à partir de 2 $\mu\text{mol/Kg}$ et 1 $\mu\text{mol/Kg}$, respectivement. On observe un oedème bien plus important avec ces Pcs sulfonées. L'AIPcS₁, qui est la plus efficace des AIPcs *in vitro* sur ce modèle, est complètement inactive *in vivo*. Son activité augmente légèrement si elle est solubilisée dans le Cremophor (augmentation de la localisation cellulaire, donc de l'action directe). L'action *in vivo* de la CIAIPc solubilisée dans le Cremophor est bien plus efficace que AIPcS₂ qui apparaît pourtant comme la plus intéressante des AIPcs sulfonées [41].

Comme nous l'avons vu précédemment, les micelles polymériques sensibles au pH, compte tenu de leur faible toxicité et de leur bonne affinité pour CIAIPc, représentent une alternative intéressante pour l'administration de cette Pc. Une étude comparative a été menée sur des cellules EMT-6 implantées dans des souris Balb/c pour juger de l'efficacité de la solubilisation de CIAIPc dans le Cremophor ou dans ces micelles polymériques. Après irradiation lumineuse, la formulation de CIAIPc en micelles polymériques présente une meilleure photoactivité que celle dans le Cremophor. On observe une régression complète de la tumeur dans 85% des cas avec une dose de 0,25 $\mu\text{mol/Kg}$. De plus, la demi-vie d'élimination est plus courte que lors de l'utilisation de Cremophor ($T_{1/2} = 23$ min). Une accumulation préférentielle par le foie et la rate, traduit une capture par les mononucléaires. En effet, ces micelles ont tendance à former *in vivo*, compte tenu d'un caractère encore assez hydrophobe, des agrégats qui sont alors phagocytés par les mononucléaires. Le renforcement du caractère hydrophile de ces micelles a été étudié pour essayer de diminuer cette consommation par les mononucléaires, et améliorer la localisation tumorale du PS [21]. Finalement, l'augmentation de la concentration en CIAIPc dans la tumeur n'est pas observée, mais, par rapport à une solubilisation dans le Cremophor, l'efficacité globale reste quand même supérieure [42].

CIAIPc est aussi évoquée pour une application *in vitro* dans le traitement du méningiome, tumeur bénigne du système nerveux central. CIAIPc solubilisée dans le DMSO entraîne la mort cellulaire *in vitro* à partir de 10 nM sur ces cellules. Elle est capturée de préférence par les cellules de méningiome, et diffuse dans le cytoplasme, à la différence des dérivés sulfonés que l'on retrouve dans des lysosomes. Il semblerait que les propriétés photophysiques de cette molécule ne soient pas affectées par la localisation cellulaire [36]. On peut toutefois remarquer qu'il n'existe guère plus d'informations sur cette application éventuelle.

Nous pouvons compléter ces observations par quelques données pharmacocinétiques disponibles. Suite à une injection intraveineuse, CIAIPc n'est plus détectable dans la circulation sanguine au bout de 1 heure. Une excrétion immédiate est observable dans l'urine et une excrétion par les fèces est notée plus tard. Le foie est l'organe dans lequel on retrouve une accumulation majeure du PS. La concentration tissulaire est maximale à 24-48 heures après l'injection. CIAIPc est retrouvée principalement dans les cellules de type macrophage et les cellules endothéliales. Une faible quantité est retrouvée dans la peau [32].

❖ **Application dans les leucémies myéloïdes aiguës pour la purge de greffons**

Les différents traitements de la leucémie myéloïde aiguë sont des greffes de cellules souches ou l'utilisation de biothérapie avec des anticorps monoclonaux. Les greffes de moelle ne sont pas toujours possibles (faible donneur, problème d'histocompatibilité, âge...), et l'alternative par greffe autologue n'est pas toujours efficace. Les techniques qui utilisent des anticorps monoclonaux manquent de spécificité, compte tenu de l'hétérogénéité des phénotypes et de leur similitude avec les cellules souches. La PDT se présente donc comme une alternative thérapeutique envisageable, et CIAIPc semble être un bon agent pour « nettoyer » ces cellules.

Des tests *in vitro* ont été menés sur un mélange de cellules « leucémiques » et de cellules saines. Ces tests montrent une nette préférence *in vitro* de CIAIPc pour les cellules leucémiques. Son action n'entraîne qu'un faible épuisement des progéniteurs des granulocytes neutrophiles et des monocytes (CFU-GM, *colony forming unit – granulocyte macrophage*) et des progéniteurs des hématies (BFU-E, *burst forming unit – erythroid*). Il semblerait que ces progéniteurs ont la capacité de réparer les dommages oxydatifs causés par la PDT plus rapidement que les cellules leucémiques, et que l'accumulation de la Pc au sein des cellules est plus rapide pour les cellules leucémiques que pour les cellules saines [28].

21222. Les métallophthalocyanines d'aluminium sulfonées

Les métallophthalocyanines d'aluminium sulfonées (AlPcS_n) (fig.18b) sont des métallophthalocyanines d'aluminium substituées par un ou plusieurs groupes SO₃H. L'action photodynamique *in vivo* de AlPcS_n augmente avec le degré de sulfonation, alors que c'est l'inverse *in vitro* [36]. Il ressort, des différentes études menées sur les AlPcS_n, très peu de données sur les AlPcS₁ et AlPcS₃. Nous présentons donc dans cette partie les données disponibles principalement sur les AlPcS₂ (sans précision particulière sur la position des groupements SO₃H substituants la Pc) et AlPcS₄.

❖ Pénétration et localisation cellulaire

Les AlPcs sulfonées sont principalement retrouvées dans les cellules. On retrouve AlPcS₂ dans différents sites intracellulaires [43] :

- membranes lysosomiales,
- appareil de Golgi,
- lipides intracellulaires associés à l'appareil de Golgi.

L'AlPcS₄ s'accumule dans des granules extranucléaires. On observe cependant une relocalisation du PS au début de la PDT qui laisse entrevoir un relargage à partir des endosomes ou des lysosomes. La rupture de ces vésicules est néanmoins discutée [38]. La charge négative globale de AlPcS₄ l'empêche d'interagir avec les membranes cellulaires [19]. Son administration nécessite donc l'utilisation de liposomes. Son caractère hydrophile permet une encapsulation stable dans la partie aqueuse des liposomes. Il n'est pas observé de pénétration nucléaire pour AlPcS₂, mais une petite fraction des AlPcS₄ serait capable d'atteindre le noyau cellulaire [44].

❖ Mécanisme d'action

Pour AlPcS₁, un mécanisme direct semble intervenir mais l'action prédominante est de type indirect [41].

On observe *in vitro* que plus de 70% des cellules tumorales meurent dans la première heure de traitement avec AlPcS₂, ce qui implique un mécanisme d'action direct. Cependant, un mécanisme indirect contribue à la mort cellulaire car ce phénomène se poursuit avec le temps. AlPcS₂ est localisée après 24 heures dans les cellules néoplasiques et l'interstitium de la tumeur, mais pas dans le stroma vasculaire [41]. Le mécanisme précis demeure inconnu, mais

des études ont montré le rôle de la Pc sur les concentrations intracellulaires en Ca^{2+} et H^+ . Des modifications de cet équilibre ionique participeraient à la mort cellulaire [43].

Les AlPcS_4 , accumulées en grande quantité dans les lysosomes, participent à l'inactivation d'enzymes et contribuent ainsi à l'action de ces molécules. Des phénomènes plus complexes restent non expliqués [38].

❖ Efficacité des AlPcs sulfonées

Peu d'essais *in vivo* en PDT sont réalisés avec les AlPcs les moins sulfonées. AlPcS_2 a néanmoins un intérêt dans le cadre d'essais *in vivo* en internalisation photochimique (PCI) que nous verrons plus loin.

• sur des tumeurs solides

AlPcS_4 a été testée sur le modèle de gliome C6 implanté en orthotopique chez des rats Wistar. Il n'y a pas d'effet sur la tumeur ou le cerveau sain pour des doses inférieures à 0,5 mg/Kg. Une nécrose sélective de la tumeur est évidente 6 heures après la photosensibilisation à une dose de AlPcS_4 supérieure à 1 mg/Kg et des doses lumineuses supérieures à 200 J/cm² ($\lambda = 675$ nm). La nécrose s'observe dans les tissus sains pour des doses bien supérieures de PS et une irradiation lumineuse plus intense [45]. On retrouve AlPcS_4 dans les tissus tumoraux (gliome C6) par rapport aux tissus sains dans un rapport de 22:1, 6 heures après l'injection, et ce rapport est encore de 15:1, 96 heures après l'injection. AlPcS_4 est aussi localisée dans le foie où elle est séquestrée pendant 2 à 4 heures, la rate et les reins [46].

• sur les cellules leucémiques

Des essais d'inactivation des cellules leucémiques dans les greffes de moelle osseuse autologues ont été réalisés avec AlPcS_4 [28]. Une bonne sélectivité des cellules cancéreuses a été observée mais un tiers des cellules leucémiques reste quand même réfractaire à ce traitement.

❖ Adressage par ciblage des récepteurs à la transferrine

Des résultats *in vitro* montrent une accumulation cellulaire de AlPcS_4 supérieure de 100 fois environ en utilisant des liposomes ciblant les récepteurs à la transferrine, par rapport à de simples liposomes. Leur intérêt est retenu pour les cellules présentant une surexpression des récepteurs à la transferrine, comme par exemple les cellules superficielles de vessie [47].

❖ Application clinique avec un mélange de AlPcS_n (PHOTOSENSE)

Le centre oncologique de l'Académie Russe des Sciences Médicales et de l'Académie Médicale de Moscou a traité 42 patients de 1992 à 1995 à l'aide d'un mélange de AlPcS_n (en moyenne $n = 3$, $\lambda_{\max} = 677 \text{ nm}$ et $\varepsilon_{677} = 1,4 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ dans l'eau [48]) nommé PHOTOSENSE. Au total, ce sont 93 types de tumeurs différentes qui ont été traités avec PHOTOSENSE, des cancers tels que des cancers cutanés des cellules basocellulaires ou épidermoïdes, cancers du sein, de la langue, des poumons et du larynx ont été traités par une dose de PS de 0,5 à 1 mg/Kg (masse corporelle) avec succès. 50% des patients traités ont vu une régression totale de leur tumeur sans recrudescence, alors que l'on obtenait une réponse partielle avec 43% des patients, et aucune réponse au traitement pour 7% des patients. Les essais sur le mélanome sont les seuls à n'avoir donné aucune réponse complète. Ce mélange de Pcs ne présente aucune toxicité systémique [1].

Par ailleurs, des études plus récentes proposent l'utilisation de PHOTOSENSE associé à des réducteurs comme l'acide ascorbique. Cette association augmenterait la formation de radicaux de type-I, améliorant globalement l'effet de la PDT. Un premier mécanisme a été proposé montrant la formation d'ions superoxydes en présence d'oxygène après réduction de PHOTOSENSE par de l'acide ascorbique sous forme anionique (AH^-), qui cède un électron à la Pc (fig.19).

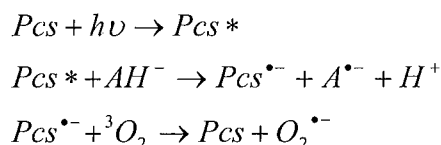


Figure 19 : formation d'ion superoxyde en présence de PHOTOSENSE, d'oxygène et d'acide ascorbique

Testée sur les souris, l'association PHOTOSENSE avec un large excès d'ascorbate de sodium conduit à des résultats positifs. L'acide ascorbique tend à s'accumuler préférentiellement dans les tumeurs. Des études plus approfondies montrent que dans un environnement riche en oxygène, la formation d'oxygène singulet (réaction de type II) domine sur les réactions de type I, ne justifiant pas l'action de l'ascorbate. Cependant, les lésions vasculaires consécutives de la PDT privent la tumeur en oxygène, et empêchent donc les mécanismes de type II. On observe alors des mécanismes de type I qui dominent, et le transfert d'électrons entre l'ascorbate sous forme anionique et PHOTOSENSE est alors envisageable. Ces réactions dépendent aussi du pH [48].

Nous avons vu que les PS amphiphiles possèdent une activité photodynamique supérieure aux molécules purement hydrophiles ou hydrophobes. Ainsi, une étude a été réalisée avec le PS PHOTOSENSE couplé à un substituant naturel et hydrophobe, la biotine, afin d'obtenir une molécule amphiphile. La biotine, appelée aussi vitamine H ou B8, est constituée d'un noyau imidazoline et d'un cycle tétrahydrothiophène porteur d'une chaîne latérale à cinq atomes de carbone. Elle est apportée par l'alimentation et est naturellement présente dans l'organisme. Cette molécule de PHOTOSENSE substituée par deux groupements de biotine (fig.20) a été testée *in vitro* sur des cellules de cancer de poumon humain OAT-75, et *in vivo* sur des souris porteuses d'un adénocarcinome d'Ehrlich. Il ressort de cette étude que cette Pc possède une dose efficace inférieure de 1,6 à 2,8 fois à celle de PHOTOSENSE, permettant son utilisation à la dose de 0,25 mg/Kg. Par rapport à PHOTOSENSE, la Pc portant deux molécules de biotine entraîne une mort cellulaire, des dommages vasculaires et une inhibition de la prolifération tumorale plus importants. Ces différences s'expliquent par une pénétration cellulaire supérieure à celle de PHOTOSENSE permettant une accumulation cellulaire en plus grande concentration. Cette molécule pourrait aussi s'accumuler par sa partie lipophile (la biotine) au niveau des membranes cellulaires, entraînant leur destruction [49].

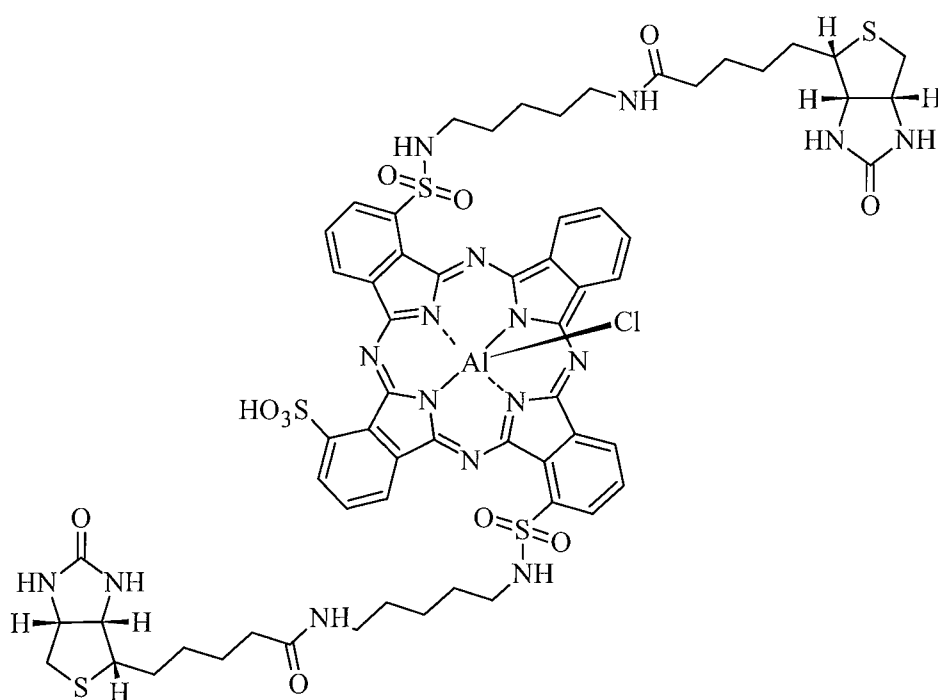


Figure 20 : métallophthalocyanine d'aluminium trisulfonée substituée par deux groupements de biotine

2123. Les métallophthalocyanines de zinc

21231. Structure

Les métallophthalocyanines de zinc (ZnPcs) incorporent au centre du macrocycle un ion zinc (Zn^{2+}) et peuvent être substituées ou non (fig.21). Le zinc ne permet pas l'insertion de ligands axiaux. Les ZnPcs sont hydrophobes.

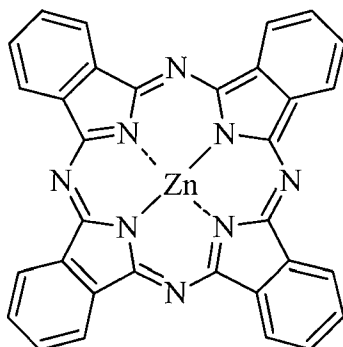


Figure 21 : schéma d'une métallophthalocyanine de zinc non substituée

21232. Administration

Compte tenu de leur lipophilie, il est nécessaire d'administrer les ZnPcs à l'aide de liposomes, qui favorisent leur insertion dans les lipoprotéines. Les ZnPcs s'associent à la partie lipidique des lipoprotéines [50]. Ces liposomes peuvent aussi être liés à des lipoprotéines (LDL ou HDL) [40].

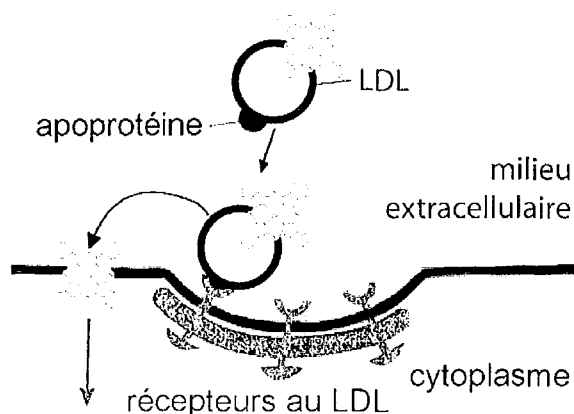


Figure 22 : mécanisme proposé pour la pénétration cellulaire de la ZnPc [51]

21233. Pénétration et localisation cellulaire

Les ZnPcs pénètrent dans les cellules par un mécanisme de diffusion facilitée, dépendant de la température, et nécessitant une énergie d'activation de 30 KJ/mol (un mécanisme actif

nécessite environ 100 KJ/mol). L'endocytose n'est pas impliquée dans la pénétration des ZnPcs. Cette pénétration cellulaire peut se faire, pour les Pcs complexées aux lipoprotéines, par les récepteurs aux LDL. La ZnPc quitte alors les LDL pour passer la membrane plasmique (fig.22) [51].

Les principales cibles des ZnPcs sont les structures membranaires. On les retrouve dans les membranes des lysosomes ou des mitochondries [38], ainsi que dans les mitochondries et l'appareil de Golgi [51].

21234. Mécanisme d'action

Les ZnPcs induisent principalement des dommages directs sur les systèmes membranaires des cellules malignes [29]. Par ailleurs, les ZnPcs entraînent des dommages vasculaires indirects par action sur l'endothélium, ainsi que le relargage d'enzymes à partir des lysosomes par rupture des membranes des cellules photosensibilisées : hydrolases acides, cathepsine, β -N-acétyl-D-glucosaminidase... qui participent aussi à la mort cellulaire [38].

Différents organites sont impliqués dans les étapes initiales du processus photochimique. Quelques signes caractéristiques de l'apoptose apparaissent dans certaines cellules, mais la mort par apoptose reste négligeable par rapport au phénomène direct de nécrose. Au bout de 24 heures après un traitement photodynamique par ZnPcs délivrées dans des liposomes de DPPC ou solubilisées dans le Cremophor, on observe une désorganisation totale des tissus tumoraux, les bordures cellulaires ne sont plus définies et les membranes cytoplasmiques se rompent [29].

Comme tout PS utilisé en PDT, les ZnPcs agissent par formation d'oxygène singulet ($\Phi_v = 0,4$ dans un tampon salin phosphate), mais les ZnPcs photo-réagissent aussi par transfert d'électrons (mécanismes de type I) [34].

21235. Propriétés pharmacocinétiques

Une concentration maximale en ZnPcs dans les tumeurs est observée au bout de 24 heures après administration intraveineuse. Les ZnPcs sont accumulées en grande quantité dans le foie comme la plupart des PS hydrophobes [29]. Elles sont éliminées par la bile. L'élimination totale des ZnPcs se fait après environ une semaine [2]. Les ZnPcs agrégées sont éliminées plus lentement de l'organisme que les formes monomériques [40].

Les effets secondaires observés sur le lapin à haute dose sont une photosensibilisation et une dépression respiratoire [2].

L'administration par liposome de DPPC ou en solution dans le Cremophor n'a pas d'influence sur la biodisponibilité des ZnPcs. En revanche, on note des variations de la clairance sérique, entraînant une persistance éventuelle de la photosensibilisation cutanée [29].

L'environnement biologique a une influence sur l'agrégation des ZnPcs. Une étude *in vitro* menée sur les cellules d'hépatome de souris MH134 montre que les ZnPcs étudiées sont préférentiellement sous forme monomérique dans les cellules tumorales, et sous forme agrégée dans la peau, atténuant ainsi les effets indésirables de type photosensibilisation. Les cellules tumorales, compte tenu de leur activité métabolique accrue, contiennent beaucoup plus de LDL que les cellules saines. Ces cellules tumorales, de par leur caractère hydrophobe, sont donc favorables à la présence des ZnPcs sous forme monomérique [52].

21236. Les métallophthalocyanines de zinc sulfonées

ZnPcS_n a été testée sur des fibroblastes pulmonaires de hamster chinois V-79 *in vitro* et sur des cellules de tumeur mammaire de souris EMT-6 implantées dans des souris Balb/c. Il en résulte que les dérivés les moins sulfonés, et notamment ZnPcS₂, sont les plus phototoxiques [53]. Cependant, dans le cadre de la recherche *in vitro*, il est plus facile, pour des raisons de solubilisation avant utilisation, de travailler avec les molécules les plus hydrophiles. Ainsi, les ZnPcs les moins sulfonés et donc les plus hydrophobes sont peu utilisées en recherche *in vitro* même si elles semblent les plus efficaces.

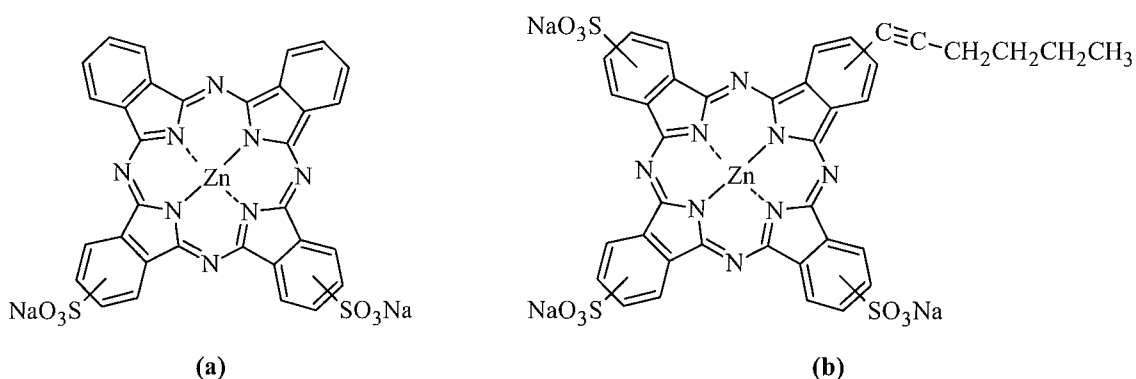


Figure 23 : métallophthalocyanines de zinc, (a) ZnPcS_{2a} (b) ZnPcS₃C₆

ZnPcS_{2a} (qui possède 2 groupements SO₃R adjacents) est considérée comme la plus active des ZnPcs sulfonées (fig.23a). Les molécules ZnPcS₃C₆ (fig.23b) et ZnPcS₃C₉ ont une activité comparable à ZnPcS_{2a} et, de plus, leur préparation et leur purification sont plus simples que pour ZnPcS_{2a}. Par ailleurs, ZnPcS₃C_n est capable de s'accumuler au niveau de la membrane nucléaire des cellules sans la traverser conduisant à la mort cellulaire [33].

La recherche sur les métallophthalocyanines de zinc sulfonées aboutit aujourd'hui à des composés amphiphiles. L'adjonction de substituants naphtoxy sulfonés permet d'augmenter le caractère lipophile de ces molécules, et permet par ailleurs d'empêcher l'agrégation de ces Pcs, compte tenu de l'encombrement stérique de ces substituants. Cette ZnPc substituée par quatre groupements sulfonaphtoxy (fig.24) possède un rendement quantique de production d'oxygène singulet supérieur de 25% à celui des hématorphyrines, et agit sur les tissus malins par des mécanismes de type I et de type II. De plus, sa faible agrégation en solution et son caractère amphiphile lui confèrent une bonne pénétration cellulaire [54].

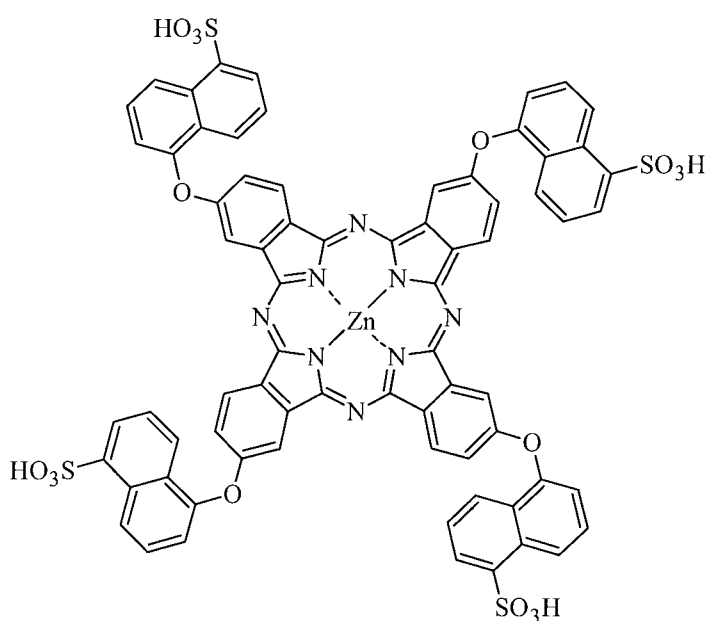


Figure 24 : ZnPc substituée par quatre groupements sulfonaphtoxy

21237. Développement *in vitro* et *in vivo*

❖ Comparaison de l'activité de ZnPc par rapport à AlPcS₄

L'activité de AlPcS₄ et celle de ZnPc (administrées en liposomes, à 5 mg/Kg pour AlPcS₄ et à 0,3 mg/Kg pour ZnPc) ont été comparées *in vivo* sur un modèle tumoral de vessie de rat. Il en résulte une nécrose tissulaire évaluée sur coupe histologique 24 heures après la PDT qui est

significative (presque 100%) dans le cas de ZnPc, alors que rien de remarquable ne s'observe avec AlPcS₄. Dans les deux cas, l'épithélium sain reste intact. Il ressort de cette étude que la ZnPc possède une activité photocytotoxique très supérieure à AlPcS₄ pour une dose injectée plus de 15 fois inférieure [38].

❖ Réponse cellulaire à différentes ZnPcs hydrophobes

Les Pcs ZnPc, octapentyl et octadécyl ZnPcs (fig.25) ont été expérimentées sur un fibrosarcome MS-2 transplanté dans des souris Balb/c (tests *in vivo*). On constate une réponse différente des tissus selon la molécule utilisée [29] :

- avec ZnPc, on observe une nécrose hémorragique massive jusqu'à 24 heures après la fin de la PDT, avec formation d'une eschare et un retard dans la croissance de la tumeur de 10 jours par rapport aux témoins non irradiés,
- avec les octapentyl et octadécyl ZnPcs, il n'apparaît pas d'eschare ou de nécrose. Seul un œdème apparaît éventuellement. Le retard de croissance de la tumeur est 3 fois moins important.

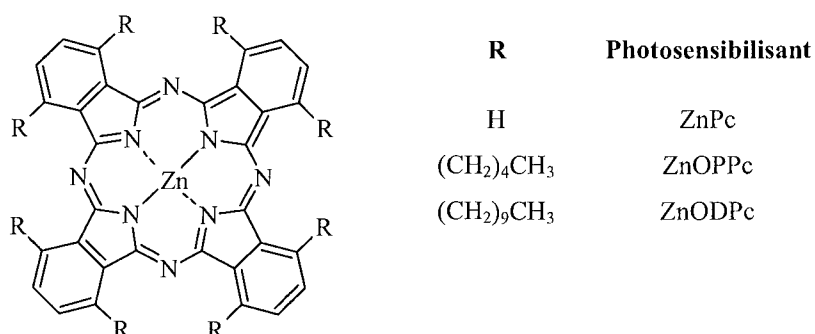


Figure 25 : ZnPc, octapentyl (ZnOPPc) et octadécyl (ZnODPc) ZnPcs

Il est intéressant de noter que ces 3 molécules possèdent le même rendement quantique de génération d'oxygène singulet compris entre 0,5 et 0,7. Ainsi, les différences observées s'expliquent davantage par la biodistribution et la localisation intracellulaire des composés que par les propriétés photochimiques intrasèques de ces Pcs [29].

❖ Efficacité *in vitro* d'une ZnPc hydrophile

Des ZnPcs portant de multiples groupes carboxylates ont été évaluées *in vitro* sur des fibroblastes pulmonaires de hamster chinois V79 et sur des cellules Hep2 d'hépatocarcinome

humain. Parmi ces Pcs, la 2,3,9,10,16,17,23,24-octa[(3,5-biscarboxylate)-phénoxy] phtalocyanine de zinc (fig.26), chargée négativement, est hydrophile et principalement présente sous forme monomérique à pH physiologique et au dessus. Malgré ce caractère hydrophile, cette Pc possède une très bonne pénétration membranaire et une forte accumulation intracellulaire. Une localisation nucléaire est atteinte pour une association de cette Pc avec des liposomes cationiques LipoGen. Elle possède par ailleurs une faible toxicité à l'obscurité et une photocytotoxicité pour une faible dose de lumière (1 J/cm^2) [27].

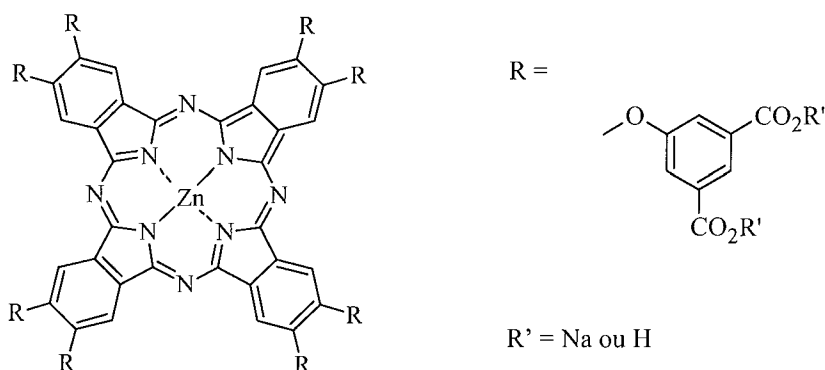


Figure 26 : 2,3,9,10,16,17,23,24-octa[(3,5-biscarboxylate)-phénoxy] phtalocyanine de zinc
 $\lambda_{\text{max}} = 679 \text{ nm}$ et $\epsilon_{679} = 1,55.10^5 \text{ M}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, solvant : THF [27]

❖ Efficacité *in vitro* sur des fibroblastes et kératinocytes

Une étude *in vitro* sur des fibroblastes humains HT-1080, des fibroblastes embryonnaires de souris 3T3, et des kératinocytes humains HaCaT, s'est intéressée à l'efficacité d'une ZnPc monosubstituée et deux ZnPcs tétrasubstituées (fig.27). Il ressort que les molécules tétrasubstituées sont plus photocytotoxiques sur les trois lignées testées que la ZnPc monosubstituée. La distribution intracellulaire des Pcs semble identique dans les différentes lignées, pourtant, la mort cellulaire serait due à un phénomène nécrotique pour les fibroblastes, alors qu'un phénomène apoptotique serait en jeu pour les kératinocytes. A la concentration de $5 \mu\text{M}$, 80% des cellules meurent après une irradiation d'une minute à 600-700 nm et 50 mW/cm^2 . Cette étude devrait se poursuivre par l'étude des conditions permettant d'orienter une mort cellulaire par apoptose ou nécrose afin d'obtenir une destruction sélective des kératinocytes ou des fibroblastes [55].

Ces tests s'inscrivent dans une démarche plus globale de traitement de maladies cutanées par la PDT et les Pcs, comme les tumeurs des cellules basocellulaires, et la nécessité d'utiliser des

Pcs sous forme topique. Ces Pcs, devant alors franchir les couches du *stratum corneum*, devraient être, à terme, développées au sein de formulations qui permettent une pénétration en quantité suffisante dans les couches épidermiques.

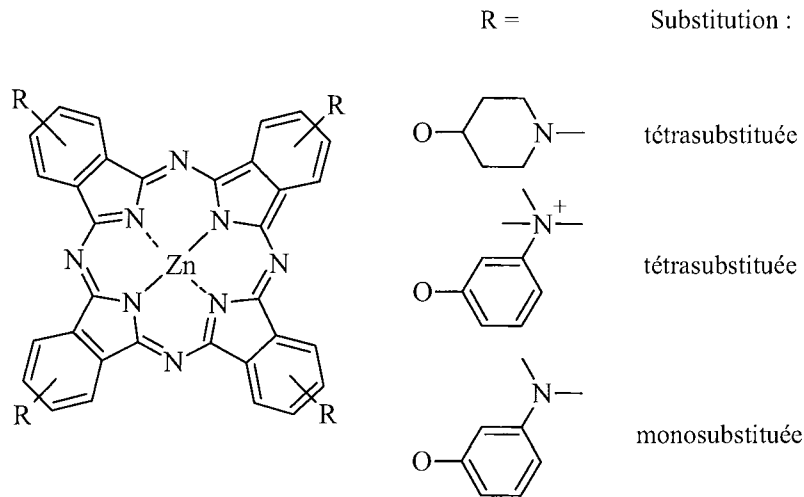


Figure 27 : structure des phtalocyanines testées *in vitro* sur des fibroblastes et kératinocytes [55]

❖ Application clinique

Une préparation composée de liposomes contenant une ZnPc était en cours d'essais de phase I et II en Suisse (CHUV de Lausanne) en 2001 pour le traitement de cancers des voies aérodigestives supérieures, de l'œsophage et de l'arbre trachéobronchique [34]. Il n'y a cependant guère plus d'informations à ce sujet.

21238. Développement structural

❖ ZnPc amphiphile

En général, les Pcs non substituées sont insolubles ou peu solubles dans les solvants organiques les plus communs, ce qui pose un problème pour leur utilisation en PDT. On peut améliorer cette solubilité en introduisant sur le macrocycle des substituants comme des groupements alkyls. On obtient alors des molécules lipophiles et plus solubles dans les solvants organiques. Par ailleurs, l'introduction de groupes hydrophiles (type sulfo, carboxy ou phosphono) permet d'augmenter la solubilité dans les milieux aqueux. Le caractère hydrophile a une forte influence sur la biodisponibilité et sur la distribution *in vivo* des Pcs. Des analogues des Pcs sur lesquels on substitue un ou plusieurs cycles benzoïques par des cycles pyridines sont plus hydrophiles compte tenu des atomes d'azote quaternaire des pyridines.

Ces différentes observations ont conduit à la synthèse d'une ZnPc amphiphile considérée comme le meilleur PS de la nouvelle génération, la bis(1,4-didécylbenzo)-bis(3,4-pyrido)porphyrzine de zinc (fig.28). Cette molécule possède 2 parties didécylbenzénoïdes et 2 parties pyridinoïdes. Son intérêt réside dans le fait que cette Pc est soluble dans les solvants organiques et que son affinité pour les tumeurs est meilleure que celle des Pcs tétrasulfonées. De plus, la présence des azotes quaternaires des pyridines la rend soluble dans les milieux aqueux [56].

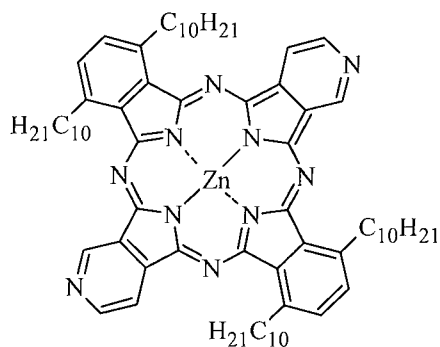


Figure 28 : bis(1,4-didécylbenzo)-bis(3,4-pyrido)porphyrzine de zinc

❖ Synthèse de tétra-trifluoroéthoxyl phtalocyanine de zinc

Les substituants alkyl, alkoxy ou le fluor augmentent la solubilité de la Pc dans les solvants organiques. Le fluor a une taille comparable à celle de l'hydrogène, d'où un comportement similaire à celui-ci dans les milieux biologiques.

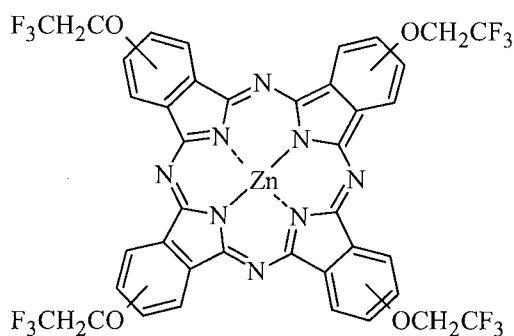


Figure 29 : tétra-trifluoroéthoxyl phtalocyanine de zinc

La tétra-trifluoroéthoxyl ZnPc (fig.29) est insoluble dans l'eau, mais par rapport aux ZnPcs non substituées, elle est soluble dans la plupart des solvants organiques tels que le méthanol,

l'éthanol ou l'acétone, d'où une purification et une identification plus simples. Il est aussi possible de former assez simplement une émulsion avec un agent tel que le F68, émulsion qui est facilement stérilisable et stable. Le groupe tétra-trifluoroéthoxyl augmente la solubilité lipidique de la Pc et augmente donc les interactions avec les membranes cellulaires. Le substituant trifluoro diminue l'activité photosensibilisante. Il faut néanmoins administrer ces molécules hydrophobes à l'aide de véhicule *ad hoc* (émulsion H/E, nanoparticules, anticorps, cyclodextrines...).

Son action a été évaluée sur des cellules de myélomes (mort cellulaire) et sur des cellules de cancer d'ovaires de hamster chinois (inhibition de croissance) [57].

❖ Combinaison avec des nanoparticules d'or

La combinaison d'une ZnPc substituée par un groupement C₁₁ mercaptoalkyl éther (fig.30) avec des nanoparticules d'or (sous forme AuCl₄⁻ en solution) aboutit à la génération d'oxygène singulet avec de grands rendements quantiques, du fait d'un transfert d'énergie de l'état triplet excité de la Pc vers la surface métallique de la nanoparticule d'or. Cette génération d'oxygène singulet passe de $\Phi_v = 0,45$ (dans le toluène) pour la ZnPc seule, à $\Phi_v = 0,65$ (dans l'éthanol) pour ce composé. La dissolution de ce système dans le bromure de tétraoctylammonium augmente sa solubilité dans les solvants polaires facilitant ainsi une injection systémique. Cette combinaison a pour l'heure montré de bons résultats pour la génération d'oxygène singulet et des essais *in vitro* sont en cours [58].

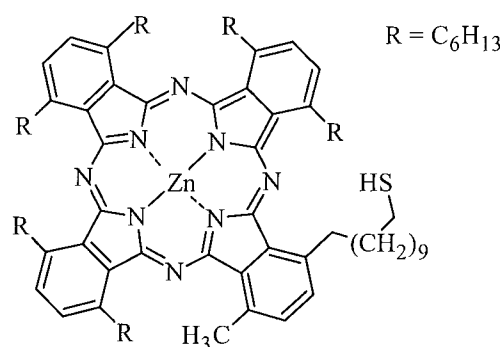


Figure 30 : 1,4,8,11,15,18-hexahexyl-22-méthyl-25-(11-mercaptoundécyl) phthalocyanine de zinc

❖ Système ZnPc-Ru(bpy)₃

Ce système est composé d'une ZnPc conjuguée à un complexe ruthénium(II) tris(pyridine) (fig.31). Ce genre de système, par des interactions intramoléculaires, est capable de diriger un transfert d'énergie (type II) ou d'électrons (type I), et d'accélérer la cinétique de formation de l'état triplet excité de manière plus efficace que la référence ZnPc seule [59].

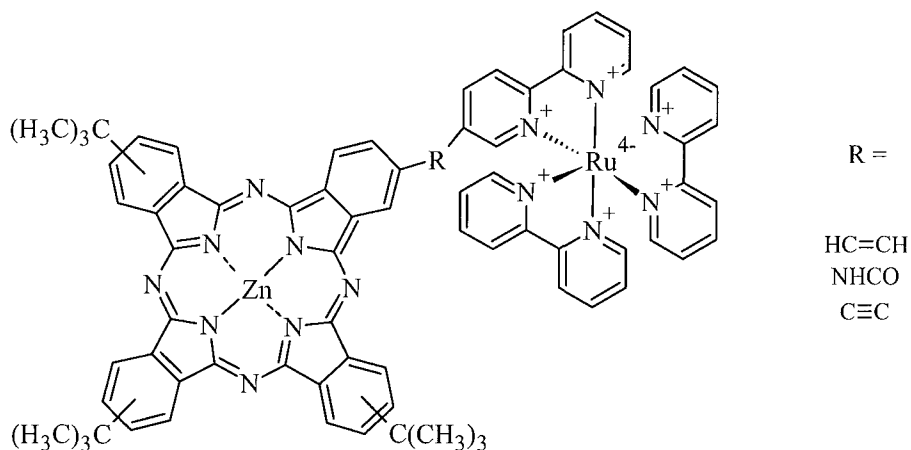


Figure 31 : système ZnPc-Ru(bpy)₃

❖ Synthèse d'une ZnPc substituée par un groupement carboxyl

La sélectivité d'un PS pour un type de récepteur cellulaire ou un tissu, peut être accrue par sa conjugaison à un vecteur, faisant ainsi un PS de 3^{ème} génération que nous évoquerons ultérieurement. Il est alors intéressant de synthétiser des Pcs portant une fonction chimique substituant latéralement la Pc, qui permet une liaison covalente entre le vecteur et la Pc. Il faut cependant arriver à synthétiser une molécule mono-substituée, à l'aide d'une méthode de synthèse adaptée (condensation statistique, approche par subphthalocyanine...) suivie d'une purification permettant d'isoler le composé désiré.

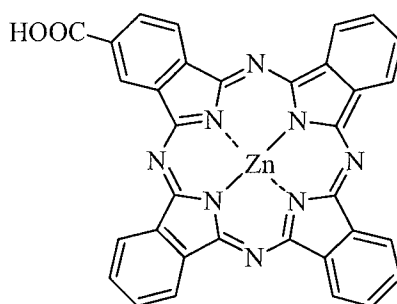


Figure 32 : 2-carboxy métallophtalocyanine de zinc

La synthèse par condensation statistique de la 2-carboxy métallophthalocyanine de zinc (fig.32), ainsi que sa purification par une méthode chromatographique, viennent d'être récemment décrits par Chen et al. [60]. La fonction carboxylique permet un couplage à un vecteur. Les propriétés physicochimiques de cette molécule sont comparables à celles de la ZnPc non substituée.

2124. Métallophthalocyanines de silicium

21241. Structure

Les métallophthalocyanines de silicium (SiPc) possèdent 2 ligands axiaux sur le métal central (fig.33) dont la nature empêche l'agrégation en solution. La nature de ces substituants oriente par ailleurs le caractère lipophile ou hydrophile de la Pc [25]. De plus, ces molécules n'ont pas d'isomères, ce qui permet d'obtenir des produits purs plus facilement [1].

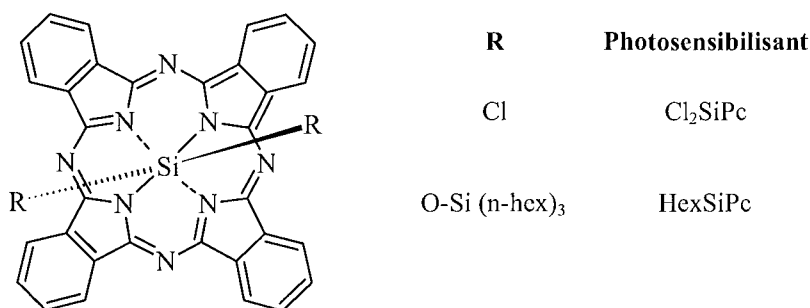


Figure 33 : exemples de métallophthalocyanines de silicium

21242. Développement

❖ Traitement potentiel du mélanome

La dichloro-phthalocyanine de silicium (Cl₂SiPc) et la bis(tri-n-hexylsiloxyl) phthalocyanine de silicium (HexSiPc) (fig.33), ont un potentiel dans le traitement des mélanocytes M6 apigmentés malins humains. Possédant une efficacité démontrée *in vitro*, elles conduisent, de plus, à une viabilité légèrement supérieure des mélanocytes sains.

HexSiPc a des propriétés intéressantes, sa chaîne n-hexyl lui apporte un caractère lipophile et ses ligands axiaux empêchent son agrégation. Le maximum d'absorption est noté à $\lambda_{\max} = 668$ nm et son coefficient d'extinction molaire est de $\epsilon = 3.10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (THF).

L'incorporation de HexSiPc dans des structures moléculaires organisées comme le Cremophor ou des liposomes à base de lécithine d'œuf (liposomes EYL) augmente sa pénétration cellulaire et son activité photocytotoxique. HexSiPc dans les liposomes EYL est le PS le plus efficace sur les cellules M6. L'action cytophototoxique est corrélée à une augmentation de la peroxydation des lipides cellulaires et de l'activité de la superoxyde dismutase (SOD), une diminution des concentrations en GSH et GSSG, et une réduction de l'activité de la glutathion peroxydase et de la catalase [25].

Pour Cl₂SiPc, il y a peu de différence selon une utilisation en solution (DMF en tampon phosphate) ou solubilisée dans le Cremophor [25].

❖ SiPc dicationique

La bis(4-N-méthylpyridiniumoxy)phtalocyanine de silicium est une Pc dicationique (fig.34). Elle possède de nombreux avantages :

- facilité de préparation,
- composition unique,
- grande stabilité en particulier en milieu aqueux,
- pas d'agrégation en milieu aqueux,
- forte absorption dans le rouge (bande Q à 695 nm),
- faible toxicité en absence de lumière et grande photoactivité,
- rendement quantique de fluorescence : $\Phi_f = 0,15$ (solvant : eau).

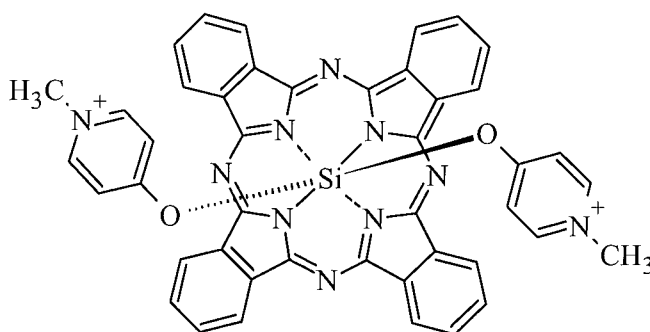


Figure 34 : bis(4-N-méthylpyridiniumoxy)phtalocyanine de silicium

Cette Pc est non toxique en absence d'irradiation lumineuse, et a une photocytotoxicité qui augmente avec sa concentration et avec la dose de lumière appliquée. Elle a été testée,

conjuguée à de l'albumine sérique bovine (BSA), sur des cellules humaines d'hépatocarcinome HepG2 et des cellules de tumeur mammaire de souris J774. La variation du rapport Pc/BSA permet de conclure sur le fait que l'activité de ce composé est significativement augmentée lorsque la Pc est conjuguée à la BSA dans un rapport équimolaire [4].

❖ Combinaison avec des radicaux organiques

La présence d'atomes de haut numéro atomique permet d'augmenter le rendement quantique de formation d'oxygène singulet. Cependant, les éléments lourds sont généralement toxiques et il n'est donc pas envisageable de les utiliser en PDT pour contrôler ce rendement.

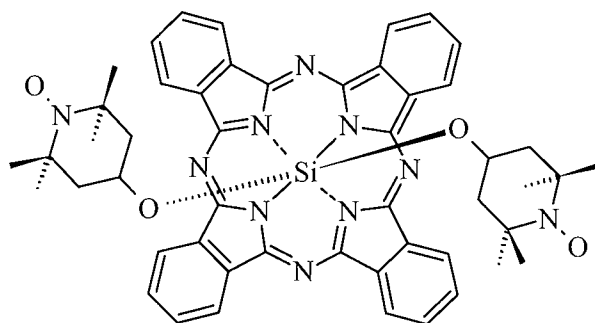


Figure 35 : 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy phtalocyanine de silicium

Des radicaux organiques permettent d'arriver au même objectif en évitant l'utilisation d'éléments lourds pour contrôler ce rendement. La 2,2,6,6-tétraméthyl-1-pipéridinyloxy phtalocyanine de silicium liée de manière covalente à des radicaux nitroxides (fig.35) permet d'augmenter ce rendement de formation d'oxygène singulet.

Des essais *in vitro* ont été conduits sur les cellules HeLa de carcinome de col utérin à l'aide de SiPcs couplées à différents radicaux organiques. On observe une nette augmentation de l'effet photodynamique grâce à ces radicaux paramagnétiques [20].

21243. Pc4

La Pc dénommée Pc4 est une SiPc avec un ligand axial 3-(diméthylamino-propyl)-diméthyl siloxy (fig.36). Cette SiPc a donné de bons résultats *in vitro* et *in vivo* pour entrer au stade d'essais cliniques dans le traitement de tumeurs, et elle est en cours de recherche pour la stérilisation de composés sanguins [1] et pour la destruction du virus HIV dans le sang [30].

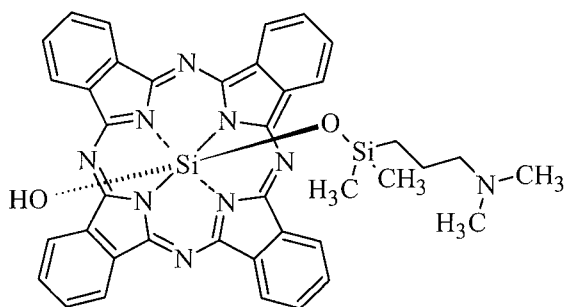


Figure 36 : Pc4, 3-(diméthylamino-propyl)-diméthyl siloxy hydroxy métallophtalocyanine de silicium

Pc4 a montré une grande efficacité *in vitro* sur différentes tumeurs de hamsters, de souris ou de cellules humaines, et s'est montrée d'une utilisation plus efficace que les ALPcs tétrasulfonées. Les premiers tests *in vivo* ont confirmé les bonnes réponses obtenues avec Pc4 à une irradiation de 675 nm, montrant sa nette supériorité sur la référence PHOTOFRIN, tant par ses capacités photocytotoxiques, que par des effets secondaires cutanés bien moins importants [61].

Les premiers essais ont été effectués sur des fibroblastes pulmonaires de hamster chinois V-79. La cytotoxicité de la Pc4 est 3 fois supérieure à celle d'une ALPc. On n'observe pas de différence de pénétration cellulaire entre ces 2 molécules ; il semble que la différence de photocytotoxicité provienne de leur distribution intracellulaire et/ou de l'agrégation des Pcs observées *in vitro*. La Pc4 présente aussi une grande phototoxicité sur les fantômes érythrocytaires, par photoinduction de la peroxydation lipidique.

Les premiers essais *in vivo* ont été réalisés sur des fibrosarcomes RIF-1 implantés dans des souris. A une dose de 1 mg/Kg véhiculée par 25% de Cremophor, on observe, pour une dose de lumière de 132 J.cm⁻², la régression de la tumeur sans reprise de la prolifération cellulaire. La photosensibilité cutanée n'est que transitoire, survenant 10 jours après l'administration de Pc4 pour une durée de 24 heures environ. Dans les mêmes conditions, PHOTOFRIN entraîne une photosensibilité cutanée pendant 4 jours, et les souris restent sensibles à la lumière du soleil pendant un mois. Cette photosensibilité réduite permet d'affirmer que cette Pc ne persiste pas dans les tissus cutanés.

Des résultats similaires ont été obtenus sur des leucémies lymphoblastiques. Les auteurs ont aussi pu établir que, contrairement à la longueur des chaînes des ligands axiaux, le nombre de

ligands axiaux n'affecte pas la photocytotoxicité des composés. La chaîne aminosiloxy la plus courte conduit la liaison des Pcs au plus grand nombre de cibles intracellulaires [1].

❖ Mécanisme d'action

Le mécanisme d'action de Pc4 repose sur une action directe sur les cellules, et non par dommages vasculaires [61], selon un mécanisme de type II dans un premier temps. Les cibles intracellulaires majeures sont les mitochondries.

Le traitement de lymphoblastes leucémiques de souris L5178Y-R par Pc4 (300 nM et 75 mJ/cm² de lumière rouge) montre un relargage rapide de cytochrome c. Le relargage de cytochrome c à partir des mitochondries est un stade remarquable du phénomène d'apoptose. Ce relargage de cytochrome c semble être un phénomène tout ou rien, associé à l'activation de *caspase-3-like protease* et à des modifications de la morphologie du noyau cellulaire. De plus, ce phénomène est retardé après la PDT (15 minutes environ). Il n'est donc pas direct par dommages sur la membrane mitochondriale, mais il nécessite un niveau critique de photodommages de celle-ci. Cette induction de l'apoptose semble aussi être dose-dépendante du flux lumineux. En dessous de 35 mJ/cm², peu de phénomènes de type apoptotique sont observés. Au dessus de 40 mJ/cm², 80 à 90% des cellules sont en apoptose, traduisant ce phénomène tout ou rien [62].

La PDT avec Pc4 pourrait générer des espèces à « action longue et persistante » comme les hydroperoxydes de lipides ou de cholestérol, entraînant un stress oxydatif à long terme. Cette formation nécessiterait un environnement spécifique combinant un pH relativement bas et la présence en forte concentration de métaux à fort potentiel redox [63].

❖ Données pharmacocinétiques et toxicologiques

Pc4 est largement retrouvée dans les tissus pendant une période prolongée. Une administration en quantité plus importante de Pc4 ne semble pas affecter sa distribution dans les tissus ni l'exposition à la molécule. Une toxicité pulmonaire a été relevée chez la souris pour une dose excessive de Pc4 de 80 mg/Kg (utilisation en essais précliniques à 2 ou 10 mg/Kg), consécutive d'une précipitation de la molécule dans le sérum, suivie d'une réaction inflammatoire au niveau pulmonaire. L'excrétion de Pc4 n'est pas rénale et laisse présager une utilisation possible de ce PS chez les insuffisants rénaux [61].

2125. Les autres phtalocyanines métallées

Si les AlPcs, ZnPcs et SiPcs semblent être les Pcs à l'avenir le plus prometteur, quelques recherches ont été menées dans le cadre d'une utilisation en PDT sur des Pcs complexées à d'autres métaux. A l'heure actuelle, ces molécules ne font l'objet d'aucune attention particulière dans une utilisation en PDT, si ce n'est quelques essais relatés par la littérature avec des Pcs chélatées par le germanium (GePc).

On trouve aussi quelques données sur les Pcs chélatées par le gallium (Ga), moins efficaces sur la mort cellulaire que les ZnPcS malgré des propriétés spectrales sous forme monomérique similaires. L'activité photodynamique de GaPcS dépend du nombre de groupements sulfonés, et de son existence sous forme monomérique. La ClGaPcS monosubstituée est la plus efficace au niveau photodynamique compte tenu d'un caractère hydrophobe plus important que les composés multisubstitués, et donc d'une meilleure pénétration cellulaire [53]. La métallophthalocyanine de cérium sulfonée (CePcS) est sans doute le composé à l'activité tumoricide la plus importante parmi les Pcs, mais il est très phototoxique au niveau cutané, le rendant peu attractif comme PS [23].

La génération d'oxygène singulet n'est pas détectée par photoexcitation de Pcs complexées par le cobalt, fer, cuivre ou le vanadium sous forme VO^{2+} (tab.2). Il en est de même pour la génération de radical superoxyde (tab.3). FePcS entraîne peu d'effet biologique [64].

Tableau 2 : génération d'oxygène singulet par différentes Pcs : (excitation à 670 nm, référence utilisée : Rose Bengal, solvant : D_2O) [64]

| Photosensibilisant | Φ_v |
|----------------------------|----------|
| AlPcS | 0,34 |
| ZnPcS | 0,45 |
| H ₂ PcS | 0,14 |
| CuPcS, VOPcS, FePcS, CoPcS | 0,00 |

Tableau 3 : rendement quantique de génération du radical superoxyde (solvant : DMSO) [65]

| Photosensibilisant | $\Phi_{O_2^-}$ |
|--------------------|----------------------|
| GaPc | $4,22 \cdot 10^{-4}$ |
| LiPc | $1,40 \cdot 10^{-4}$ |
| H ₂ Pc | $8,47 \cdot 10^{-5}$ |
| ClAlPc | $2,61 \cdot 10^{-5}$ |
| ZnPc | $9,26 \cdot 10^{-6}$ |

2126. Les tétradibenzobarréno-octabutoxy phtalocyanines

Les tétradibenzobarréno-octabutoxyphthalocyanines (TDiBOPc) s'avèrent être une nouvelle classe de PS qui possèdent un grand coefficient d'extinction molaire vers 740 nm. L'un des autres avantages des TDiBOPc est la présence de groupements dibenzobarréno qui sont à la fois encombrants et hors du plan de la Pc, minimisant ainsi l'agrégation de ces molécules dans les solvants polaires.

Ces Pcs ont aussi les qualités suivantes :

- bon ciblage des tumeurs,
- accumulation sélective dans les tumeurs,
- présence persistante du PS dans les tumeurs, de 3 à 48 heures après injection. La meilleure réponse est observée à 48 heures, alors que les Pcs plus classiques répondent mieux à 24 heures après injection,
- clairance sérique rapide : plus de trace après 7 jours. Il y a peu d'accumulation de TDiBOPc dans la peau minimisant ainsi tout effet photosensibilisant. Cependant, une présence persistante après une semaine dans le foie et la rate peut entraîner une éventuelle toxicité en cas d'administration répétée.

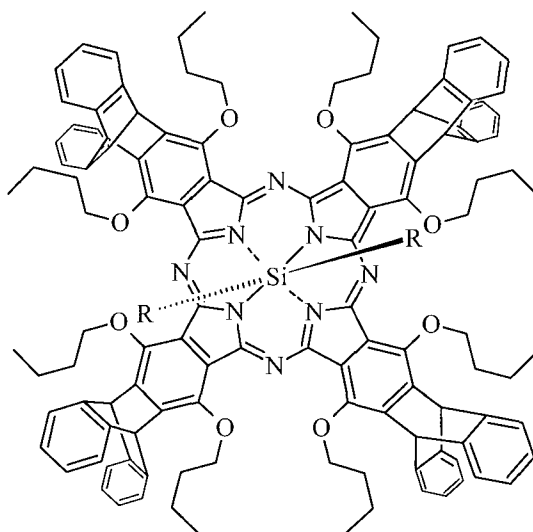


Figure 37 : structure chimique de la Si-TDiBOPc portant six hexyl comme substituants axiaux ($R = -OSi(C_6H_{13})_3$)

La Zn-TDiBOPc délivrée par le Cremophor *in vivo* dans des souris portant un fibrosarcome MS-2, s'accumule en grande quantité dans la tumeur, sans doute grâce à sa très haute affinité pour les LDL sériques.

Le remplacement du zinc par le silicium n'entraîne pas de modification pharmacocinétique ou du ciblage de la tumeur. L'accumulation par la tumeur est favorisée par l'introduction de chaînes hexyl à la place des hydroxyles sur le silicium, qui augmente ainsi l'hydrophobicité de la molécule. Cette sélectivité diminue néanmoins pour des chaînes plus longues (C_{18}). Parmi les TDiBOPc, c'est la Si-TDiBOPc portant six hexyl comme substituants axiaux (fig.37) qui semble être le PS le plus efficace et le plus prometteur [66].

2127. Les analogues des phtalocyanines

21271. Azaphtalocyanines

Les azaphtalocyanines (AzaPc) sont des analogues des Pcs dans lesquelles certains atomes de carbone des cycles benzènes sont remplacés par des atomes d'azote (fig.38a). Ces molécules semblent moins prometteuses que les Pcs pour une application en cancérologie. Elles possèdent en effet une tendance à l'agrégation plus prononcée que les Pcs, et la bande Q la plus importante est décalée vers le bleu de 50 nm environ par rapport aux Pcs. Cependant, la production d'oxygène singulet semble identique pour les deux molécules, et les AzaPcs sont plus stables au photoblanchiment. Une de leur utilisation envisageable serait le traitement de tumeur ne nécessitant pas une pénétration lumineuse importante (maladies de la peau non mélanomiques) [30].

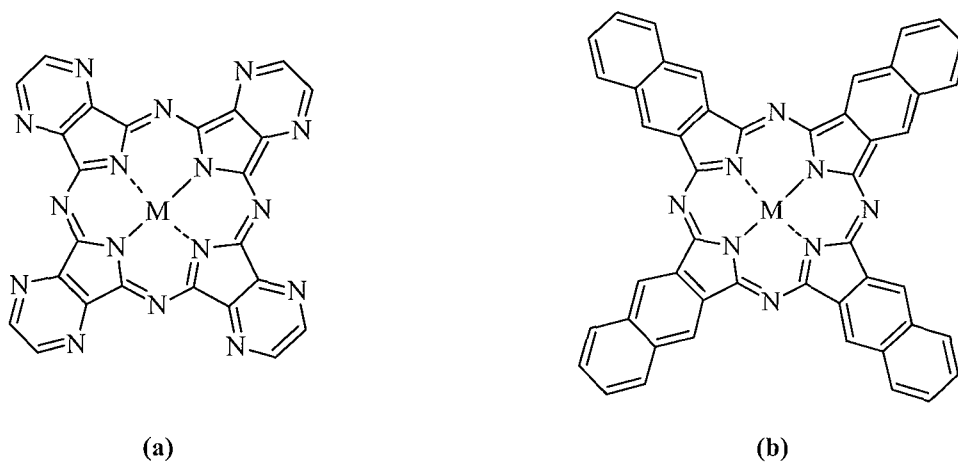


Figure 38 : (a) azaphtalocyanine de métal M, (b) naphthalocyanine de métal M

21272. Naphtalocyanines

Les naphthalocyanines (fig.38b) possèdent un cycle benzène supplémentaire à la périphérie de la Pc. D'un point de vue photophysique, elles absorbent plus fortement dans le rouge ($\lambda = 760 \text{ nm}$, $\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Les naphthalocyanines d'aluminium ou de zinc auraient une accumulation cellulaire comparable à celles de leurs homologues Pcs, mais elles possèdent une toxicité intrinsèque plus importante. Leur agrégation et une faible stabilité photochimique ne leur donnent pas une activité phototoxique remarquable. *In vivo*, les naphthalocyanines semblent inactives si elles ne sont pas substituées, et possèdent une faible activité avec une sulfonation partielle. Ces composés insolubles dans les milieux aqueux nécessitent des liposomes pour une administration *in vivo* [32].

213. Les phtalocyanines utilisées comme photosensibilisants de 3^{ème} génération

La recherche évalue actuellement l'efficacité de porteurs protéiques pour améliorer le ciblage des cellules tumorales, afin d'élaborer des photosensibilisants dits de 3^{ème} génération. Le ciblage à l'aide de protéines a quand même ses limites qui sont les réponses immunitaires, c'est pourquoi certains auteurs s'orientent vers de petits motifs peptidiques.

2131. Protéines sériques

Lors de leur administration dans le sang, les PS se retrouvent souvent associés aux protéines sériques par différentes interactions (liaisons hydrogène, forces de Van der Waals, interactions hydrophobes...). Ces systèmes augmentent l'activité photodynamique par accumulation intracellulaire à l'aide de phénomènes d'endocytose contrôlés par l'intermédiaire de récepteurs spécifiques.

21311. Albumine

L'albumine est la protéine sérique la plus abondante, 10 fois plus concentrée que la concentration totale en lipoprotéines de toutes sortes. Elle a la capacité de lier de manière covalente ou réversible un grand nombre de composés endogènes ou exogènes. L'albumine sert aussi de source d'acides aminés pour les cellules. L'augmentation du métabolisme et la prolifération des cellules cancéreuses entraînent un rapide et soutenu *turnover* de l'albumine dans les cellules tumorales.

La liaison entre l'albumine sérique bovine (BSA) et la ZnPc est de type non covalente. Ce composé ZnPc-BSA, administré par voie intraveineuse, a été testé sur :

- des tumeurs mammaires de souris EMT-6 greffées dans des souris Balb/c,
- des cellules cancéreuses de colon humain T380 greffées dans des souris *nude*.

Dans les 2 cas, à des doses de 0,5 et 2 $\mu\text{mol/Kg}$, une régression des tumeurs apparaît dans les 24 heures après la PDT. Alors que l'on observe une toxicité hépatique avec ZnPc solubilisée dans le Cremophor, cet effet n'est pas observé avec le conjugué ZnPc-BSA.

De la BSA portant un groupement maleyl a aussi été couplée à l'AlPcS₄. L'affinité du conjugué maleyl-BSA-AlPcS₄ pour les récepteurs des macrophages est bien meilleure que celle du conjugué BSA-AlPcS₄, d'où une meilleure capture par les macrophages et un effet

photodynamique amélioré. Malheureusement, ce conjugué est moins actif que la AlPcS_{2a} seule, sans doute du fait d'une agrégation plus importante de la Pc conjuguée [67].

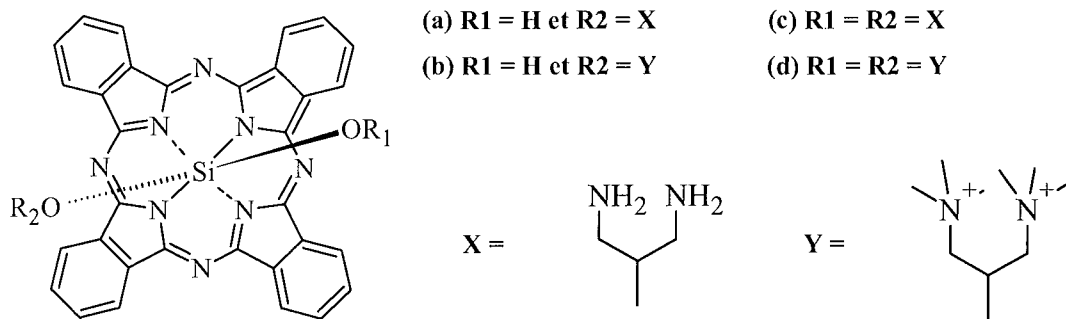


Figure 39 : SiPcs conjuguées de manière non covalente à de la BSA ou de la maleyl-BSA [68]

Cette même constatation se retrouve dans une étude menée sur des SiPcs liées de manière non covalente à de la BSA ou de la maleyl-BSA. Il ressort que certains composés (fig.39d), du fait d'une agrégation accrue suite à leur conjugaison, perdent une partie de leur photocytotoxicité. Cette étude évalue l'activité *in vitro* de différentes SiPcs conjuguées sur des cellules d'hépatocarcinome humain HcpG2. Elle montre que les interactions entre les SiPcs et la BSA sont plus fortes pour les composés substitués de manière non symétrique (fig.39a,b), et que la phototoxicité des composés non agrégés (fig.39c,b) est 8 fois supérieure à celle des molécules non conjuguées à l'albumine [68].

21312. Lipoprotéines

Les lipoprotéines solubilisent les corps gras (cholestérol, triglycérides...) et permettent leur transport au sein de l'organisme. Les plus importantes d'entre elles en matière de transport de médicaments sont les LDL. Les LDL sont aussi les plus gros transporteurs de cholestérol. Comme le cholestérol est l'un des composants majeurs des membranes plasmiques, il est essentiel pour la croissance et la survie des cellules. Il est donc naturel que les cellules tumorales, en prolifération, surexpriment les récepteurs au LDL, faisant des LDL un véhicule attractif. Un autre avantage de ces LDL est l'oxydation de celles-ci par la lumière au cours de la PDT, qui conduit à des espèces oxydées hautement cytotoxiques envers les cellules endothéliales, accentuant l'action photodynamique. Ainsi, améliorer l'incorporation des Pcs dans les LDL entraîne une amélioration de la PDT.

On peut alors envisager 2 mécanismes permettant le ciblage tumoral à l'aide des LDL.

Une première approche consiste en une conjugaison, au sein de l'organisme, du PS avec les LDL endogènes. Différentes études ont été menées avec les ZnPcs très hydrophobes non substituées, préalablement préparées dans des liposomes. Certaines formulations de ces liposomes montrent une redistribution des ZnPcs au sein des LDL, et même parfois au sein des HDL. L'incubation des ZnPcs préparées avec le plasma permet une opsonisation par les protéines plasmatiques augmentant l'accumulation des Pcs dans les LDL. Les véhicules utilisés ont aussi leur importance. L'administration de l'octabutoxy métallophthalocyanine de germanium solubilisée dans le Cremophor conduit à une forte association avec les LDL et une présence prolongée dans le sérum par rapport à la même Pc administrée dans des liposomes.

L'autre voie consiste à préparer des complexes Pc-LDL avant toute injection intraveineuse. La substitution de AlPcS₄ par une chaîne alkyl de 12 atomes de carbone (AlPcS₄C₁₂) permet son insertion dans la partie lipidique des LDL. Le conjugué LDL-AlPcS₄C₁₂ est 2 fois plus phototoxique *in vitro* sur des cellules de carcinome pulmonaire humain A549 que le composé non conjugué. Dans les mêmes conditions le composé AlPcS₄ est totalement inactif. Une pré-complexation de ZnPc avec des LDL avant injection donne de meilleurs résultats que la même Pc simplement préparée dans des liposomes. Dans les fibroblastes humains HT1080, les complexes ZnPc-LDL sont internalisés par endocytose non spécifique. Ce manque de spécificité est dû à des changements de la structure de l'apoprotéine B lors de la complexation ZnPc-LDL, ne permettant plus la reconnaissance des récepteurs au LDL [67].

Les Pcs sont en général liées en plus grande quantité aux HDL plutôt qu'aux LDL. L'association HDL-ZnPc conduit à une augmentation de la capture cellulaire du PS, mais aucun changement dans l'efficacité de la PDT. Son utilité est donc discutée dans le véhicule de PS [67].

21313. Autres protéines sériques

Une protéine intéressante, mais qui reste pour le moment non explorée, est l'hémoglobine, proposée comme véhicule intravasculaire. L'hémoglobine possède une cystéine libre permettant un couplage avec un PS. De plus, l'hémoglobine a l'intérêt de délivrer simultanément le PS et l'oxygène [67].

2132. Stéroïdes

21321. Cholestérol

Le cholestérol est un composant vital de la cellule eucaryote, et il est rapidement consommé par les cellules en prolifération. Les LDL sont la source primaire de cholestérol pour les cellules.

Deux conjugués stéroïde-phtalocyanine ont été testés :

- une dicholestéryl métallophtalocyanine de germanium, composée de 2 groupes cholestérol liés axialement à la Pc par l'intermédiaire d'un bras espaceur diphénylsilanediol [67],
- une métallophtalocyanine de silicium portant elle aussi axialement 2 groupes cholestérol (fig.40). Cette molécule est 7 à 9 fois plus efficace que les références ClAlPc ou la bis(tri-n-hexylsiloxy) phtalocyanine de silicium (HexSiPc) [69].

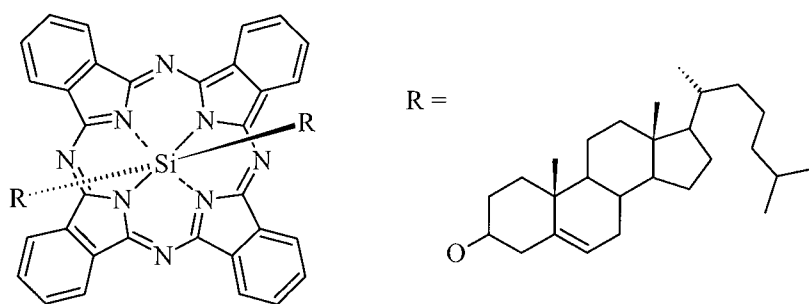


Figure 40 : dicholestéryl métallophtalocyanine de silicium
 $\lambda_{\text{max}} = 670 \text{ nm}$, $\epsilon = 276690 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (THF) [69]

Une ZnPc substituée par 8 groupes cholestérol [70], ainsi qu'une association ZnPc-cholestérol au sein de vésicules unilamellaires utilisables en PDT [26], ont été relevées dans la littérature. Ces systèmes n'ont, *a priori*, pas encore été testés sur des modèles vivants.

21322. Oestrogènes

Différentes phtalocyanines lipophiles ou hydrophiles ont été liées de manière covalente à du 17 α -éthynylœstradiol (fig.41), du 17 α -(2-buta-1,7-diynyl)œstradiol ou du 17 α -(phényl-1,3-diynyl) œstradiol. Le composé le plus hydrophobe montre la plus grande affinité pour les récepteurs à l'œstrogène, quatre à cinq fois supérieure que pour les molécules hydrophiles. Cependant, dans le meilleur des cas, cette liaison ne se fait qu'à 12% de celle observable avec de l'œstradiol non couplé à un PS. Des essais réalisés sur un modèle de tumeur mammaire de

souris EMT-6 montrent de manière surprenante que c'est la Pc trisulfonée la plus hydrophile qui possède la meilleure photocytotoxicité. Mais, il semble que ce manque d'activité photodynamique des Pcs les plus lipophiles s'explique par les méthodes de préparation et les véhicules employés. La longueur du bras espaceur ne semble pas influencer l'activité du conjugué [67,71].

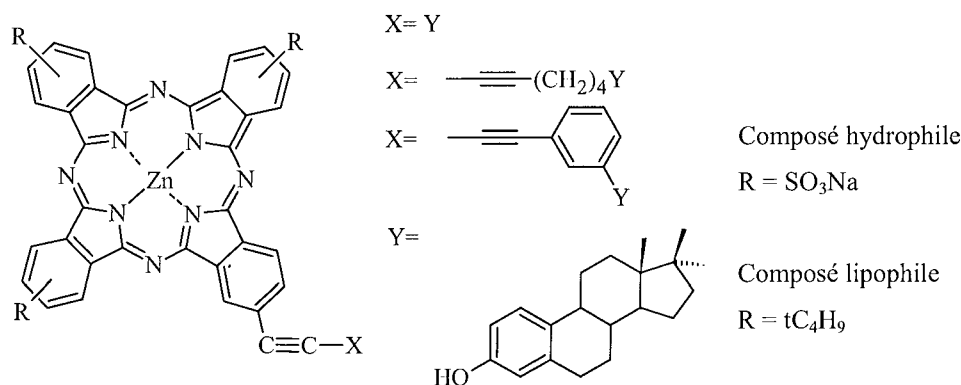


Figure 41 : ZnPc couplée à du 17 α -éthynylœstradiol

2133. Epidermal growth factor (EGF)

Les récepteurs transmembranaires à l'EGF à activité tyrosine kinase sont surexprimés au niveau des cellules tumorales dans un grand nombre de cancers, faisant ainsi de l'EGF un adresseur de choix pour les médicaments. Les Pcs d'aluminium ou de cobalt (CoPc) disulfonées liées de manière covalente à l'EGF ont une activité photodynamique jusqu'à 7 fois supérieure à celle des molécules libres sur les cellules MCF-7 (cancer du sein humain) [67]. L'activation de la CoPc nécessite de l'acide ascorbique comme catalyseur. Son couplage à l'EGF et son activation à l'aide d'acide ascorbique lui confèrent une cytotoxicité 100 fois supérieure à celle de la molécule libre sur les lignées MCF-7 ou B16 (mélanome) [72].

2134. Acides aminés

Une série de photosensibilisants constitués d'une métallophthalocyanine de zinc liée à des acides aminés a été testée *in vitro* sur des cellules de cancer de col de l'utérus humain (cellules SiHa). L'utilisation d'acides aminés permet de modifier le caractère hydrophile et/ou lipophile. Sur le modèle testé, la phototoxicité de ces molécules (fig.42) est du même ordre que celle obtenue avec des ZnPcs tétrasulfonées. On note une légère augmentation de cette phototoxicité avec une augmentation de la longueur des chaînes des acides aminés (l'acide

aminocaproïque donne le composé le plus efficace parmi la série étudiée). Ces Pcs sont capables d'atteindre le noyau cellulaire, elles entraînent la mort cellulaire, une inhibition de la croissance cellulaire et un arrêt du cycle cellulaire en phase G₀/G₁. Des essais *in vivo* sont en cours [73].

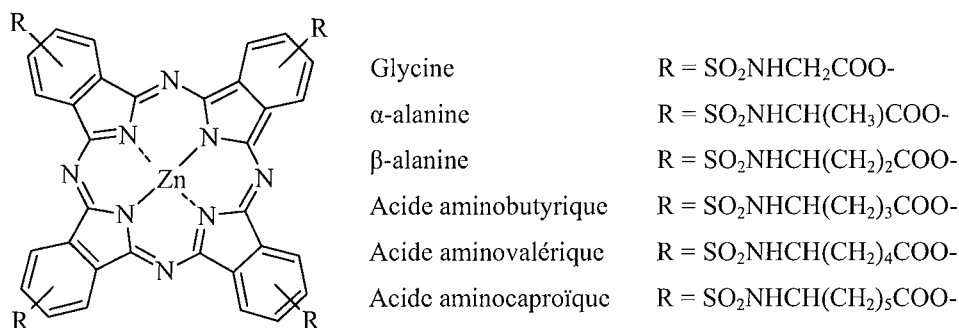


Figure 42 : ZnPc couplée à différents acides aminés

2135. Adénovirus ou protéines adénovirales

Les adénovirus permettent de rompre les endosomes après infection dans la cellule, et ces composés ciblent le noyau cellulaire plus rapidement. Ce ciblage du noyau cellulaire augmente de 2,5 fois l'activité du PS par rapport à une localisation cytoplasmique.

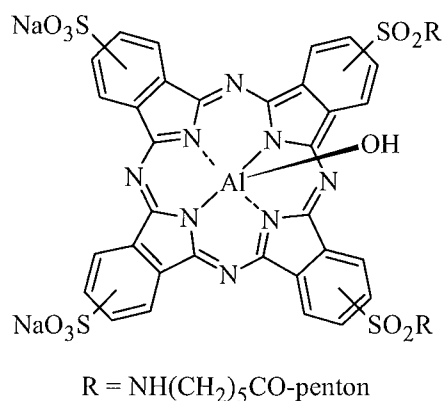


Figure 43 : conjugué AlPcS₄-penton

Des tests *in vitro* et *in vivo* ont permis d'évaluer l'activité de AlPcS₄ couplée, par un bras espaceur de 1 à 6 atomes de carbone, à des protéines de capsid d'adénovirus de type penton et motif RGD (H-Arg-Gly-Asp-OH), hexon, et fibre. L'efficacité du conjugué penton-AlPcS₄ (fig.43) est bien supérieure à celle de l'AlPcS₄ seule ou de l'AlPcS_{2a} sur 2 lignées cellulaires présentant des récepteurs aux intégrines. Sur des souris Balb/c porteuses de tumeurs

mammaires EMT-6, on observe une régression de la tumeur pour une dose de 1 $\mu\text{mol/Kg}$ de AlPcS_4 , comparable à celle observée avec AlPcS_{2a} . Une fois couplée de manière covalente à des protéines adénovirales, AlPcS_4 entraîne une éradication de la tumeur à la dose de 0,5 $\mu\text{mol/Kg}$ [74].

Il est à noter que le couplage avec des protéines adénovirales entraîne une diminution de la production d'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$), probablement due à une augmentation de l'agrégation des complexes Pc-protéine [19].

2136. Anticorps monoclonaux

L'utilisation d'anticorps monoclonaux (MAb) permet d'améliorer la sélectivité envers les tumeurs, notamment pour le traitement de tumeurs très étendues, nécessitant de grandes quantités de PS, avec des risques de toxicité pour les tissus sains.

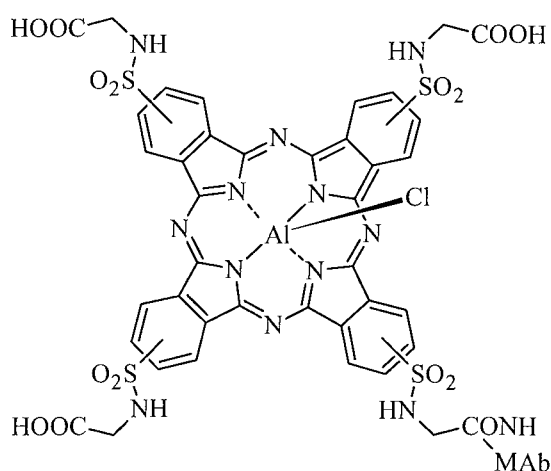


Figure 44 : conjugué AlPcS_4 -MAb

L' AlPcS_4 est hydrophile et ne pénètre pas facilement seule dans les cellules. Quasiment inactive seule, sa phototoxicité augmente avec un couplage à un MAb (fig.44). Du fait de sa grande hydrophilie, ce couplage est facile. Trois MAb différents (BIWA4, E48, 425) ont été étudiés, tous capables de cibler les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (*head and neck squamous cell carcinoma* ou HNSCC). Le MAb BIWA4 est dirigé contre l'antigène CD44v6, présent sur les cellules épidermoïdes de la tête et du cou, mais aussi des poumons, de la peau, de l'œsophage et du col de l'utérus. Le MAb E48 est dirigé contre l'antigène de surface GPI, et 425 est dirigé vers l'antigène EGFR, ce qui le lie à différents types de tumeur

dont les HNSCC, mais aussi le cancer du sein, des poumons, de l'œsophage, des reins, de l'estomac, de la vessie, du col de l'utérus [75]...

Seule, l'AlPcS₄ a une IC₅₀ supérieure à 700 nM sur les 5 lignées de HNSCC étudiées. Conjugée à BIWA4, la photocytotoxicité est améliorée avec une IC₅₀ comprise entre 0,6 et 5,4 nM. La comparaison du couplage AlPcS₄-MAb, à un autre PS, la tétrahydroxyphényl-chlorine couplée elle aussi à un MAb, montre une efficacité supérieure pour le composé contenant la Pc. Par ailleurs, l'immunoréactivité des MAb n'est pas influencée par la conjugaison, mais les caractéristiques des liaisons aux antigènes sont modifiées [75].

2137. Autres vecteurs

Couplés à des Pcs, les biphosphonates ont été proposés pour créer des conjugués actifs contre les métastases osseuses, la maladie de Paget, l'hypercalcémie et l'ostéoporose de type I [67].

D'autres vecteurs, comme les toxines, les lectines ou les annexines, sont aussi relevés dans la littérature mais sans plus d'investigations avec les Pcs [67].

22. L'internalisation photochimique : PCI

221. Principe

L'internalisation photochimique (*photochemical internalization* ou PCI) est une technique unique qui permet la délivrance de différents types de molécules imperméables aux membranes cellulaires dans le cytosol de cellules ciblées. Le principe repose sur le relargage induit photochimiquement de macromolécules à partir d'endosomes ou de lysosomes dans le cytosol.

Nous avons vu qu'un photosensibilisant sous l'action d'une irradiation lumineuse peut lyser les membranes cellulaires. Ainsi, différents types de photosensibilisants présents dans les membranes de lysosome ou d'endosome peuvent, sous l'action de la lumière, lyser ces membranes et permettre le relargage de macromolécules (fig.45).

La PCI est applicable partout où une irradiation lumineuse est envisageable, limitant pour le moment son application aux organes les plus superficiels. Les progrès dans les lasers et les

technologies associant les fibres optiques peuvent rendre cette technique utilisable dans le futur pour des organes internes. La PCI nécessite une dose de lumière plus faible par rapport à la PDT pour ne pas obtenir l'effet cytotoxique du PS [77].

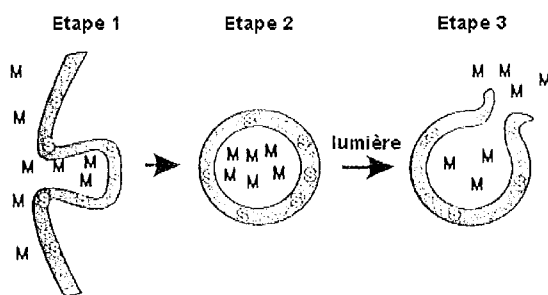


Figure 45 : principe de l'internalisation photochimique [76]

Etape 1 : endocytose du PS (S) et la molécule choisie (M),

Etape 2 : la molécule M se retrouve dans la vésicule et la paroi est photosensibilisée,

Etape 3 : après exposition lumineuse, on observe une rupture des membranes des vésicules sans endommager le contenu des vésicules qui est alors relargué dans le cytosol.

Les avantages de la PCI sont multiples :

- pas de limitation due à la taille des macromolécules tant que ces molécules peuvent être « endocytées »,
- ne dépend pas de la prolifération cellulaire,
- action spécifique sur les sites exposés à la lumière,
- non oncogénique.

L'AlPcS_{2a} est un bon candidat comme photosensibilisant pour la PCI *in vivo* du fait de son incorporation dans les membranes, de sa stabilité et de sa capacité à absorber dans le rouge lointain. Cependant, pour les essais *in vitro*, le photosensibilisant utilisé est principalement la méso-tétraphénylporphyrine disulfonate dont la longueur d'onde optimale d'excitation est de 415-420 nm [78].

Actuellement, la PCI ne fait l'objet que de modèles précliniques testés *in vitro* et *in vivo* [79] ; il n'y a pas d'essais cliniques en cours.

222. Perspectives d'utilisation

2221. Association AlPcS_{2a} et gélonine

La gélonine est une protéine qui inactive irréversiblement les ribosomes des cellules eucaryotes (*Ribosome-Inactivating Proteins* ou RIPs). Ces RIPs sont très cytotoxiques, une

seule molécule entraîne la mort cellulaire, leur conférant ainsi un avenir potentiel dans le traitement des cancers. La difficulté dans l'utilisation de ces protéines réside dans leur pénétration cellulaire, et notamment au sein du cytosol. Ce transfert s'avère cependant possible par PCI.

Des essais *in vivo* réalisés sur des cellules cancéreuses humaines greffées dans des souris ont montré l'utilisation de AlPcS_{2a} pour la PCI. Sa capacité à induire photochimiquement l'internalisation de la gélonine injectée dans la tumeur est démontrée par un retard de croissance et l'éradication totale de celle-ci dans 2/3 des cas. Des études *in vitro* ont montré préalablement que AlPcS_{2a} est localisée préférentiellement dans les vésicules d'endocytose et les lysosomes. On constate aussi que l'utilisation de la gélonine, sans administration de photosensibilisant, entraîne une réponse inflammatoire au niveau de la tumeur sans aucun effet sur la croissance de la tumeur.

L'utilisation de molécules telles que la gélonine requiert une certaine spécificité pour les cellules tumorales afin de protéger les tissus sains. Les photosensibilisants ainsi utilisés ont une affinité accrue pour les tissus tumoraux (trois fois plus grande que pour les tissus sains), et cette sélectivité est aussi accrue par l'utilisation d'une irradiation lumineuse ciblée. La régénération complète de la peau couvrant la tumeur des souris lors des essais *in vivo* montre tout d'abord la haute spécificité de AlPcS_{2a} pour les tissus tumoraux, mais aussi que les quantités de gélonine et de AlPcS_{2a} sont trop faibles pour induire des lésions irréversibles. Les essais réalisés avec la PCI et la gélonine ont été comparés avec une PDT utilisant le même PS (AlPcS_{2a}). Les résultats par PDT montrent un recul de croissance des tumeurs mais aucune éradication de celles-ci [77].

La PCI a cependant ses limites comme par exemple la localisation cellulaire du PS. En effet, sur certaines lignées cellulaires et notamment les cellules humaines d'ostéosarcomes OHS, les PS comme les ZnPcs ne sont pas localisés principalement au niveau lysosomal et sont alors incapables d'induire la PCI et donc l'action de la gélonine [76].

2222. Stimulation de lymphocytes T cytotoxiques

Certains peptides, qui agissent comme antigènes, peuvent stimuler l'action des lymphocytes T cytotoxiques, afin d'induire une réponse immunitaire dirigée vers les cellules cancéreuses. Pour activer ces lymphocytes, ces peptides doivent pénétrer dans le cytosol des cellules

présentant l'antigène. La PCI peut répondre à cette nécessité. Des essais, réalisés sur des fibroblastes de souris BL2-6-E6, montrent l'intérêt de l'AlPcS_{2a} sur le relargage d'un peptide fluorescent dans le cytosol de ces cellules [76].

2223. Thérapie génique

La délivrance d'un acide nucléique dans noyau cellulaire constitue le challenge de la réussite d'une thérapie génique. L'un des problèmes majeurs de l'utilisation de liposomes pour transférer ces acides nucléiques, est qu'une large partie de ces acides nucléiques reste retenue dans des vésicules intracellulaires, incapable d'atteindre le compartiment nucléaire.

La transfection d'un gène sur des cellules de mélanome humain THX passe de 1% sans traitement lumineux à 50% à l'aide de AlPcS_{2a} après 5 minutes d'exposition lumineuse [76].

Une autre application de la PCI en thérapie génique vise à réintroduire le gène p53 « sauvage » au sein des cellules cancéreuses. Ce gène est en effet généralement muté dans les cellules des cancers épidermoïdes de la tête et du cou, ainsi que dans les cellules de cancer pancréatique. Le gène p53 « sauvage », lorsqu'il est introduit dans ces cellules, permet une induction de l'apoptose entraînant une régression des tumeurs [80,81]. Des résultats *in vivo* confirment ces observations à l'aide d'une PCI de gène p53 associée à de la polyéthylénimine glucosylée, en utilisant l'AlPcS_{2a} comme PS [78].

23. La thérapie de capture de neutron de bore : BNCT

231. Principe

La thérapie de capture de neutron de bore (BNCT ou *Boron Neutron Capture Therapy*) est une thérapie proche de la PDT, en cours de recherche pour le traitement de certains types de tumeurs malignes. Cette méthode repose sur l'association de deux facteurs, un photo ou radio sensibilisant, et une irradiation externe. La BNCT est basée sur l'interaction d'un noyau non radioactif ¹⁰B et d'un neutron thermique (neutron de faible énergie). L'objectif est d'administrer un sensibilisant qui cible de préférence les cellules malignes et qui contient un ¹⁰B, et d'irradier la zone déterminée par un neutron thermique afin de générer un ¹¹B [18]. Ce ¹¹B se décompose par un fort transfert d'énergie en une particule α (⁴He²⁺) et un ion lithium (⁷Li³⁺). Ces particules fournissent une grande quantité d'énergie (~ 2,3 MeV) dans un

périmètre d'environ 10 μm (ce qui correspond au diamètre moyen d'une cellule) produisant des dommages cellulaires par ionisation. Le succès de la BNCT dépend donc de la sélectivité pour la tumeur du sensibilisant qui porte le bore, ainsi que de la concentration intracellulaire atteinte en ^{10}B . On rapporte que la concentration minimale effective en ^{10}B est de 20-30 μg par gramme de tissu [82].

Jusqu'à présent, des acides aminés comme la phénylalanine ou l'arginine étaient utilisés pour délivrer le bore aux cellules tumorales. Ces cellules consomment, compte tenu de leur prolifération, de grandes quantités d'acides aminés nécessaires à la synthèse des protéines. Néanmoins, leur faible ciblage cellulaire porte la recherche vers de nouvelles molécules comme les phtalocyanines, qui s'accumulent en grande quantité dans les cellules et présentent une sélectivité accrue pour les tumeurs. Les perspectives ainsi offertes sont d'utiliser les Pcs afin de développer de nouveaux radiosensibilisants pour la BNCT, mais aussi de tester la possibilité d'utiliser ces produits dans une thérapie combinée associant PDT et BNCT [18].

232. Synthèse de phtalocyanine borée

Deux stratégies peuvent être utilisées pour l'obtention de Pc borée :

- attacher la cage de carborane sur un phtalonitrile,
- attacher ce groupe sur une fonction réactive d'une Pc existante.

Même si la seconde méthode semble plus attractive, des problèmes de solubilité rendent la première méthode préférable. Un groupe protecteur permettant la solubilisation du phtalonitrile est utilisé pendant la synthèse, et est retiré à la fin [83]. La synthèse de ZnPcs liées à 4 cages carboranes aboutit à des Pcs contenant 28% de bore en masse, et sont utilisables en thérapie combinée (fig.46).

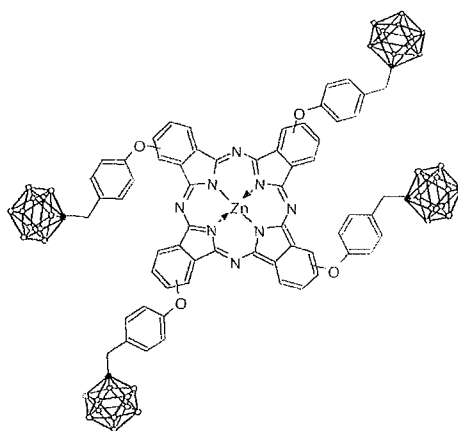


Figure 46 : métallophthalocyanine de zinc liée à 4 cages carboranes [82]

Le manque de solubilité dans l'eau des Pcs contenant des carboranes est un inconvénient pour leur utilisation future *in vivo*, qui devra être contourné par leur incorporation dans des liposomes [82]. Une certaine solubilité du produit final peut être obtenue par la présence de carboxylates sous forme de sels de sodium [83].

233. Propriétés

L'introduction d'un borocaptate (mercapto-undécahydro-closo-dodécaborate) sur une ZnPc n'introduit pas de changements majeurs sur les propriétés photophysiques de la phtalocyanine. On n'observe pas de variation du rendement quantique de génération d'oxygène singulet, ni des capacités oxydatives de ces molécules [18].

234. Perspectives

Les Pcs borées se révèlent être des photosensibilisants du même niveau d'efficacité que leurs homologues sans bore, laissant entrevoir une utilisation conjuguée en PDT et BNCT. La quantité de bore délivrée par les phtalocyanines lors d'études *in vivo* est estimée aux alentours de 10-20 µg par gramme de protéines (dose nécessaire pour induire une réponse efficace de la BNCT). Dans le cadre d'une utilisation combinée, il semble que la PDT puisse prendre place après la BNCT. En effet, les phtalocyanines ne sont pas dégradées par l'action des neutrons thermiques [18].

La BNCT a été testée sur des tumeurs cérébrales et plus particulièrement sur les glioblastomes cérébraux très radiorésistants.

24. Stratégies de ciblage par action extérieure

241. Liposomes magnétiques

Les liposomes magnétiques contiennent des particules ferromagnétiques de taille inférieure au micron, soit dans leur bicouche lipidique, soit dans le compartiment aqueux. Ce système permet de guider les substances actives jusqu'aux organes cibles en limitant les doses utilisées, et permet aussi un relargage prolongé et graduel du médicament. Ce guidage est réalisé par un aimant électromagnétique placé à la surface de la tumeur.

Cette technique a été testée sur 2 Pcs métalliques utilisées en PDT : PHOTONSENSE (AlPcS_n) et TERAPHTHAL (octa 4,5 carboxy métallophtalocyanine de cobalt). TERAPHTHAL (fig.47) est un photosensibilisant dont l'action nécessite la présence d'acide ascorbique comme catalyseur. La CoPc peut être par nature ferromagnétique et peut donc augmenter les propriétés magnétiques des liposomes.

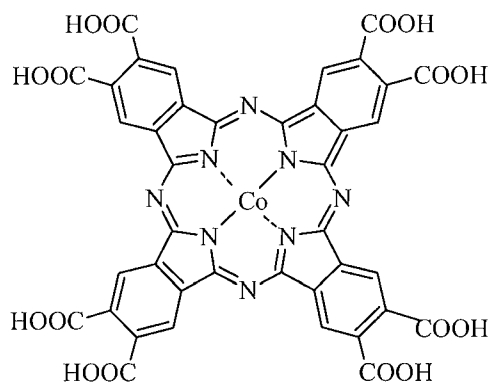


Figure 47 : TERAPHTHAL, octa 4,5 carboxy métallophtalocyanine de cobalt

Les liposomes sont injectés dans une artère locale à proximité de la tumeur et un champ magnétique est appliqué au niveau de la tumeur. Cette technique utilisée *in vivo* montre que l'on obtient une concentration intratumorale de PHOTONSENSE presque 3 fois supérieure à celle obtenue en utilisant des liposomes non magnétiques. L'administration conjointe de TERAPHTHAL à 0,5 mg/Kg et d'acide ascorbique sur des souris conduit à une nécrose de la tumeur à 95%.

Les études menées par Kuznetsov et al. montrent que ces liposomes magnétiques peuvent être utilisés avec succès pour cibler des Pcs vers les tissus cancéreux [84].

242. Hyperthermie

L'hyperthermie consiste à élever la température d'un tissu tumoral ciblé à 40-43°C, car on observe au-delà de 41-42°C, une mort cellulaire directe. Elle est utilisée en complément d'autres traitements anticancéreux. La réponse à cette thérapie dépend du micro-environnement des cellules visées (pH...). Cette technique vise les membranes, le cytosquelette, ou la capacité de l'ADN à se réparer. D'autres mécanismes comme l'apoptose, le cycle cellulaire ou l'expression de différents gènes, sont modulés par la température, ainsi

que l'action des *natural killer* ou des cytokines. De plus, l'augmentation de la température conduit à une augmentation de la perfusion en O₂, ce qui représente un intérêt en PDT [85].

Les fluides magnétiques biocompatibles sont prometteurs dans cet objectif, leur activité étant essentiellement basée sur une hyperthermie locale des tissus biologiques, induit par un champ magnétique alternatif externe. L'association de ZnPc avec un fluide magnétique du type magnétite (Fe₃O₄) solubilisée dans le dichlorométhane (utilisée *in vitro*) permet de combiner l'action de la PDT et de l'hyperthermie, afin de traiter les tumeurs avec des concentrations minimales en molécules chimiques [86].

Cette association ne modifie pas les propriétés de ZnPc, la même photoactivité est observée en présence ou en absence de fluide magnétique. Des essais *in vitro* et *in vivo* sont actuellement en cours.

243. Electroporation

Une application d'intenses décharges électriques (plusieurs kilovolts par centimètre) pendant quelques micro ou milli secondes entraîne une perméabilité transitoire des membranes cellulaires. Cette technique appelée électroporation est utilisée pour délivrer des molécules ou des gènes dans les cellules. En thérapie oncologique, la première combinaison de l'électroporation avec une chimiothérapie utilisant la bléomycine a été rapportée par Okino et Mohrri en 1987, et a montré de bons résultats [87].

L'électroporation permet au PS d'atteindre les couches les plus profondes de la tumeur, et permet aussi aux PS les plus hydrophobes de pénétrer plus facilement des cellules tumorales. L'électroporation des tumeurs ne semble pas toucher les tissus sains, n'entraînant pas d'effets systémiques. L'utilisation de l'électroporation permet d'atteindre les mêmes concentrations de PS dans les tumeurs en administrant de plus faibles quantités de PS du fait d'une perméabilité cellulaire accrue, réduisant ainsi tous les effets secondaires du PS.

L'association de l'électroporation avec une PDT à AlPcS₄ a été réalisée *in vivo* sur des souris, et donnent des résultats prometteurs [87].

25. Photodiagnostic

Le photodiagnostic utilise la fluorescence des PS. Les propriétés de fluorescence des PS peuvent être utilisées pour différencier les tissus bénins des tissus malins, comme aide au diagnostic, mais aussi en « biopsie optique », remplaçant alors une évaluation histologique. La fluorescence peut aussi être utile comme outil d'évaluation de l'efficacité et de la réussite de la PDT avant et après traitement, ainsi que comme dosimètre durant la thérapie. Il reste cependant à noter que plus un PS sera fluorescent, moins il sera efficace en PDT [16]. Les principaux PS utilisés comme agents de photodiagnostic sont les esters d'acide aminolévulinique ou l'hypéricine.

L'utilisation de Pcs, ainsi que de leurs dérivés substitués par un groupe méso-phényl permet le diagnostic de tumeur, compte tenu de leur accumulation préférentielle dans ces tissus [88]. La fluorescence n'est pas la même entre les cellules saines et les cellules malignes, marquant ainsi la perturbation cellulaire [89]. Peu de données sont disponibles sur l'utilisation des Pcs comme agents de diagnostic. L'utilisation de AlPcS₄ qui s'accumule sélectivement dans les cellules cancéreuses de vessie, pourrait permettre le photodiagnostic et un guidage fluorescent transurétrale de résection des lésions avec une grande sensibilité et une grande sélectivité [47]. Cependant, dans les lysosomes, les Pcs sont dans un environnement acide, en grande concentration et sans doute liées à des protéines. Ces facteurs conduisent à une réduction du rendement quantique de fluorescence (Φ_f). Néanmoins, l'AlPcS₄ est insensible à une variation de pH comprise entre 5,0 et 7,3, mais Φ_f est réduit de 40% en cas de liaison à l'albumine humaine [44]. On notera aussi que le faible rendement quantique de fluorescence des ZnPcs fait de celles-ci de mauvais agents de photodiagnostic [15].

SYNTHESE D'UNE METALLOPHTALOCYANINE DE ZINC VECTORISABLE POUR DES APPLICATIONS EN THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

31. Introduction

Ce travail s'inscrit dans le cadre d'un projet de fin d'étude réalisé à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques (ENSIC, Nancy) au Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR). Une partie de la recherche menée au sein de ce département concerne le développement de nouveaux photosensibilisants pour la thérapie photodynamique. Les composés actuellement étudiés sont les porphyrines et les chlorines couplées à un vecteur, capables de reconnaissance cellulaire et/ou d'affinité vis-à-vis de certains organites.

En vue d'améliorer les propriétés photophysiques du photosensibilisant, une voie de développement passe par la synthèse et l'étude des phtalocyanines. A plus longue échéance, ce projet se poursuivra par un couplage de la phtalocyanine à un vecteur biologique, et par une démarche plus large de screening en étudiant la spécificité vis-à-vis de certains récepteurs cellulaires.

Ainsi, nous nous intéresserons dans cette partie à la synthèse et à l'étude photophysique de la 2-(4-carboxyphénoxy) métallophtalocyanine de zinc fonctionnalisée par une fonction carboxylique (fig.48), facilitant par la suite le greffage à un vecteur. Ce travail s'articule donc autour de la synthèse, la purification, l'identification ainsi que la détermination des paramètres photophysiques de la molécule désirée.

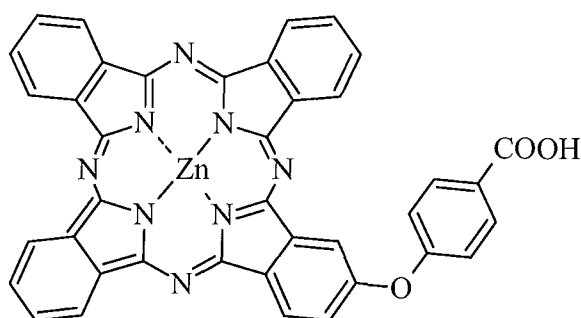


Figure 48 : 2-(4-carboxyphénoxy) métallophtalocyanine de zinc, M = 713,61 g/mol

32. Matériel et méthodes

321. Méthode de synthèse

3211. Schéma global

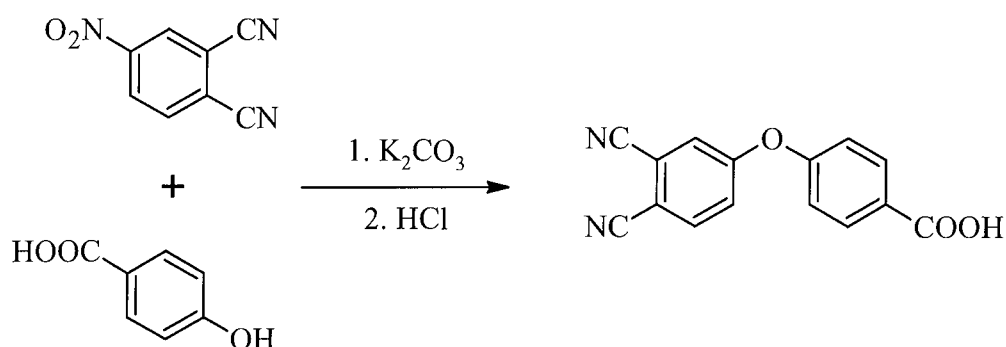
Cette synthèse de phtalocyanine monofonctionnelle se fait par tétramérisation statistique de l'acide 4-(3,4-dicyanophénoxy)benzoïque avec du 1,2 dicyanobenzène, catalysée par de l'alkoxyde de lithium. Elle a été développée par Kliesch et al. [90].

On préfère cette méthode à d'autres méthodes qui pourraient conduire directement aux ZnPcs, comme la réaction dans le pentanol avec un sel de zinc catalysée par le DBU, ou la réaction dans un tube scellé en présence d'urée ou de sels de métal, car les dinitriles polaires ne réagissent pas suffisamment dans ces conditions.

Dans notre cas, les composés sont obtenus dans de bons rendements par la réaction de dinitriles dans le pentanol, sous azote, avec du lithium. La Pc obtenue sans métal est alors traitée par de l'acétate de zinc dans la DMF. Les différentes expériences menées ont conduit au meilleur rendement d'obtention de la Pc monofonctionnelle avec un ratio de 1:1,5 des deux 1,2-benzènedicarbonitriles utilisés [90].

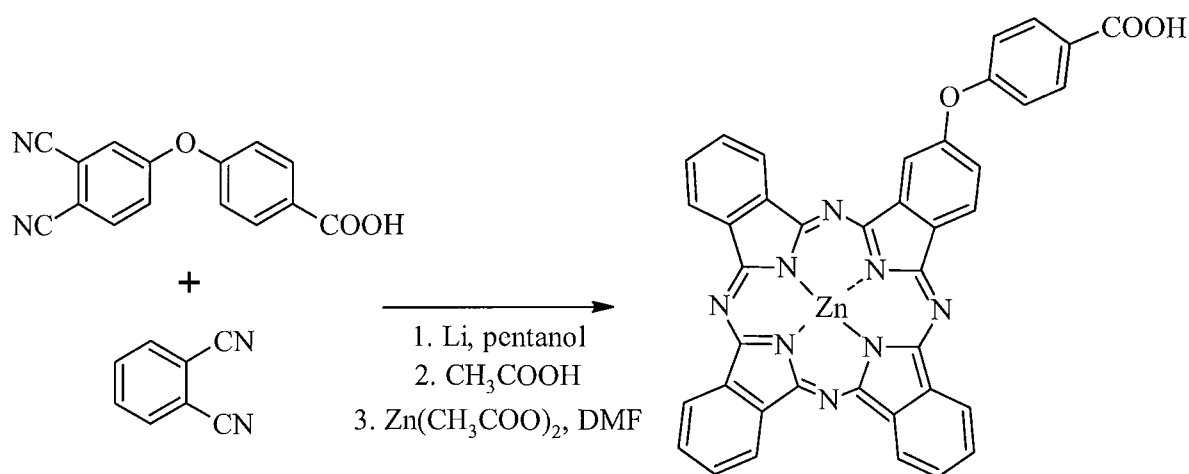
3212. Synthèse de l'acide 4-(3,4-dicyanophénoxy)benzoïque

On suspend 25 mmol de K_2CO_3 anhydre dans 30 mL de DMSO anhydre sous atmosphère inerte (N_2). On ajoute ensuite 17,1 mmol d'acide hydroxybenzoïque ainsi que 11,5 mmol de 4-nitrophtalonitrile. Au bout de 4 heures, puis de nouveau après 24 heures, on ajoute à la solution 25 mmol de K_2CO_3 . Cette suspension est maintenue sous agitation, et sous N_2 à température ambiante pendant 5 jours. Le précipité est alors dissous dans 600 mL d'eau, et le pH est ajusté à 1 avec de l'acide chlorhydrique. Le produit est purifié par recristallisation dans le méthanol, puis filtré sur fritté.



3213. Synthèse de la 2-(4-carboxyphénoxy) phtalocyanine de zinc

On mélange 0,72 mmol de l'acide 4-(3,4-dicyanophénoxy)benzoïque avec 1,08 mmol de 1,2 dicyanobenzène dans 10 mL de pentanol fraîchement distillé, puis le tout est mis à 140°C sous reflux, atmosphère inerte (N₂) et agitation. A partir de cette étape, le ballon doit être protégé de la lumière. On ajoute alors 14 mmol de lithium, puis le chauffage est poursuivi pendant 15 minutes. La solution est refroidie à température ambiante avant d'ajouter 30 mL d'acide acétique glacial. Le précipité obtenu est lavé à l'eau, puis séché à l'étuve. Il est alors dissous dans la DMF avec 5 équivalents d'acétate de zinc dihydraté, puis chauffé à reflux à 80°C pendant 12 heures. La DMF est ensuite évaporée, et le résidu est lavé à l'eau.



3214. Méthode de purification

La méthode de synthèse retenue conduit à l'obtention de phtalocyanines non substituée, mono- ou poly-substituée. Il convient donc de séparer ces différentes fractions. Les phtalocyanines portant un seul substituant apolaire sont difficilement séparables par chromatographie car leur agrégation conduit à la formation de dimères ou d'oligomères.

Dans notre cas, la séparation est possible par colonne chromatographique de gel de silice (Si 60) avec un éluant composé d'éther/DMF. L'utilisation d'éther seul conduit à l'obtention des composés les plus substitués (composés tétrasubstitués ou plus). En augmentant la concentration de DMF, les autres composés sont obtenus [90].

Pour éliminer la première fraction, on utilise donc un mélange éther/DMF à 98/2, puis ce rapport est graduellement modifié jusqu'à l'utilisation de DMF pure afin de récupérer tous les produits solubles [90]. La fraction recherchée monosubstituée semble sortir pour une concentration en DMF de 15-20%.

Une fois récupérée, cette fraction est précipitée et recristallisée dans un mélange dichlorométhane/hexane.

322. Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence, spectre RMN

Les spectres d'absorption sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin Elmer EZ 210 (Lambda 2, Courtaboeuf, France).

Les spectres d'émission de fluorescence sont obtenus avec un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog 3 (Jobin Yvon, Longjumeau, France), à double monochromateur et double réseau à l'émission et à l'excitation. Le détecteur est un photomultiplicateur à comptage de photons Hamamatsu de type R928.

Le spectre d'absorption biphotonique est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre à double faisceau Jasco V-570. Les sections efficaces d'absorption à deux photons ont été déterminées en mesurant la fluorescence induite par excitation multiphotonique par rapport à une référence (10^{-4} M de fluorescéine dans 0,01 M de NaOH). La source d'excitation est un laser titane-saphir fonctionnant en régime impulsif femtoseconde (durée de l'impulsion 150 fs, cadence 76 MHz). Les longueurs d'onde utilisées se situent entre 800-920 nm, et la puissance d'excitation est généralement inférieure à 30 mW. Le faisceau laser est focalisé par un objectif de microscope (10x, NA 0,22) dans la cuve contenant la solution. Le même objectif recueille la fluorescence générée ("epi-fluorescence") et un miroir dichroïque (Chroma 780dextruv, réfléchissant pour les longueurs d'onde inférieures à 780 nm) dirige la fluorescence vers le détecteur. Un filtre d'émission (Chroma e750sp-2p) enlève les résidus de la lumière excitatrice. La fluorescence est injectée dans le spectromètre CCD (BW-TEK BT112E) par une lentille achromatique.

Le spectre RMN est réalisé sur un spectromètre Avance Bruker 300 MHz. Les déplacements chimiques δ sont donnés en prenant le tétraméthylsilane (TMS) comme référence à 0 ppm.

323. Coefficients d'extinction molaire

On réalise une série de 5 échantillons de concentration croissante en phtalocyanine dans l'éthanol à partir de la solution mère de 1 mg/mL dans le DMSO.

L'absorption maximale de chaque pic est déterminée par spectrophotométrie. Le coefficient d'extinction molaire ε est donné par la loi de Beer Lambert : $A = \varepsilon.C.l$ (avec $l =$ longueur de la cuve = 1 cm, et C la concentration en mol/L).

324. Rendement quantique de fluorescence

Afin de déterminer ce rendement quantique de fluorescence, on utilise une relation empirique à l'aide des propriétés d'une référence :

$$\Phi_f = \Phi_{f,ref} \frac{DO_{ref}}{DO} \frac{I}{I_{ref}} \left(\frac{re}{re_{ref}} \right)^2$$

Avec :

- Φ_f : rendement quantique de fluorescence,
- DO : densité optique à la longueur d'onde d'excitation λ_{exc} retenue et commune aux 2 échantillons,
- I : surface sous la courbe de fluorescence à une excitation λ_{exc} commune aux 2 échantillons,
- re : indice de réfraction des solvants.

La référence utilisée est la tétraphénylchlorine monocarboxylique ($\Phi_{f,ref} = 18\%$ dans l'éthanol). La Pc comme la référence seront solubilisées dans l'éthanol d'indice de réfraction $re = 1,3611$. La longueur d'onde d'excitation, commune aux deux molécules, est $\lambda_{exc} = 400$ nm, fentes de 2 nm.

325. Production d'oxygène singulet

Le matériel utilisé est un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog 3 (Jobin Yvon, Longjumeau, France), à double monochromateur et double réseau à l'émission et à l'excitation. Le détecteur est un EOS InGaAs refroidi à l'azote liquide. Le principe de cette détermination repose sur l'émission de lumière de l'oxygène singulet lorsque celui-ci est excité à une longueur d'onde *ad hoc*.

On peut, à partir du spectre d'émission de l'oxygène singulet, déterminer le rendement quantique de formation d'oxygène singulet à l'aide d'une référence. La longueur d'onde d'excitation est $\lambda_{exc} = 418$ nm, fentes à l'excitation et à l'émission de 5 nm.

Le rendement quantique de formation d'oxygène singlet est donné par la relation suivante, valable si la molécule de référence et la Pc sont étudiées dans le même solvant :

$$\Phi_v = \Phi_{v,ref} \frac{DO_{ref}}{DO} \frac{I}{I_{ref}}$$

Les valeurs des différents paramètres sont rassemblées dans le tableau 4.

Tableau 4 : paramètres utilisés pour déterminer le rendement quantique de formation d'oxygène singlet

| | Référence : Tétraphényl porphyrine | Phtalocyanine étudiée |
|--|---|-----------------------|
| Solvant | Chloroforme | Chloroforme |
| Densité optique à λ_{exc} | 0,188 | 0,043 |
| Intensité de l'émission de l'oxygène singlet | $1,46 \cdot 10^{-2}$ | $0,31 \cdot 10^{-2}$ |
| Rendement quantique de formation d'oxygène singlet | $\Phi_{v,ref} = 0,55$ dans le chloroforme | |

33. Résultats et discussion

Nous présentons dans ce chapitre les résultats obtenus à la suite de nos expériences. Nous avons essayé de comparer ces résultats à une Pc de référence (fig.49), quelque peu différente de notre Pc [90]. En effet, nous n'avons pas trouvé d'éléments de comparaison disponibles avec une Pc plus semblable à celle synthétisée. On peut alors s'attendre à quelques différences dans les résultats obtenus.

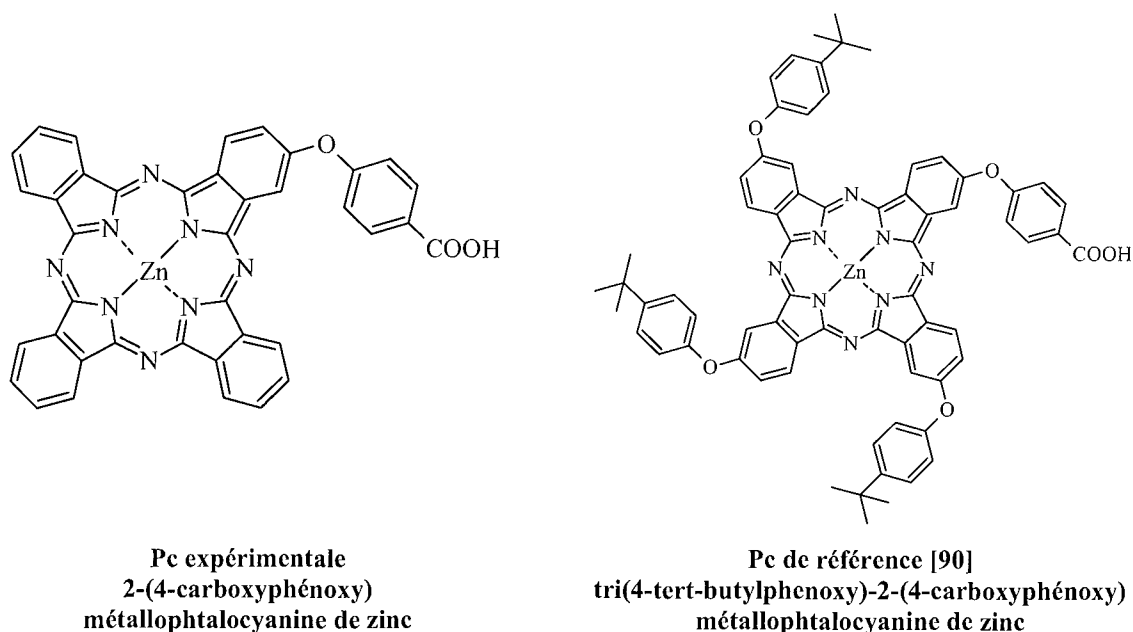


Figure 49 : schémas de la Pc expérimentale et de la Pc de référence utilisée

331. Synthèse et purification

Nous avons, au cours de cette étude, répété trois fois la synthèse globale de la 2-(4-carboxyphénoxy) métallophthalocyanine de zinc. Nous avons obtenu, en moyenne, un rendement global aux alentours de 1,2%, qui se décompose avec un rendement de 84% pour la première étape (synthèse de l'acide 4-(3-4) dicyanophénoxybenzoïque) et 1,4% pour la cyclisation en Pc. Nous pouvons comparer ces résultats aux valeurs publiées pour la synthèse de la molécule de référence [90]. La première étape est obtenue avec un rendement de 95%, et le rendement global varie de 11 à 20%, soit un rendement de 10 à 15 fois supérieur à celui de notre expérience. Même si des efforts dans la réalisation de la synthèse peuvent sûrement être apportés afin d'améliorer ces résultats, il doit être mentionné qu'une attention toute particulière doit être portée à la méthode de purification qui entraîne sans doute des pertes de produits. Un regard plus critique peut aussi être porté sur les résultats publiés.

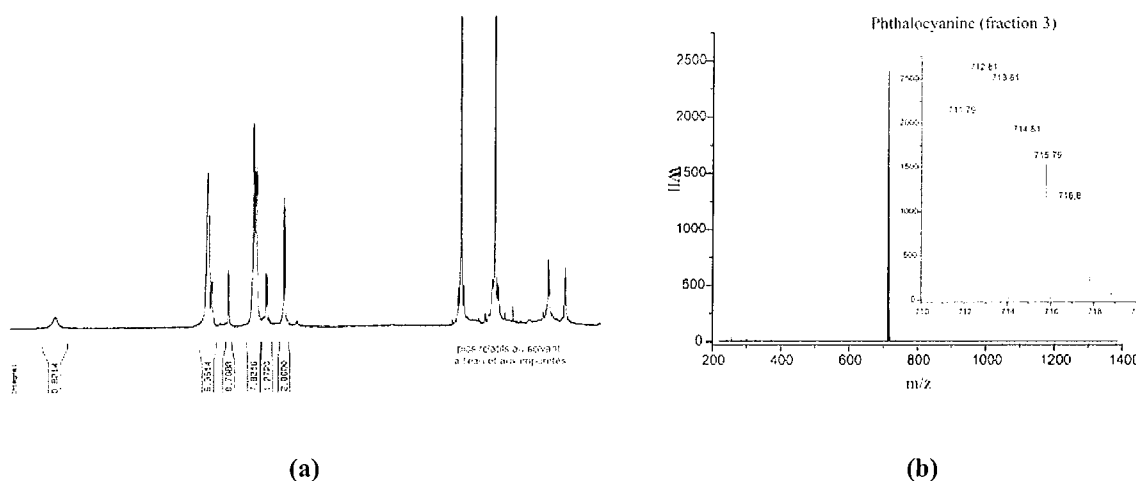


Figure 50 : (a) spectre de ¹H RMN et (b) spectre de masse de la 2-(4-carboxyphénoxy) métallophthalocyanine de zinc

L'identité, ainsi que la pureté, de notre composé sont confirmées par le spectre ¹H RMN (DMSO) δ : 7,46-9,28 (m, aromatique) ; 13 (s, COOH) (fig.50a), ainsi que par le spectre de masse obtenu par MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionisation – time of flight*). Nous observons une distribution isotopique relatif au composé à $m/z = 712,82$ et au composé protoné $[M+H]^+$ à $m/z = 713,81$ (fig.50b), pour une masse calculée de 713,61.

La séparation sur colonne chromatographique permet donc d'obtenir les produits recherchés avec une pureté satisfaisante, mais n'apparaît pas comme la méthode optimale. Il a souvent

été nécessaire de répéter 2 ou 3 fois ces purifications sur colonne afin d'isoler les différentes fractions, occasionnant ainsi des pertes de produits et une consommation de temps non négligeable. Par ailleurs, le choix de l'éluant, composé majoritairement d'éther éthylique, n'est pas, d'un point de vue confort d'utilisation, le plus approprié pour l'expérimentateur.

Le développement d'une méthode associant une pré-séparation par colonne de silice et une séparation sur HPLC préparative pourrait être envisagé.

332. Propriétés photophysiques

Le spectre d'absorption (fig.51a) est réalisé sur une solution de phtalocyanine préalablement solubilisée à 1 mg/mL dans le DMSO. On peut noter 3 pics caractéristiques (tab.5).

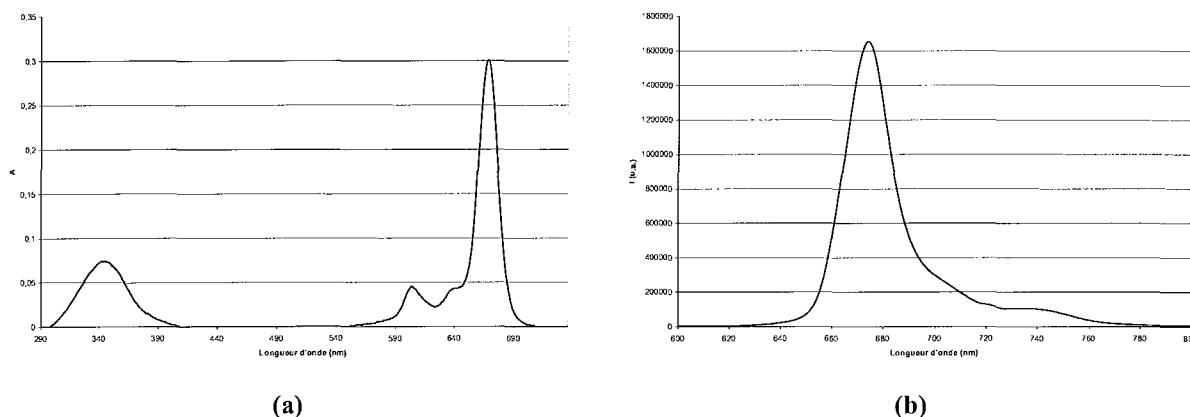
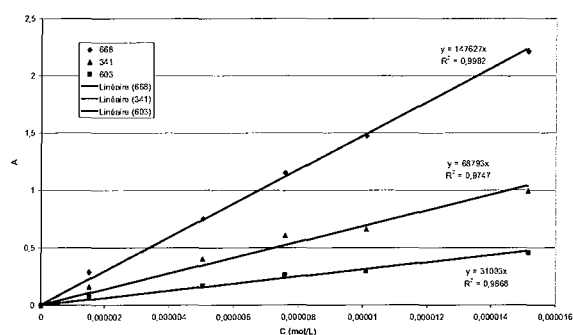


Figure 51 : spectres dans l'éthanol (a) d'absorption et (b) d'émission de fluorescence

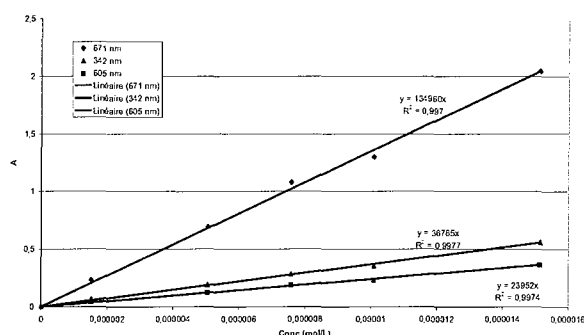
Tableau 5 : comparaison des bandes d'absorption relevées à celles de la référence

| | Résultats expérimentaux (éthanol) | Résultats expérimentaux (DMF) | Référence (DMF) [90] |
|----------------|--------------------------------------|----------------------------------|----------------------|
| Bande de Soret | 341 nm | 342 nm | 355 nm |
| Bandes Q | 603 nm | 605 nm | 610 nm |
| | 668 nm | 671 nm | 675 nm |

Nous avons déterminé les coefficients d'extinction molaire en mesurant l'absorption de solution en concentration croissante de Pc (fig.52). Les valeurs des coefficients d'extinction molaire calculés sont alors comparées aux valeurs publiées pour la référence précédemment définie (tab.6).



dans l'éthanol



dans la DMF

Figure 52 : absorption en fonction de la concentration en ZnPc

Tableau 6 : comparaison des coefficients d'extinction molaire aux valeurs relevées pour la référence

| Coefficient d'extinction molaire ($M^{-1}.cm^{-1}$) | | | | | |
|---|--------|-------------------------------|--------|----------------------|--------|
| Résultats expérimentaux (éthanol) | | Résultats expérimentaux (DMF) | | Référence (DMF) [90] | |
| ϵ_{668} | 147627 | ϵ_{671} | 134960 | ϵ_{675} | 185000 |
| ϵ_{603} | 31003 | ϵ_{605} | 23952 | ϵ_{610} | 34000 |
| ϵ_{341} | 68793 | ϵ_{342} | 36765 | ϵ_{355} | 67000 |

Le spectre d'émission de fluorescence (fig.51b) est réalisé à une concentration en phtalocyanine de $3,33.10^{-3}$ mg/mL dans de l'éthanol. L'excitation a lieu à 360 nm. Le maximum de fluorescence est observé à 674 nm. Nous avons déterminé le rendement quantique de fluorescence dans l'éthanol de la Pc étudiée, $\Phi_f = 12\%$.

La ZnPc synthétisée possède donc une forte absorption aux alentours de 670 nm, et un faible rendement quantique de fluorescence. La perte d'énergie par fluorescence, après excitation lumineuse, est donc limitée et le retour à l'état fondamental se fait préférentiellement par le passage *via* l'état triplet excité. Ces différentes propriétés répondent aux caractéristiques d'un bon candidat pour une utilisation en PDT.

333. Spectre d'absorption biphotonique

L'excitation biphotonique consiste à exciter un fluorochrome par deux photons simultanément. Cette excitation nécessite une densité de photons très élevée, d'où l'utilisation de lasers dits pulsés. Elle possède plusieurs avantages sur les techniques classiques de fluorescence à un photon, qui rendent son utilisation intéressante pour l'imagerie biologique. En effet, une des applications majeures de l'excitation biphotonique est la microscopie de fluorescence biphotonique, cellulaire et tissulaire. Le caractère non linéaire du processus

d'absorption à deux photons localise strictement l'excitation de la fluorescence ainsi que les photodommages au point de plus grande focalisation du faisceau (environ $1 \mu\text{m}^3$), ce qui présente différents avantages [91,annexe1-2] :

- une minimisation de la photodestruction des échantillons biologiques pendant des observations prolongées,
- une imagerie de couches plus profondes et d'échantillons épais du fait d'une excitation lumineuse proche de l'infrarouge (800-1000 nm),
- une parfaite séparation des longueurs d'onde d'excitation et d'émission permettant ainsi de s'affranchir du bruit issu de la lumière diffusée par l'échantillon, proche de la longueur d'onde d'excitation.

Ce spectre (fig.53a) permet d'évaluer l'absorption biphotonique de notre ZnPc. Il est réalisé dans l'éthanol. Nous constatons que notre ZnPc absorbe la lumière biphotonique avec un maximum aux alentours de 840 nm, laissant entrevoir une utilisation possible des nouvelles applications biphotoniques avec cette molécule.

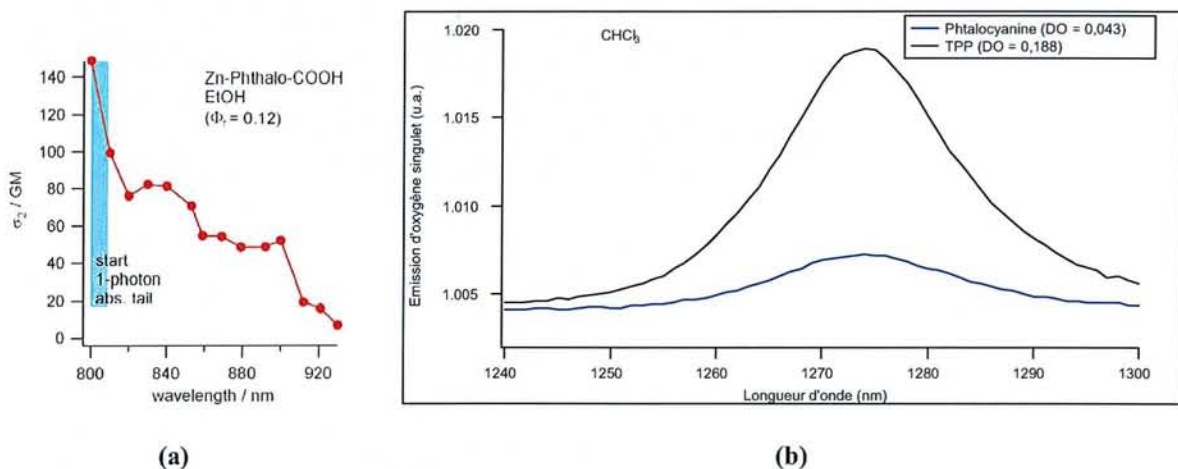


Figure 53 : spectres (a) d'absorption biphotonique de la ZnPc étudiée dans l'éthanol et (b) spectre d'émission de l'oxygène singulet

334. Production d'oxygène singulet

Comme nous avons pu le voir précédemment, l'oxygène singulet joue un rôle majeur dans l'action de la PDT par des réactions de type II. L'oxygène singulet réagit rapidement sur différents substrats et entraîne une oxydation cellulaire pour aboutir à la mort cellulaire. Selon la méthode décrite précédemment, nous avons enregistré le spectre d'émission de l'oxygène singulet pour notre ZnPc et la tétraphénylporphyrine (fig.53b) afin de déterminer le rendement

quantique de production d'oxygène singulet $\Phi_v = 51\%$ dans le chloroforme. Cette valeur est relativement bonne, proche de celle de la tétraphénylporphyrine ($\Phi_v = 55\%$ dans le chloroforme) qui est un PS connu comme bon générateur d'oxygène singulet. Cependant ces rendements restent discutables puisqu'ils sont calculés dans un solvant organique. Afin d'évaluer ce que pourrait être cette production d'oxygène singulet *in vivo*, il serait bon de calculer ce rendement dans un solvant aqueux proche du milieu biologique dans lequel sera utilisé le PS.

34. Conclusion et perspectives

Cette partie expérimentale devrait permettre d'initier une recherche plus approfondie sur la molécule synthétisée, et d'envisager un couplage à un vecteur biologique *via* la fonction carboxylique. La méthode de synthèse utilisée permet d'obtenir la molécule désirée, cependant la méthode de purification reste délicate, longue et entraîne des pertes de produit. Notre molécule présente de bonnes caractéristiques photophysiques, avec une absorption proche de la région visible du rouge (aux alentours de 670 nm) et de forts coefficients d'absorption molaire, ainsi qu'un faible rendement quantique de fluorescence. Ces paramètres sont ceux recherchés pour les PS utilisables en PDT. Cette Pc est capable de générer de l'oxygène singulet avec un bon rendement, et par ailleurs, elle absorbe en émission biphotonique, ce qui permet d'entrevoir son utilisation par des applications utilisant cette technologie.

Le couplage de la Pc pourrait être envisagé avec un vecteur du type peptide RGD (arginine-glycine-acide aspartique) ou l'acide folique. L'acide folique a été choisi comme molécule pour une tentative d'adressage tumoral des porphyrines, car le récepteur de l'acide folique (RAF) est surexprimé dans de nombreux cancers humains comme les tumeurs cérébrales ou pulmonaires, et constitue également un marqueur de choix dans le cas des cancers ovariens. L'expression du RAF est, en revanche, très limitée au niveau des tissus humains non pathologiques. L'acide folique a été couplé à la tétraphénylporphyrine monocarboxylique et conduit à une nette amélioration de la photocytotoxicité de cette molécule par comparaison au photosensibilisant non fonctionnalisé [92].

CONCLUSION

Nous avons pu, au cours de ce travail, faire le point sur les phtalocyanines et leurs applications en cancérologie. La littérature s'enrichit assez régulièrement de travaux portant sur les phtalocyanines aussi bien en vue d'applications comme photosensibilisants de 2^{de} génération, que dans le but d'une conjugaison avec un vecteur. L'intérêt pour les métallophtalocyanines d'aluminium, de zinc ou de silicium semble être équivalent, et une nette orientation vers des composés amphiphiles apparaît. On pourrait, par ailleurs, imaginer des modifications chimiques sur les phtalocyanines existantes pour en faire des composés absorbants dans le proche infrarouge.

La PDT devient un traitement reconnu, en cours de développement et qui fait ses preuves. Il est intéressant de voir que dans ce nouveau millénaire truffé de technologie, la simplicité de ce traitement trimodal semble porteur d'espoir pour le traitement des cancers. Les phtalocyanines sont des PS puissants et les premiers essais cliniques montrent un potentiel avenir prometteur en PDT, notamment à l'aide des phtalocyanines Pc4 ou PHOTONSENSE. La PDT reste néanmoins peu développée cliniquement en France et dans le reste de l'Europe (mis à part en Allemagne et en Grande Bretagne), contrairement aux Etats-Unis, au Canada, au Japon, au Brésil, à la Russie et à la Chine. De nouveaux essais cliniques avec PHOTOFRIN sont de nouveau en cours à l'hôpital Foch (Paris), mais il ne semble pas y avoir d'essais cliniques en cours avec des phtalocyanines en France [annexe1-1]. Les progrès sur les PS doivent aussi s'accompagner par des progrès technologiques visant à améliorer l'irradiation lumineuse des tissus à traiter. La PCI apparaît aussi comme une technique à poursuivre et à développer, dont les applications peuvent s'étendre au-delà de la cancérologie. Les autres techniques évoquées sont sans doute plus confidentielles, et ne font l'objet que d'une recherche limitée actuellement.

La partie expérimentale de ce travail devrait permettre d'initier une recherche plus approfondie sur la molécule synthétisée, et d'envisager un couplage à un vecteur. La méthode de synthèse utilisée permet d'obtenir la molécule désirée, même si la méthode de purification mérite une attention particulière en vue d'une amélioration. Les premiers résultats obtenus concernant les caractéristiques photophysiques de cette molécule semblent encourageants.

BIBLIOGRAPHIE

- [1]
ALLEN C.M., SHARMAN W.M., VAN LIER J.E.
Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer
J. Porphyrins Phthalocyanines, **2001**, 5, 161-169
- [2]
VISONA A., ANGELINI A., GOBBO S., BONANOME A., THIENE G., PAGNAN A., TONELLO D.,
BONANDINI E., JORI G.
Local photodynamic therapy with Zn(II)-phthalocyanine in an experimental model of intimal hyperplasia
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **2000**, 57, 94-101
- [3]
COSIMELLI B., RONCUCCI G., DEI D., FANTETTI L., FERRONI F., RICCI M., SPINELLI D.
Synthesis and antimycotic activity of new unsymmetrical substituted zinc phthalocyanines
Tetrahedron, **2003**, 59, 10025-10030
- [4]
HUANG J.-D., FONG W.-P., CHAN E.Y.M., CHOI M.T.M., CHAN W.-K., CHAN M.-C., NG D.K.P.
Photodynamic activities of a dicationic silicon(IV)phthalocyanine and its bovine serum albumin conjugates
Tetrahedron Lett., **2003**, 44, 8029-8032
- [5]
LACEY J.A., PHILLIPS D.
The photosensitisation of *Escherichia coli* using disulphonated aluminium phthalocyanine
J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **2001**, 142, 145-150
- [6]
SMETANA Z., BEN-HUR E., MENDELSON E., SALZBERG S., WAGNER N., MALIK Z.
Herpes simplex virus proteins are damaged following photodynamic inactivation with phthalocyanines
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1998**, 44, 77-83
- [7]
DE LA TORRE G., GLAESSENS C.G., TORRES T.
Phthalocyanines: The need for selective synthetic approaches
Eur. J. Org. Chem., **2000**, 2821-2830
- [8]
TORRES T.
Perspectives in the selective synthesis of phthalocyanines and related compounds
J. Porphyrins Phthalocyanines, **2000**, 4, 325-330
- [9]
CADIOU C.
Synthèse et applications de bisphthalocyanines de lutétium portant des chaînes hydrophiles et hydrophobes
Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, **2000**, 23-26, 169
- [10]
KUMAR G.A., THOMAS J., UNNIKRISHNAN N.V., NAMPOORI V.P.M., VALLABHAN C.P.G.
Optical absorption and emission spectral studies of phthalocyanine molecules in DMF
J. Porphyrins Phthalocyanines, **2001**, 5, 456-459
- [11]
DRAGER A.S., O'BRIEN D.F.
Novel synthesis of liquid crystalline phthalocyanines
J. Org. Chem., **2000**, 65, 2257-2260

- [12]
LEZNOFF S., SVIRSKAYA P., KHOUW B., CERNY R.L., SEYMOUR P., LEVER A.B.P.
The syntheses of monometallated and unsymmetrically substituted binuclear phthalocyanines and pentanuclear phthalocyanine by solution and polymer support methods
J. Org. Chem., **1991**, 56, 82-90
- [13]
NOLAN K.J.M., HU M., LEZNOFF C.C.
"Adjacent" substituted phthalocyanines
Synlett, **1997**, 5, 593-594
- [14]
SOMMERAUER M., RAGER C., HANACK M.
Separation of 2(3),9(10),16(17),23(24)-tetrasubstituted phthalocyanines with newly developed HPLC phases
J. Am. Chem. Soc., **1996**, 118, 10085-10093
- [15]
WROBEL D., BOGUTA A.
Study of the influence of substituents on spectroscopic and photoelectric properties of zinc phthalocyanines
J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **2002**, 150, 67-76
- [16]
ALLISON R.R., DOWNIE G.H., CUENCA R., HU X.-H., CHILDS C.J.H., SIBATA C.H.
Photosensitizers in clinical PDT
Photodiagn. Photodyn. Ther., **2004**, 1, 27-42
- [17]
MACDONALD I. J., DOUGHERTY T. J.
Basic principles of photodynamic therapy
J. Porphyrins Phthalocyanines, **2001**, 5, 105-129
- [18]
FABRIS C., JORI G., GIUNTINI F., RONCUCCI G.
Photosensitizing properties of a boronated phthalocyanine: studies at the molecular and cellular level
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **2001**, 64, 1-7
- [19]
URIZZI P., ALLEN C.M., LANGLOIS R., OUELLET R., LA MADELEINE C., VAN LIER J.E.
Low-density lipoprotein-bound aluminium sulfophthalocyanine: targeting tumor cells for photodynamic therapy
J. Porphyrins Phthalocyanines, **2001**, 5, 154-160
- [20]
ISHII K., TAKAYANAGI A., SHIMIZU S., ABE H., SOGAWA K., KOBAYASHI N.
In vitro photodynamic effects of phthalocyanine-silicon covalently linked to 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy radicals on cancer cells
Free Radic. Biol. Med., **2005**, 38, 920-927
- [21]
TAILLEFER J., BRASSEUR N., VAN LIER J.E., LENAERTS V., LE GARREC D., LEROUX J.-C.
In vitro and *in vivo* evaluation of pH-responsive polymeric micelles in a photodynamic cancer therapy model
J. Pharm. Pharmacol., **2001**, 53, 155-166
- [22]
FRACKOWIAK D., PLANNER A., WASZKOWIAK A., BOGUTA A., ION R.M., WIKTOROWICZ K.
Yield of intersystem (singlet-triplet) crossing in phthalocyanines evaluated on the basis of a time-resolved photothermal method
J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **2001**, 141, 101-108

- [23]
BRASSEUR N., ALI H., LANGLOIS R., WAGNER R., ROUSSEAU J., VAN LIER J.E.
Biological activities of Phthalocyanines-V. Photodynamic therapy of EMT-6 mammary tumors in mice with sulfonated phthalocyanines
Photochem. Photobiol., **1987**, 45, 585-586
- [24]
SIBATA M.N., TEDESCO A.C., MARCHETTI J.M.
Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy
Eur. J. Pharm. Sci., **2004**, 23, 131-138
- [25]
DECREAU R., RICHARD M.J., VERRANDO P., CHANON M., JULLIARD M.
Photodynamic activities of silicon phthalocyanines against achromic M6 melanoma cells and healthy human melanocytes and keratinocytes
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1999**, 48, 48-56
- [26]
DE OLIVEIRA C.A., MAHCADO A.E.H., PESSINE F.B.T.
Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy
Chem. Phys. Lipids, **2005**, 133, 69-78
- [27]
LIU W., JENSEN T.J., FRONCZEK F.R., HAMMER R.P., SMITH K.M., VICENTE M.G.H.
Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines
J. Med. Chem., **2005**, 48, 1033-1041
- [28]
DAZIANO J.P., HUMEAU L., HENRY M., MANNONI P., CHANON M., CHABANNON C., JULLIARD M.
Preferential photoinactivation of leukemia cells by aluminium phthalocyanine
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1998**, 43, 128-135
- [29]
JORI G., FABRIS C.
Relative contributions of apoptosis and random necrosis in tumour response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn(II)-Phthalocyanines
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1998**, 43, 181-185
- [30]
KOSTKA M., ZIMCIK P., MILETIN M., KLEMERA P., KOPECKY K., MUSIL Z.
Comparison of aggregation properties and photodynamic activity of phthalocyanines and azaphthalocyanines
J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **2006**, 178, 16-25
- [31]
DE FILIPPIS M.P., DEI D., FANTETTI L., RONCUCCI G.
Synthesis of a new water-soluble octa-cationic phthalocyanine derivative for PDT
Tetrahedron Lett., **2000**, 41, 9143-9147
- [32]
ROSENTHAL I.
Phthalocyanine as photodynamic sensitizers
Photochem. Photobiol., **1991**, 53, 859-870
- [33]
CAUCHON N., TIAN H., LANGLOIS R., LA MADELEINE C., MARTIN S., ALI H., HUNTING D., VAN LIER J.E.
Structure-photodynamic activity relationships of substituted Zinc trisulfophthalocyanines
Bioconjugate Chem., **2005**, 16, 80-89

- [34]
HADJUR C., WAGNIERES G., IHRINGER F., MONNIER P., VAN DER BERGH H.
Production of the free radicals $\cdot\text{O}_2^-$ and $\cdot\text{OH}$ by irradiation of the sensitizer zinc(II) phthalocyanine
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1997**, 38, 192-202
- [35]
SCHREIBER S., GROSS S., BRANDIS A., HARMELIN A., ROSENBAACH-BELKIN V., SCHERZ A., SALOMON Y.
Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-Bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery
Int. J. Cancer, **2002**, 99, 279-285
- [36]
WILSON A.C., MALHAM G.M., THOMSEN R.J., HARVEY J.D., BAGULEY B.C.
Determination of the activation spectrum of aluminium phthalocyanine chloride against cultured meningioma cells using a tunable laser
J. Clin. Neuroscience, **1996**, 3, 252-256
- [37]
ZHOU C., SHUNJI C., JINSHENG D., JUNLIN L., JORI G., MILANESI C.
Apoptosis of mouse MS-2 fibrosarcoma cells induced by photodynamic therapy with Zn(II)-phthalocyanine
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1996**, 33, 219-223
- [38]
RUCK A., BECK G., BACHOR R., AKGUN N., GSCHWEND M.H., STEINER R.
Dynamic fluorescence changes during Al(III) phthalocyanine tetrasulphonate and lipophilic Zn(II) phthalocyanine administered in liposomes
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1996**, 36, 127-133
- [39]
VALDUGA G., REDDI E., JORI G.
Steady state and time-resolved spectroscopic studies on zinc(II) phthalocyanine in liposomes
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1992**, 16, 331-340
- [40]
FAHR A., VAN HOOGEVEST P., MAY S., BERGSTRAND N., LEIGH M.L.S.
Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: consequences for drug delivery
Eur. J. Pharm. Sci., **2005**, 26, 251-265
- [41]
CHAN W.S., BRASSEUR N., LA MADELEINE C., OUELLET R., VAN LIER J.E.
Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours
Eur. J. Cancer, **1997**, 33, 1855-1859
- [42]
LE GARREC D., TAILLEFER J., VAN LIER J.E., LENAERTS V., LEROUX J.-C.
Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model
J. Drug Targeting, **2002**, 10, 429-437
- [43]
SCULLY A.D., OSTLER R.B., PHILLIPS D., O'NEIL P., TOWNSEND K.M.S., PARKER A.W., MACROBERT A.J.
Application of fluorescence lifetime imaging microscopy to the investigation of intracellular PDT mechanisms
Bioimaging, **1997**, 5, 9-18

- [44]
MOAN J., BERG K., ANHOLT H., MADSLIEN K.
Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells
Int. J. Cancer, **1994**, 107, 136-142
- [45]
STYLLI S.S., HILL J.S., SAWYER W.H., KAYE A.H.
Aluminium phthalocyanine mediated photodynamic therapy in experimental malignant glioma
J. Clin. Neuroscience, **1995**, 2, 146-151
- [46]
STYLLI S.S., HILL J.S., SAWYER W.H., KAYE A.H.
Phthalocyanine photosensitizers for the treatment of brain tumours
J. Clin. Neuroscience, **1995**, 2, 64-72
- [47]
DERYCKE A.S.L., KAMUHABWA A., GIJSENS A., ROSKAMS T., DE VOS D., KASRAN A., HUWYLER J., MISSIAEN L., DE WITTE P.A.M.
Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AlPcS₄ to rat bladder carcinoma cells
J. Natl. Cancer Inst., **2004**, 96, 1620-1630
- [48]
KUZNETSOVA N.A., PYKHTINA E.V., ULANOVA L.A., KALIYA O.L.
Type-I and type-II photoprocesses in the system PHOTONSENSE-ascorbic acid
J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **2004**, 167, 37-47
- [49]
MEEROVICH I.G., JERDEVA V.V., DERKACHEVA V.M., MEEROVICH G.A., LUKYANETS E.A., KOGAN E.A., SAVITSKY A.P.
Photodynamic activity of dibiotinylated aluminium sulfophthalocyanine *in vitro* and *in vivo*
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **2005**, 80, 57-64
- [50]
REDDI E., JORI G.
Steady-state and time-resolved spectroscopic studies of photodynamic sensitizers: porphyrins and phthalocyanines
Rev. Chem. Intermed., **1988**, 10, 241-268
- [51]
RODAL G.H., RODAL S.V., MOAN J., BERG K.
Liposome-bound Zn(II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensibilization
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1998**, 45, 150-159
- [52]
TABATA K., FUKUSHIMA K., ODA K., OKURA I.
Selective aggregation of zinc phthalocyanines in the skin
J. Porphyrins Phthalocyanines, **2000**, 4, 278-284
- [53]
BRASSEUR N., ALI H., LANGLOIS R., VAN LIER J.E.
Biological activities of Phthalocyanines-IX. Photosensibilization of V-79 chinese hamster cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines
Photochem. Photobiol., **1988**, 47, 705-711
- [54]
WEI S., ZHOU J., HUANG D., WANG X., ZHANG B., SHEN J.
Synthesis and Type I/Type II photosensitizing properties of a novel amphiphilic zinc phthalocyanine
Dyes Pigments, **2006**, 71, 61-67

- [55]
FABRIS C., SONCIN M., MIOTTO G., FANTETTI L., CHITI G., DEI D., RONCUCCI G., JORI G.
Zn(II)-phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous diseases. Photosensitization of fibroblasts and keratinocytes
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **2006**, 83, 48-54
- [56]
SAKAMOTO K., KATO T., OHNO-OKUMURA E., WATANABE M., COOK M.J.
Synthesis of novel cationic amphiphilic phthalocyanine derivatives for next generation photosensitizer using photodynamic therapy of cancer
Dyes Pigments, **2005**, 64, 63-71
- [57]
GAO L., QIAN K., ZHANG L., ZHANG Y.
Tetra-trifluoroethoxyl zinc phthalocyanine: potential photosensitizer for use in the photodynamic therapy of cancer
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **2001**, 65, 35-38
- [58]
HONE D.C., WALKER P.I., EWANS-GROWING R., FITZGERALD S., BEEBY A., CHAMBRIER I., COOK M.J., RUSSELL D.A.
Generation of cytotoxic singlet oxygen *via* phthalocyanine stabilized gold nanoparticles: A potential delivery vehicle for photodynamic therapy
Langmuir, **2002**, 18, 2985-2987
- [59]
GONZALES-CABELLO A., VAZQUES P., TORRES T., GULDI D.M.
Highly coupled dyads based on Phthalocyanines-Ruthenium(II) tris(bipyridine) complexes. Synthesis and photoinduced processes
J. Org. Chem., **2003**, 68, 8635-8642
- [60]
CHEN J., CHEN N., HUANG J., WANG J., HUANG M.
Derivatizable phthalocyanine with single carboxyl group: synthesis and purification
Inorg. Chem. Comm., **2006**, 9, 313-315
- [61]
ERGORIN M.J., ZUHOWSKI E.G., SENTZ D.L., DOBSON J.M., CALLERY P.S., EISEMAN J.L.
Plasma pharmacokinetics and tissue distribution in CD2F1 mice of Pc4 (NSC 676418), a silicone phthalocyanine photodynamic sensitizing agent
Cancer Chemother. Pharmacol., **1999**, 44, 283-294
- [62]
CHIU S.M., EVANS H., LAM M., NIEMINEM A.L., OLEINICK N.L.
Phthalocyanine 4 photodynamic therapy-induced apoptosis of mouse L5178Y-R cells results from a delayed but extensive release of cytochrome c from mitochondria
Cancer Lett., **2001**, 165, 51-58
- [63]
SAKHAROV D.V., ELSTAK E.D.R., CHERNYAK B., WIRTZ K.W.A.
Prolongated lipid oxidation after photodynamic treatment. Study with oxidation-sensitive probe C11-BODIPY^{581/591}
FEBS Lett., **2005**, 579, 1255-1260
- [64]
ROSENTHAL I., MURALI KRISHNA C., RIESZ P., BEN HUR E.
The role of molecular oxygen in the photodynamic effect of phthalocyanines
Radiat. Res., **1986**, 107, 136-142

- [65]
BEN HUR E., CARMICHAEL A., RIESZ P., ROSENTHAL I.
Photochemical generation of superoxide radical and the cytotoxicity of phthalocyanines
Int. J. Radiat. Biol., **1985**, 48, 837-846
- [66]
SONCIN M., BUSETTI A., REDDI E., JORI G., RITHER B.D., KENNEY M.E., RODGERS M.A.J.
Pharmacokinetic and phototherapeutic properties of axially substituted Si(IV)-tetradibenzobarreleno-
octabutoxyphthalocyanines
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **1997**, 40, 163-167
- [67]
SHARMAN W.M., VAN LIER J.E., ALLEN C.M.
Targeted photodynamic therapy *via* receptor mediated delivery systems
Adv. Drug Del. Rev., **2004**, 56, 53-76
- [68]
HUANG J.-D., LO P.-C., CHEN Y.-M., LAI J.C., FONG W.-P., NG D.K.P.
Preparation and in vitro photodynamic activity of novel silicon(IV) phthalocyanines conjugated to serum
albumins
J. Inorg. Biochem., **2006**, sous presse
- [69]
BARGE J., DECREAU R., JULLIARD M., HUBAUD J.-C., SABATIER A.-S., GROB J.-J., VERRANDO P.
Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by
early activation of mitochondrion-mediated apoptosis
Exp. Dermatol., **2004**, 13, 33-44
- [70]
MARRE S.E., HYOKONG T.
Syntheses and photochemical properties of octasubstituted phthalocyaninato zinc complexes
J. Porphyrins Phthalocyanines, **2001**, 5, 782-792
- [71]
KHAN E.H., ALI H., TIAN H., ROUSSEAU J., TESSIER G., VAN LIER S., VAN LIER J.E.
Synthesis and biological activities of Pc-estradiol conjugates
Bioorg. Med. Chem. Lett., **2003**, 13, 1287-1290
- [72]
LUTSENKO S.V., FELDMAN N.B., FINAKOVA G.V., POSYPANOVA G.A., SEVERIN S.E., SKRYABIN
K.G., KIRPICHNIKOV M.P., LUKYANETS E.A., VOROZHTSOV G.N.
Targeting phthalocyanines to tumor cells using epidermal growth factor conjugates
Tumor Biol., **1999**, 20, 218-224
- [73]
HAYWOOD-SMALL S.L., VERNON D.I., GRIFFITHS J., SCHOFIELD J., BROWN S.B.
Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical
cancer cells
Biochem. Biophys. Res. Co., **2006**, 339, 569-576
- [74]
ALLEN C.M., SHARMAN W.M., LA MADELEINE C., WEBER J.M., LANGLOIS R., OUELLET R., VAN
LIER J.E.
Photodynamic therapy: tumor targeting with adenoviral proteins
Photochem. Photobiol., **1999**, 70, 512-523

- [75]
VROUENRAETS M.B., VISSER G.W.M., STIGTER M., OPPELAAR H., SNOW G.B., VAN DONGEN G.A.M.S.
Comparison of aluminium (III) phthalocyanine tetrasulfonate- and meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monoclonal antibody conjugates for their efficacy in photodynamic therapy *in vitro*
Int. J. Cancer, **2002**, 98, 793-798
- [76]
BERG K., SELBO P.K., PRASMICKAITE L., TJELLE T.E., SANDVIG K., MOAN J., GAUDERNACK G., FODSTAD Ø., KJØLSRUD S., ANHOLT H., RODAL G.H., RODAL S.K., HØGSET A.
Photochemical Internalization: A novel technology for delivery of macromolecules into cytosol
Cancer Res., **1999**, 59, 1180-1183
- [77]
SELBO P.K., SIVAM G., FODSTAD Ø., SANDVIG K., BERG K.
In vivo documentation of photochemical internalization, a novel approach to site specific cancer therapy
Int. J. Cancer, **2001**, 92, 761-766
- [78]
NDOYE A.
Transfert du gène d'intérêt thérapeutique p53 par internalisation photochimique de complexes p53/polyéthylèneimine : applications pour le traitement des cancers épidermoïdes de la tête et du cou
Thèse de Doctorat, Université de Nancy I, **2005**, 69-70, 176
- [79]
NDOYE A., DOLIVET G., HOGSET A., LEROUX A., ERBACHER P., BERG K., BEHR J.-P., GUILLEMIN F., MERLIN J.-L.
Eradication of p53-mutated head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) xenografts using nonviral p53 gene therapy and photochemical internalisation (PCI)
Mol. Ther., **2006**, sous presse
- [80]
NDOYE A., MERLIN J.-L., LEROUX A., DOLIVET G., ERBACHER P., BEHR J.-P., BERG K., GUILLEMIN F.
Enhanced gene transfer and cell death following p53 gene transfer using photochemical internalisation of glucosylated PEI-DNA complexes
J. Gene Med., **2004**, 6, 884-894
- [81]
NDOYE A., BOUALI S., DOLIVET G., LEROUX A., ERBACHER P., BEHR J.-P., BERG K., GUILLEMIN F., MERLIN J.-L.
Sustained gene transfer and enhanced cell death following glucosylated-PEI-mediated p53 gene transfer with photochemical internalisation in p53-mutated head and neck carcinoma cells
Int. J. Oncol., **2004**, 25, 1575-1581
- [82]
GIUNTINI F., RAOUL Y., DEI D., MUNICCHI M., CHITI G., FABRIS C., COLAUTTI P., JORI G., RONCUCCI G.
Synthesis of tetrasubstituted Zn(II)-phthalocyanines carrying four carboranyl-units as potential BNCT and PDT agents
Tetrahedron Lett., **2005**, 46, 2979-2982
- [83]
KAHL S.B., LI J.
Synthesis and characterization of a boronated metallophthalocyanine for Boron Neutron Capture Therapy
Inorg. Chem., **1996**, 35, 3878-3880

- [84]
KUZNETSOV A.A., FILIPPOV V.I., ALYAUDIN R.N., TORSHINA N.L., KUZNETSOV O.A.
Application of magnetic liposomes for magnetically guided transport of muscle relaxants and anti-cancer photodynamic drugs
J. Magn. Magn. Mater., **2001**, 225, 95-100
- [85]
WUST P., HILDEBRANDT B., SREENIVASA G., RAU B., GELLERMANN J., RIESS H., FELIX R., SCHLAG P.M.
Hyperthermia in combined treatment of cancer
Lancet Oncol., **2002**, 8, 487-497
- [86]
OLIVEIRA D.M., MACAROFF P.P., RIBEIRO K.F., LACAVA Z.G.M., AZEVEDO R.B., LIMA E.C.D., MORAIS P.C., TEDESCO A.C.
Studies of zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex as a bifunctional agent for cancer treatment
J. Magn. Magn. Mater., **2005**, 289, 476-479
- [87]
TAMOSIUNAS M., BAGDONAS S., DIDZIAPETRIENE J., ROTOMSKIS R.
Electroporation of transplantable tumour for the enhanced accumulation of photosensitizers
J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **2005**, 81, 67-75
- [88]
LUKYANETS E.A.
Phthalocyanines as photosensitizers in the PDT of cancer
J. Porphyrins Phthalocyanines, **1999**, 3, 424-432
- [89]
WASZKOWIAK A., FRACKOWIAK D., WIKTOROWICZ K., MIYAKE J.
Spectral properties of phthalocyanines incorporated into resting and stimulated human peripheral blood cells
Acta Biochim. Polon., **2002**, 49, 633-641
- [90]
KLIESCH H., WEITEMEYER A., MULLER S., WOHRLE D.
Synthesis of phthalocyanines with one sulfonic acid, carboxylic acid or aminogroup
Liebigs Ann., **1995**, 1269-1273
- [91]
LEVEQUE-FORT S., STEENKESTE K., LACROIX P., TFIBEL F., FONTAINE-AUPART M.-P.
La photonique pour l'étude du milieu biologique : de la réactivité au diagnostic
L'actualité chimique, Novembre/Décembre **2003**, numéro spécial en collaboration avec l'INSERM, 70-77
- [92]
SCHNEIDER R., SCHMITT F., FROCHOT C., FORT Y., LOURETTE N., GUILLEMIN F., MULLER J.-F., BARBERI-HEYOB M.
Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy
Bioorg. Med. Chem., **2005**, 13, 2799-2808

ANNEXE

ANNEXE 1 – SITES INTERNET CONSULTÉS

[annexe1-1]

Site internet consulté en août 2005

www.vivantinfo.com

PERRIER J.J.

Thérapie photodynamique et cancer

[annexe1-2]

Site internet CNRS consulté en novembre 2005,

www.spm.cnrs-dir.fr/actions/publications/idp/IdP2005/25-Pons-Mertz.pdf

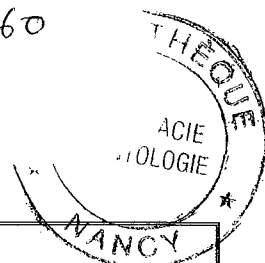
PONS T., MERTZ J.

Imager dans la profondeur des tissus : les microscopies biphotoniques

159-165

DEMANDE D'IMPRIMATUR N° 2460

Date de soutenance : 22 mars 2006



**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par **Vincent MANNEVILLE**

Sujet :

**Les phtalocyanines utilisées en cancérologie
expérimentale et clinique
Synthèse d'une métallophthalocyanine de zinc
vectorisable pour des applications en thérapie
photodynamique**

Jury :

Président :

M. Jean-Louis MERLIN, Professeur

Juges :

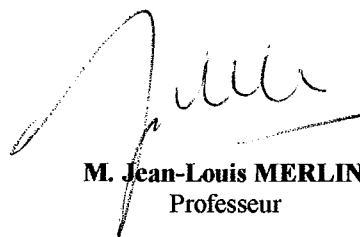
Mme Muriel Barberi-Heyob, Chargée de
Recherche,

Mlle Céline Frochot, Chargée de recherche CNRS

Vu,

Nancy, le 17 février 2006

Le Président du Jury et Directeur de Thèse




M. Jean-Louis MERLIN,
Professeur

Vu et approuvé

Nancy, le 27 février 2006

Le Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université Henri Poincaré - Nancy I,

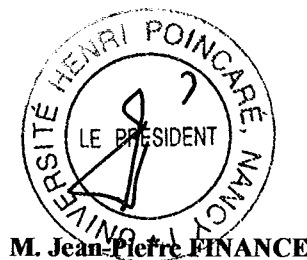
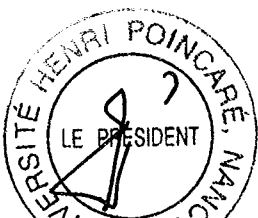


Mme Chantal FINANCE

Vu,

Nancy, le - 2 MAR. 2006

Le Président de l'Université Henri Poincaré - Nancy I,



M. Jean-Pierre FINANCE

N° d'enregistrement :

N° d'identification : PH Nancy 06 n° 9

TITRE :

Les phtalocyanines utilisées en cancérologie expérimentale et clinique
Synthèse d'une métallophtalocyanine de zinc vectorisable
pour des applications en thérapie photodynamique

Thèse soutenue le 22 Mars 2006

par Vincent Manneville

RESUME :

L'une des applications les plus prometteuses des phtalocyanines est la cancérologie, et plus particulièrement la thérapie photodynamique. Ce document fait le point sur les différentes phtalocyanines utilisées en recherche pour des applications en thérapie photodynamique (PDT), en internalisation photochimique (PCI), en thérapie de capture de neutron de bore (BNCT), ou pour d'autres stratégies de ciblage par action extérieure. Il s'intéresse plus spécifiquement aux métallophtalocyanines d'aluminium, de zinc et de silicium, ainsi qu'aux phtalocyanines couplées à un vecteur biologique. Une dernière partie s'intéresse à la synthèse, à l'identification et aux propriétés physicochimiques d'une métallophtalocyanine de zinc fonctionnalisée.

MOTS CLES : *phtalocyanines*, cancérologie, thérapie photodynamique, internalisation photochimique, ciblage biologique, métallophtalocyanine de zinc

| Directeurs de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|---------------------|--|--|
| Céline FROCHOT | DCPR, UMR 7630 CNRS-INPL, groupe ENSIC, Nancy | Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/> |
| Jean-Louis MERLIN | EA 3452, Laboratoire de biologie cellulaire oncologique, Faculté de Pharmacie, Nancy | Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 1 |

THEMES :

- | | |
|----------------------------|-----------------------------|
| 1- Sciences fondamentales | 4- Alimentation / Nutrition |
| 2- Hygiène / Environnement | 5- Biologie |
| 3- Médicament | 6- Pratique professionnelle |