



HAL
open science

Élaboration de sondes fluorescentes pour des applications en biologie et imagerie par microscopie de fluorescence

Pascale Even

► **To cite this version:**

Pascale Even. Élaboration de sondes fluorescentes pour des applications en biologie et imagerie par microscopie de fluorescence. Médecine humaine et pathologie. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2001. Français. NNT : 2001INPL567N . tel-01749837

HAL Id: tel-01749837

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749837>

Submitted on 29 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>

01INPL569N

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES
Département de Chimie Physique des Réactions, UMR 7630 CNRS-INPL

THESE

*Présentée à l'INPL
Ecole Doctorale : Biologie, Santé et Environnement*

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'INPL

Spécialité : Génie Biologique
par

Pascale EVEN



**ELABORATION DE SONDES FLUORESCENTES POUR DES
APPLICATIONS EN BIOLOGIE ET
IMAGERIE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE**

Soutenue publiquement le 24 octobre 2001, à Nancy, devant la Commission d'Examen



D 136 027417 3

MEMBRES DU JURY

- Président :** M. J.F. STOLTZ, Pr, Nancy, Faculté de Médecine
- Rapporteurs :** Mme E. BARDEZ, Pr, CNAM-Paris et ENS-Cachan
M. D. LETOURNEUR, CR CNRS, Paris, Hôpital Bichat
- Examineurs :** M. J.L. MERLIN, Pharmacien, Nancy, CAV
Mme T. REIS E SOUSA, DR, Lisbonne
Mlle C. FROCHOT, CR CNRS, Nancy, ENSIC
Mme M.C. CARRE, CR INSERM, Nancy, ENSIC
Mme M.L. VIRIOT, DR CNRS, Nancy, ENSIC

01 INPL564N

136027 4173

INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

ECOLE NATIONALE SUPERIEURE DES INDUSTRIES CHIMIQUES
Département de Chimie Physique des Réactions, UMR 7630 CNRS-INPL

THESE (7) 2001 EVEN, P.

Présentée à l'INPL
Ecole Doctorale : Biologie, Santé et Environnement

Pour l'obtention du titre de

Docteur de l'INPL

Spécialité : Génie Biologique
par

Pascale EVEN

**ELABORATION DE SONDES FLUORESCENTES POUR DES
APPLICATIONS EN BIOLOGIE ET
IMAGERIE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE**

Soutenue publiquement le 24 octobre 2001, à Nancy, devant la Commission d'Examen

MEMBRES DU JURY

- Président :** M. J.F. STOLTZ, Pr, Nancy, Faculté de Médecine
- Rapporteurs :** Mme E. BARDEZ, Pr, CNAM-Paris et ENS-Cachan
M. D. LETOURNEUR, CR CNRS, Paris, Hôpital Bichat
- Examineurs :** M. J.L. MERLIN, Pharmacien, Nancy, CAV
Mme T. REIS E SOUSA, DR, Lisbonne
Mlle C. FROCHOT, CR CNRS, Nancy, ENSIC
Mme M.C. CARRE, CR INSERM, Nancy, ENSIC
Mme M.L. VIRIOT, DR CNRS, Nancy, ENSIC

A ma famille,

A mes amis,

A Daniel.

REMERCIEMENTS

Au terme de ce travail, réalisé au Département de Chimie-Physique des Réactions, à l'Ecole Nationale Supérieure des Industries Chimiques de Nancy, je souhaite remercier toutes les personnes qui m'ont permis d'aboutir à sa réalisation.

Que Madame Marie-Laure Viriot, Directeur de Recherche au CNRS, trouve ici tous mes remerciements pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire qu'elle dirige, pour la confiance, son aide précieuse et l'autonomie qu'elle m'a accordées durant ces trois années de thèse.

Ce fut un réel privilège d'être guidée dans le lourd apprentissage de la recherche par Madame Marie-Christiane Carré, Chargée de recherche à l'INSERM. Je lui suis très reconnaissante pour son aide, ses précieux conseils et pour m'avoir fait partager ses compétences en synthèse organique ainsi que son enthousiasme scientifique. Je la remercie pour sa disponibilité de chaque instant et ses encouragements, surtout dans les moments de doute, tout au long de ces années.

C'est à plusieurs titres que je souhaite remercier Monsieur Didier Letourneur, Chargé de Recherche au CNRS. Je suis tout d'abord honorée de sa présence dans ce jury et de l'attention qu'il a accordée à ce travail en acceptant de le juger. Je lui suis reconnaissante de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de la confiance qu'il me témoigne en me permettant de continuer dans le futur à collaborer avec lui.

Que Madame Elisabeth Bardez, Professeur, soit assurée de ma profonde gratitude pour avoir accepté de juger ce mémoire.

Je suis honorée par la présence à ce Jury, de Monsieur Jean-François Stoltz, Professeur à la faculté de médecine de Vandoeuvre.

Que Monsieur Jean-Louis Merlin, Pharmacien au Centre Alexis Vautrin, accepte toute ma reconnaissance pour sa collaboration et pour sa présence dans ce jury de thèse.

Je suis très touchée que Madame Telma Reis e Souza ait accepté de faire le déplacement depuis Lisbonne pour participer à ce jury, je lui adresse également toute ma gratitude pour son accueil si chaleureux lors de mon séjour au Portugal.

Je ne saurais oublier de remercier chaleureusement Mademoiselle Céline Frochot, Chargée de Recherche au CNRS et dernière entrante au laboratoire, pour son aide constante si précieuse, son enthousiasme communicatif et ses chansons.

Je remercie tout le personnel du laboratoire qui m'ont apporté leur aide et pour tous les services que j'ai pu leur demander : Andrée Wallerich, Nathalie Petitjean, Denise Hagnier, Nicole Groos, Valérie Warth, Alain Paternotte, Gérard Delaveau, Pierre Pommier et Hervé Legall. Je les remercie également pour leur bonne humeur au quotidien.

Je tiens à associer à mes remerciements les personnes que j'ai pu côtoyer à l'Université Paris 13, en particulier Jacqueline Champion, Frédéric Chaubet et Isabelle Bataille pour leur aide et leurs conseils.

Je remercie Dominique Dumas, Ingénieur de Recherche, pour sa disponibilité et les heures passées devant le CELLScan.

Un très grand merci pour leur amitié et leur bonne humeur à tous les étudiants du DCPR-GRAPP que j'ai pu rencontrer au cours de ce travail, en particulier : Cyril, Christophe, Luc, Olivier et Virginie.

Ma gratitude s'adresse également à Caroline Combe, Sébastien Aubert, Michael Perniceni et Halima Alem qui ont participé à ce travail.

J'adresse un remerciement spécial à Caroline Muller pour avoir bien voulu cohabiter avec moi à "la Chapelle" et pour tous les bons moments que nous avons partagés durant ces trois années. Bonne chance Caro pour la suite...

AVANT-PROPOS

Le travail présenté ci-après, a été mené de novembre 1998 à septembre 2001, sous la direction de Madame Marie-Christiane Carré, CR INSERM et la codirection de Madame Marie-Laure Viriot, DR CNRS. Il a été réalisé pour la majeure partie, au sein du Département de Chimie-Physique des Réactions UMR 7630 CNRS-INPL du Groupe ENSIC, Nancy, plus spécifiquement dans l'équipe Cinétique et Instrumentation Photophysique (DCPR-GRAPP) et pour un moindre fait, au Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules, Université Paris XIII, dans le cadre d'une collaboration. De plus, les observations en microscopie 3D ont été réalisées à la Faculté de Médecine de Nancy, équipe du Pr J.F. Stoltz.

La présente étude, située à l'interface Chimie-Photophysique-Biologie, avait pour objectif de synthétiser et de caractériser des traceurs fluorescents pour des applications en milieu biologique. Dans un contexte de recherche en Biosciences à Nancy, qui cible entre autres activités, le développement des méthodes optiques pour des applications en Bioingénierie, nous avons privilégié essentiellement deux axes de recherche en collaboration avec différents partenaires :

- Elaboration de traceurs fluorescents dérivés de coumarine pour l'étude de biopolymères en collaboration avec l'équipe de Monsieur Didier Letourneur, Chargé de Recherche au CNRS, Université Paris XIII et Faculté de Médecine Bichat.

- Elaboration de nouveaux photosensibilisants pour la thérapie photodynamique, en collaboration avec l'équipe de Monsieur Jean-Louis Merlin, Pharmacien, Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique, dirigée par Monsieur François Guillemain, Professeur, Centre Alexis Vautrin (CAV), Vandœuvre.

SOMMAIRE GENERAL

INTRODUCTION GENERALE	1
PREMIERE PARTIE : ETUDE DE POLYSACCHARIDES FLUORESCENTS	7
I INTRODUCTION	9
II ETAT DE L'ART	13
II.1 LES POLYSACCHARIDES	15
II.2 MARQUAGE DES POLYSACCHARIDES	22
II.3 LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS	36
III SYNTHESE ET ETUDE DES POLYSACCHARIDES FLUORESCENTS	43
III.1 SYNTHESE DES DEXTRANES MODIFIES	45
III.2 SYNTHESE DES POLYSACCHARIDES FLUORESCENTS	48
III.3 ETUDE PHOTOPHYSIQUE	75
IV ETUDES EN MILIEU BIOLOGIQUE ET VISUALISATION PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE 3D	91
IV.1 INTRODUCTION	93
IV.2 DESCRIPTION DES CELLULES EUCARIOTES	94
IV.3 INFLUENCE DU MARQUAGE FLUORESCENT SUR L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES POLYSACCHARIDES (DEXTRANE ET HEPARINE)	98
IV.4 VISUALISATION PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE	100
IV.5 MATERIEL ET METHODES	102
V CONCLUSION	109
DEUXIEME PARTIE : SYNTHESSES ET ETUDES DE NOUVEAUX PHOTOSENSIBILISANTS POUR LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	113
I INTRODUCTION	115
II ETAT DE L'ART	121
II.1 DEFINITION DE LA PDT	123
II.2 HISTORIQUE DE LA PDT	123
II.3 LES PORPHYRINES	124
II.4 LA PHOTOOXYDATION	132
II.5 LES PHOTOSENSIBILISANTS	136
II.6 NOUVELLES APPLICATIONS DE LA PDT	154
II.7 BILAN SUR LA PDT	155

III SYNTHÈSE DES PORPHYRINES	157
III.1 INTRODUCTION	159
III.2 ELABORATION DES PHOTOSENSIBILISANTS	162
III.3 PARTIE EXPERIMENTALE	171
IV ETUDE PHOTOPHYSIQUE	183
IV.1 OBJECTIF DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE	185
IV.2 MATERIEL ET METHODES	185
IV.3 SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE	186
IV.4 SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE	188
IV.5 ETUDE DE L'AGREGATION DES PORPHYRINES	190
IV.6 BILAN DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE	197
V CONCLUSION	199
CONCLUSION GENERALE	203
ANNEXES	207
BIBLIOGRAPHIE	239

Sommaire de la première partie : partie A

157			
159		ETUDE DE POLYSACCHARIDES FLUORESCENTS	7
162			
171			
183		I INTRODUCTION	9
185		II ETAT DE L'ART	13
185		II.1 LES POLYSACCHARIDES	15
186	II.1.1	Généralités : structures et applications	15
188	II.1.2	Le dextrane	17
190	II.1.2.1	Description structurale	17
197	II.1.2.2	Propriétés	18
	II.1.3	Les dextrans modifiés : structures et fonctions	19
199	II.1.4	L'héparine : structure et fonctions	20
	II.2 MARQUAGE DES POLYSACCHARIDES		22
203	II.2.1	Problème de mise en évidence. Nécessité d'un marquage	22
	II.2.2	Marquage radioactif des polymères	23
207	II.2.2.1	Généralités : Historique et méthodes	23
	II.2.2.2	Marquage radioactif des polysaccharides	23
239	II.2.2.3	Bilan des méthodes de marquage radioactif	27
	II.2.3	Marquage fluorescent des polysaccharides	27
	II.2.3.1	Réaction sur les fonctions alcool	29
	II.2.3.1.1	Marquage avec des dérivés de la fluorescéine	30
	II.2.3.1.2	Marquage à l'anhydride N-méthylisatoïque	31
	II.2.3.2	Réaction sur les extrémités réductrices	32
	II.2.3.3	Bilan des méthodes de marquage fluorescent	35
	II.3 LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS		36
	II.3.1	Définition des rotors moléculaires fluorescents	36
	II.3.2	Etude des états excités des rotors moléculaires	36
	II.3.3	Concept de l'état TICT	38
	II.3.4	Les rotors de type 7-diéthylamino coumarine substituée en position 3	40
	III SYNTHÈSE ET ETUDE DES POLYSACCHARIDES FLUORESCENTS		43
	III.1 SYNTHÈSE DES DEXTRANES MODIFIÉS		45
	III.1.1	Carboxyméthylation du dextrane	45
	III.1.2	Réaction de benzylamidification	46
	III.1.3	Caractérisation des produits	46
	III.2 SYNTHÈSE DES POLYSACCHARIDES FLUORESCENTS		48
	III.2.1	Stratégie de synthèse	48
	III.2.2	Synthèse des rotors moléculaires fluorescents dérivés des coumarines	49
	III.2.2.1	Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique, rotor COOH	49
	III.2.2.2	Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique, rotor CNCOOH	50
	III.2.2.3	Greffage d'un bras espaceur sur les rotors COOH et CNCOOH	51
	III.2.3	Synthèse des polysaccharides fluorescents	51
	III.2.3.1	Synthèse à partir des rotors modifiés par un bras espaceur	51
	III.2.3.2	Synthèse à partir des polysaccharides modifiés	52
	III.2.3.2.1	Greffage du bras espaceur sur les polysaccharides	52
	III.2.3.2.2	Greffage des rotors COOH et CNCOOH	53
	III.2.3.2.3	Caractérisation des polymères fluorescents	53

- III.2.3.3 Bilan des greffages des fluorophores
- III.2.4 Partie expérimentale
 - III.2.4.1 Matériels et méthodes physico-chimiques
 - III.2.4.2 Description des méthodes de synthèse
 - III.2.4.2.1 Synthèse des rotors moléculaires fluorescents dérivés de coumarine
 - III.2.4.2.2 Protocoles de synthèse et caractéristiques physico-chimiques des polysaccharides

III.3 ETUDE PHOTOPHYSIQUE

- III.3.1 Matériels et méthodes
 - III.3.1.1 Matériels
 - III.3.1.2 Méthodes
 - III.3.1.2.1 Spectroscopie d'absorption UV-Visible
 - III.3.1.2.2 Spectroscopie de fluorescence en excitation continue
 - III.3.1.2.3 Principe de détermination des rendements quantiques de fluorescence
- III.3.2 Etude des rotors moléculaires fluorescents
 - III.3.2.1 Spectroscopie UV-Visible
 - III.3.2.2 Spectroscopie d'émission de fluorescence
- III.3.3 Etude des biopolymères fluorescents
 - III.3.3.1 Etude en solution diluée
 - III.3.3.2 Etude des polysaccharides fluorescents en milieu visqueux
- III.3.4 Bilan de l'étude photophysique

IV ETUDES EN MILIEU BIOLOGIQUE ET VISUALISATION PAR MICROSCOPIE FLUORESCENCE 3D

IV.1 INTRODUCTION

IV.2 DESCRIPTION DES CELLULES EUCARYOTES

- IV.2.1 Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses dans la paroi artérielle
- IV.2.2 Les cellules endothéliales (CE)
- IV.2.3 Les cellules musculaires lisses (CML)

IV.3 INFLUENCE DU MARQUAGE FLUORESCENT SUR L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES POLYSACCHARIDES (DEXTRANE ET HEPARINE)

- IV.3.1 Les dextrans fluorescents modifiés
- IV.3.2 L'héparine fluorescente
- IV.3.3 Bilan des tests biologiques

IV.4 VISUALISATIONS PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

- IV.4.1 Visualisation des dérivés dextrane dans les cellules endothéliales
- IV.4.2 Visualisation de l'héparine dans les CML

IV.5 MATERIEL ET METHODES

- IV.5.1 Cellules biologiques
 - IV.5.1.1 Décongélation des cellules
 - IV.5.1.2 "Passage" des cellules
 - IV.5.1.3 Congélation des cellules
- IV.5.2 Tests de prolifération des cellules endothéliales EA.hy 926
- IV.5.3 Activité anticoagulante de l'héparine
- IV.5.4 Techniques de comptage des cellules
 - IV.5.4.1 Coulter-Counter
 - IV.5.4.2 Cellule de Malassez
- IV.5.5 Internalisation des polysaccharides fluorescents
- IV.5.6 Montage des lames de microscope
- IV.5.7 Imagerie par microscopie de fluorescence 3D

V CONCLUSION

Sommaire de la deuxième partie : partie B

SYNTHESES ET ETUDES DE NOUVEAUX PHOTSENSIBILISANTS POUR LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	113
I INTRODUCTION	115
II ETAT DE L'ART	121
II.1 DEFINITION DE LA PDT	123
II.2 HISTORIQUE DE LA PDT	123
II.3 LES PORPHYRINES	124
II.3.1 Description	124
II.3.2 Synthèse biologique des porphyrines	127
II.3.3 Synthèse chimique des porphyrines	127
II.3.3.1 Synthèse "one-pot"	128
II.3.3.2 Condensation dipyrrolique	129
II.3.4 Caractérisation spectrale des porphyrines	131
II.3.4.1 Spectre d'absorption	131
II.3.4.2 Spectre de fluorescence	132
II.4 LA PHOTOOXYDATION	132
II.4.1 Etape n°1 : Passage du photosensibilisateur de l'état fondamental S ₀ à l'état excité triplet T ₁ suite à l'absorption de lumière	133
II.4.2 Etape n°2 : Photooxydations sensibilisées à partir du photosensibilisateur à l'état triplet T ₁	134
II.4.2.1 Réaction de type I	134
II.4.2.2 Réaction de type II	135
II.4.2.3 Les cibles biomoléculaires de la photooxydation	135
II.5 LES PHOTSENSIBILISANTS	136
II.5.1 Introduction	136
II.5.2 Les photosensibilisants de première génération	138
II.5.2.1 HpD ("Hematoporphyrin derivative")	138
II.5.2.2 Photofrin®	138
II.5.3 Les photosensibilisants de seconde génération	140
II.5.4 Le futur	144
II.5.4.1 Anticorps monoclonaux et 5-Aminolévulinique	144
II.5.4.2 Les texaphyrines	144
II.5.4.3 La BPD-MA	146
II.5.4.4 La mTHPC	147
II.5.5 Localisation des photosensibilisateurs	148
II.5.5.1 Paramètres d'influence	148
II.5.5.2 Passage de la membrane plasmique	149
II.5.5.3 Localisation dans la cellule	152
II.5.6 Apoptose et nécrose	152
II.5.6.1 Apoptose	152
II.5.6.2 Nécrose	153
II.5.6.3 Constataion	153
II.6 NOUVELLES APPLICATIONS DE LA PDT	154
II.7 BILAN SUR LA PDT	155

III SYNTHÈSE DES PORPHYRINES

III.1 INTRODUCTION

- III.1.1 Contexte de l'étude et stratégies de synthèse
- III.1.2 Choix de la glucosamine

III.2 ELABORATION DES PHOTOSENSIBILISANTS

- III.2.1 Essais à partir de la protoporphyrine IX
- III.2.2 Synthèse totale des porphyrines
 - III.2.2.1 Synthèse des porphyrines acides
 - III.2.2.2 Synthèse des porphyrines glycosylées
 - III.2.2.2.1 Synthèse de la D-glucosamine tétra O-acétylée
 - III.2.2.2.2 Condensation de la D-glucosamine tétra O-acétylée
 - III.2.2.2.3 Synthèse du dérivé dipyrrole glycolysé
 - III.2.2.2.4 Synthèse des porphyrines P4GluOAc et P2GluOAc
- III.2.3 Bilan des synthèses des porphyrines

III.3 PARTIE EXPERIMENTALE

- III.3.1 Matériel et méthodes
- III.3.2 Description des synthèses
 - III.3.2.1 Synthèse de la glucosamine tétra O-acétylée
 - III.3.2.2 Synthèse du 4-carboxyamido-(2-déoxy-2-D-glucosamine-tétra-O-acétyl)benzaldéhyde
 - III.3.2.3 Synthèse du 5-(4-carboxyphényl)dipyrrométhane
 - III.3.2.4 Synthèse du *méso*-(4-glucosamide tétra-O-acétyl-phényl)dipyrrométhane
 - III.3.2.5 Synthèse de la porphyrine P2COOH
 - III.3.2.6 Synthèse de la porphyrine P4COOH
 - III.3.2.6.1 Première voie de synthèse
 - III.3.2.6.2 Deuxième voie de synthèse
 - III.3.2.7 Synthèse de P2GluOAc
 - III.3.2.8 Synthèse de la P4GluOAc
 - III.3.2.8.1 Première méthode
 - III.3.2.8.2 Deuxième méthode

IV ETUDE PHOTOPHYSIQUE

IV.1 OBJECTIF DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE

IV.2 MATERIEL ET METHODES

- IV.2.1 Matériel
- IV.2.2 Méthodes

IV.3 SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

IV.4 SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

IV.5 ETUDE DE L'AGREGATION DES PORPHYRINES

- IV.5.1 Mise en évidence du phénomène d'agrégation
 - IV.5.1.1 Spectres d'excitation
 - IV.5.1.2 Spectres d'absorption UV-Visible
 - IV.5.1.3 Etude de l'émission de fluorescence en fonction de la concentration
- IV.5.2 Constante de dimérisation

IV.6 BILAN DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE

V CONCLUSION

ABBREVIATIONS

AcOEt	acétate d'éthyle
AIPCTS	<i>"aluminium phthalocyanine tetrasulfonate"</i>
AB	2-aminobenzamide
ADN	acide désoxyribonucléique
ALA	acide 5-aminolévulinique
AMAC	2-aminoacridone
AMM	autorisation de mise sur le marché
ANTS	acide amino-8-naphtalène trisulfonique-1,3,6
AP	amino-2-pyridine
APTS	acide amino-8-pyrène trisulfonique-1,3,6
BPA	bromopropylamine
BPD-MA	<i>"benzoporphyrin derivative monoacid"</i>
CCM	chromatographie sur couche mince
CE	cellule endothéliale
CHCl ₃	chloroforme
CH ₂ Cl ₂	dichlorométhane
CI	conversion interne
CIS	conversion inter-systèmes
Cl _{e6}	<i>"Chlorin e₆"</i>
CLHP	chromatographie liquide haute performance
CMD	carboxyméthyl-dextrane
CMDB	carboxyméthyl-dextrane benzylamide
CML	cellule musculaire lisse
DCCI	N,N'-dicyclohexylcarbodiimide
DDQ	2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone
DMEM	<i>"dubelcco's modified eagle medium"</i>
DMF	N,N-diméthylformamide
DO	densité optique
DTAF	5-(4,6-dichlorotriazine-2-amino)fluorescéine
EEDQ	N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine
éq.	équivalent
EtOH	éthanol
FC	fluorescamine
FITC	fluoresceine-isothiocyanate
HCl	acide chlorhydrique
HOBt	hydroxybenzotriazole
HONSu	N-hydroxysuccinimide
Hp	hématoporphyrine
HpD	dérivé de l'hématoporphyrine
ICT	<i>"intramolecular charge transfer"</i>
IR	infrarouge
LDL	<i>"low density lipoprotein"</i>
MACE	<i>"monoaspartyl chlorin e₆"</i>

MEM	<i>"minimum eagle medium"</i>
MeOH	méthanol
méq.	milliéquivalent
MgSO ₄	sulfate de magnésium
MgO	oxyde de magnésium
Mol	mole(s)
mTHPC	<i>"m-tetrahydroxyphenylchlorin"</i>
NA	<i>"numerical aperture"</i> : ouverture numérique
NaOH	hydroxyde de sodium
NH ₄ OH	hydroxyde d'ammonium
¹ O ₂	oxygène singulet
³ O ₂	oxygène triplet
PBS	<i>"phosphate buffer saline"</i>
PCT	photochimiothérapie
PDT	<i>"photodynamic therapy"</i> (thérapie photodynamique)
Ph ₃ P	triphosphine
PII	photofrin II
PM	photomultiplicateur
POCl ₃	oxychlorure de phosphore
RMN	résonance magnétique nucléaire
Sens	photosensibilisateur ou photosensibilisant
SVF	sérum de veau fœtal
TCQ	2,3,5,6-tétrachlorobenzoquinone
TFA	acide trifluoroacétique
TICT	<i>"twisted intramolecular charge transfer"</i>
TEOA	<i>"triethylorthoacetate"</i>
3THPP	<i>"tetra(3-hydroxyphenyl)porphyrin"</i>
TMPyP	<i>"α,β,γ,δ-tetrakis(1-methylpyridinium-4-yl)porphyrin p-toluenesulfonate"</i>
TPPS ₃	<i>"tetraphenylporphine trisulfonate"</i>
TPPS ₄	<i>"tetraphenylporphine tetrasulfonate"</i>
ua	unité arbitraire
UV	ultraviolet
v	niveau quantique de vibration
v/v	volume/volume

INTRODUCTION GENERALE

A l'heure actuelle, la spectroscopie de fluorescence est une méthode de choix pour l'investigation de la structure et de la dynamique de la matière des systèmes vivants : immunologie, dynamique des protéines, localisation et devenir de molécules bioactives dans la cellule, séquençage de l'ADN, etc. Ceci explique le besoin croissant d'avoir à disposition des fluorophores répondant à des critères bien précis : stabilité, longueurs d'onde d'absorption et d'émission spécifiques, solubilité modulable, non toxicité, sélectivité et sensibilité à l'environnement [Valeur, 1993]. De plus, la fluorescence présente les principaux avantages d'être sensible, rapide, non invasive et en cela de ne pas interférer sur l'intégrité cellulaire.

Pour l'étude de milieux cellulaires par des techniques de fluorescence, il est possible d'employer les sondes fluorescentes selon deux manières différentes : soit de manière intrinsèque ou soit de manière extrinsèque. Les sondes intrinsèques correspondent à diverses biomolécules présentes *in situ* : aminoacides, vitamines, porphyrines, enzymes et coenzymes, etc. et sont utilisées pour suivre certains processus biologiques. Cependant, dans la plupart des utilisations ce sont les sondes extrinsèques, simplement incorporées au milieu d'étude [Viriot et al., 1983] qui sont utilisées et correspondent à divers fluorophores plus ou moins spécifiques qui sont ajoutés au milieu à caractériser. Dans d'autres cas, la sonde extrinsèque peut être associée par liaison covalente à des molécules bioactives comme les protéines, les oligonucléotides ou encore les polysaccharides afin de déterminer leur localisation cellulaire et de mieux comprendre leur rôle biologique.

La localisation exacte du traceur fluorescent dans un système biologique cellulaire est d'une importance capitale pour, entre autres, une bonne interprétation des images obtenues lors de l'analyse par microscopie de fluorescence. Selon les applications souhaitées, le traceur doit cibler la membrane plasmique, le cytosquelette, le noyau, les membranes des organites ou les organites eux-mêmes.

Pour mieux appréhender la localisation des sondes fluorescentes, voire même dans certains cas l'orientation de leurs chaînes dans les milieux d'incorporation, il est possible de jouer sur leur structure chimique en choisissant divers types de structure et à partir d'une structure de base de modifier la nature des substituants pour changer, par exemple, les critères de solubilité ou encore la longueur d'onde maximale d'émission de fluorescence (résolution

spectrale). A cet égard, notre attention s'est portée tout particulièrement sur le développement de traceurs fluorescents répondant à cette problématique.

Ce travail qui s'articule en deux parties distinctes, a consisté en l'élaboration de différentes molécules fluorescentes dans le but de les utiliser comme sondes extrinsèques ou encore de les associer à des molécules biologiquement actives afin de pouvoir par la suite, grâce notamment aux microscopies optiques, les visualiser dans des systèmes vivants et ainsi mieux comprendre les mécanismes d'action intervenant dans ces systèmes complexes.

La première partie de ce mémoire est consacrée à la synthèse et à l'étude de rotors moléculaires comme sondes fluorescentes et plus particulièrement aux dérivés 7-(N,N-dialkylamino)coumarine en vue de leur fixation à des biopolymères. Les rotors moléculaires fluorescents ont été largement décrits depuis 1975 et sont en pleine expansion dans leur utilisation en tant que sondes biologiques. Lors de précédents travaux réalisés au DCPR-GRAPP, des rotors de type coumarine ont été développés [Zusatz, 1997 ; Geoffroy-Chapotot, 1998]. Ces travaux venaient argumenter les avantages précédemment décrits pour les rotors moléculaires fluorescents comme sondes d'environnement, concernant soit le déplacement bathochrome de la longueur d'émission de fluorescence ($\lambda_{f \text{ max}}$) avec l'augmentation de la polarité du milieu, soit l'augmentation de l'efficacité de l'émission de fluorescence (ϕ_f) avec l'augmentation de la cohésion du milieu [Grabowski et al., 1979].

Au démarrage de notre action et en collaboration avec l'INVIMAT, Paris XIII, nous avons voulu utiliser et optimiser les propriétés des rotors moléculaires fluorescents associés à des polymères bioactifs de type polysaccharide. L'étude a consisté à greffer de manière covalente des dérivés coumarine convenablement fonctionnalisés, possédant des propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence différentes sur des dérivés bioactifs du dextrane ou encore de l'héparine. Les dextrans synthétisés ont été modifiés chimiquement par des groupements carboxyméthyles et benzylamides. Selon les degrés de substitution, ils présentent plusieurs activités biologiques, dont une activité proliférative sur des cellules endothéliales. L'héparine est une substance qui retarde la coagulation sanguine et qui possède, entre autres, un effet antiprolifératif sur les cellules musculaires lisses dont le mécanisme est encore mal connu. Dans le but d'essayer d'apporter un éclairage sur leurs

activités biologiques, nous avons réalisé des tests d'internalisation afin de visualiser, par des méthodes de microscopie de fluorescence, les dérivés fluorescents du dextrane et de l'héparine respectivement dans des cellules endothéliales (CE) et dans des cellules musculaires lisses (CML).

Avec toujours pour objectif de développer le traçage par fluorescence et plus particulièrement de synthétiser de nouveaux traceurs fluorescents spécifiques, le deuxième volet de cette thèse est consacré au développement de nouveaux photosensibilisants pour la thérapie photodynamique (PDT). Cette dernière est une méthode de détection et un mode de traitement médical de certaines tumeurs, considérée depuis les années 80 comme une nouvelle arme thérapeutique dans la lutte antitumorale [Schuitmaker et al., 1996]. Les agents photosensibilisants sont le plus souvent des dérivés de porphyrine qui, convenablement fonctionnalisés, peuvent cibler préférentiellement les cellules tumorales. Le principe de l'effet photodynamique repose sur une modification du photosensibilisant, soumis à une lumière adéquate, qui, *via* des processus de photooxydation, entraîne une cascade réactionnelle pour finalement aboutir à la mort de la zone tumorale ciblée, sans toxicité généralisée comme dans les autres thérapies (chimio-, radio-, etc.). Parallèlement à cette capacité photodestructrice, ces molécules présentent une fluorescence intrinsèque qui leur permet d'être valorisées comme sondes de localisation des tumeurs et qui rend donc possible leur utilisation en photodiagnostic.

En cancérologie, le Photofrin[®] est le seul produit qui ait reçu une autorisation de mise sur le marché. Cependant ses effets secondaires et sa longueur d'onde d'absorption maximale relativement basse ont conduit à la recherche de différents photosensibilisants qualifiés de deuxième génération plus efficaces et plus spécifiques, certains sont en phase III des essais cliniques.

Cherchant à apporter notre contribution dans ce domaine et en concertation avec le Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre, nous avons appliqué nos connaissances en chimie hétérocyclique et en photophysique à la conception et à l'étude de nouvelles molécules photosensibilisantes comportant des cycles glucosamine. En effet, ces dernières années, l'efficacité des macrocycles glycoconjugués comme agents phototoxiques a été démontrée *in vitro* et des avancées dans ce domaine sont toujours attendues.

L'ensemble des études qui ont été développées suit le plan suivant additionné de la présente introduction générale et d'une conclusion générale ainsi que de plusieurs annexes :

Dans la **première partie**, après avoir effectué une revue bibliographique sur le marquage froid ou chaud des polysaccharides et un rappel de la littérature sur les rotors moléculaires fluorescents (tout en y ajoutant quelques exemples d'utilisation), nous présenterons la synthèse des dérivés coumarine, la synthèse des dextrans modifiés, les modifications effectuées sur les différents polysaccharides qui étaient nécessaires pour le greffage des fluorophores, la caractérisation et les études photophysiques correspondantes. Nous aborderons ensuite les tests biologiques qui concernent plus particulièrement :

- L'analyse de l'action des dextrans modifiés sur les cellules endothéliales.
- L'internalisation des polysaccharides dans les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses.
- La visualisation par microscopie de fluorescence.

Nous discuterons enfin les différents résultats et dégagerons les perspectives inhérentes à ce travail.

La **deuxième partie** est consacrée au développement de nouveaux dérivés de porphyrines glycosylés à la fois comme sondes fluorescentes pour la détection de cellules tumorales et comme produits phototoxiques. Nous présenterons la thérapie photodynamique, son fonctionnement ainsi que son mode d'action. Nous évoquerons aussi les différents photosensibilisants existants, notamment ceux possédant des groupements glycosylés en insistant sur la notion de vectorisation. Enfin, nous exposerons les travaux de synthèse effectués au laboratoire, en mettant l'accent sur les difficultés rencontrées, inhérentes à ces composés si particuliers, et les études photophysiques de caractérisation pour les produits obtenus.

Nous exposerons et discuterons les résultats, puis nous dégagerons les perspectives relatives à cette thématique.

PREMIERE PARTIE :
PARTIE A
ETUDE DE
POLYSACCHARIDES
FLUORESCENTS

I INTRODUCTION

Les polymères naturels présentent des caractéristiques uniques qui permettent l'élaboration de matériaux particulièrement adaptés au développement de propriétés relevant de l'interface chimie-biologie. Toutefois, les choix sont limités car plusieurs paramètres sont à prendre en compte : structures chimiques, propriétés physiques, biodégradabilité, événements biologiques souhaités, etc. Lorsqu'ils sont utilisés dans un contexte qui se situe en dehors de leur état natif, ces matériaux offrent de nombreuses potentialités, notamment en reconstruction tissulaire [Domard, 2001].

Les polymères d'origine végétale, tels que le dextrane, convenablement modifiés selon l'effet biologique souhaité, sont très intéressants dans le domaine des biotechnologies. Ils sont facilement modulables chimiquement, peu coûteux et exempts de tout contaminant (virus, bactéries, par exemple). Toutefois, du fait de l'absence de chromophore, il est très difficile de réaliser des études *in vitro* par visualisation en microscopie, déterminante pour comprendre les mécanismes d'action.

Afin de mieux comprendre leur rôle physiologique et leur distribution dans les systèmes vivants, une méthode consiste à les marquer à l'aide de traceurs fluorescents.

Dans des travaux antérieurs, les sondes couramment utilisées étaient la fluorescéine ou ses dérivés. Dans la présente étude, il s'agira de rotors moléculaires fluorescents présentant l'avantage d'avoir un comportement photophysique très sensible à la polarité et à la cohésion de leur environnement. Par ailleurs, par des modifications de structure des rotors (addition de doubles liaisons et fonctionnalisation), il est possible d'atteindre des domaines d'excitation/émission très différenciés pour répondre à la recherche de spécificité fluorophore/polymère en milieu biologique [Viriot et al., 1998].

II ETAT DE L'ART

II.1 LES POLYSACCHARIDES

II.1.1 Généralités : structures et applications

L'appellation polysaccharide est très vaste et contient l'ensemble des polyholosides naturels d'origines animale, marine, bactérienne ou végétale. Les polysaccharides sont des polymères de nature glucidique. Ils sont constitués d'oses (parfois de plusieurs milliers) reliés entre eux par une liaison glycosidique. On distingue les homopolysaccharides où tous les monomères sont de même nature et les hétéropolysaccharides constitués d'au moins deux sucres différents. Il existe des polysaccharides linéaires (carraghénane, alginate), linéaires substitués (galactomannane, xanthane) et des polysaccharides ramifiés (glycogène), neutres, anioniques, etc. [Marchessault, 1984]. Les monomères les plus fréquents sont des hexoses ou leurs dérivés (osamines, acides gluconiques, etc.), ils sont présents dans les polysaccharides sous cette forme ou portant des substituants comme les sulfates, les esters méthyliques, acétyléniques ou pyruviques.

Le type de liaison entre les oses varie d'un polysaccharide à un autre. Elle peut être α ou β , de type (1-4), (1-6) ... (Figure A-1).

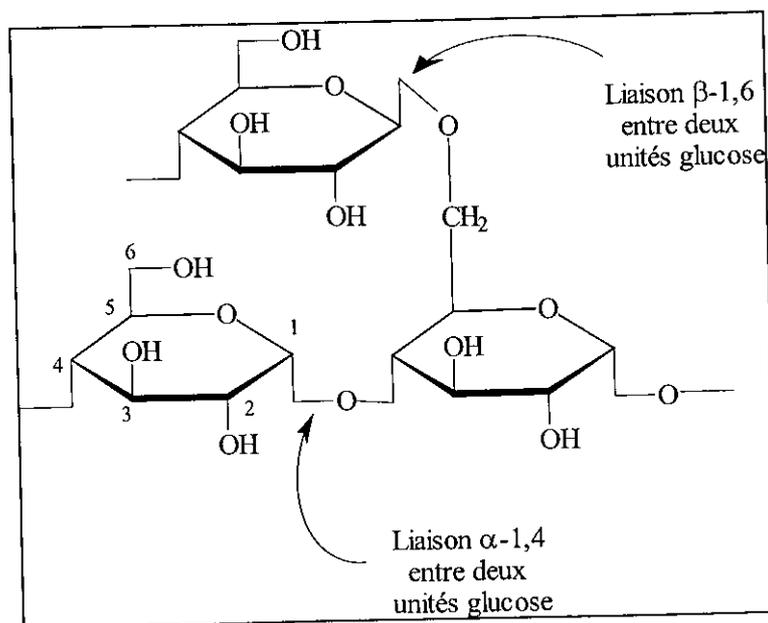


Figure A-1 : Exemples de liaison entre deux unités glucose

Ce type de liaison détermine les propriétés physico-chimiques du polymère. Par exemple, bien que l'amidon et la cellulose ne soient composés que de monomères de glucose, le fait que la liaison soit en α pour l'amidon et β pour la cellulose rend ces deux molécules très différentes.

Les polysaccharides peuvent également se combiner avec d'autres molécules telles que les protéines et les lipides pour former les glycoprotéines et les glycolipides. Ces molécules jouent un rôle important au niveau des membranes cellulaires en tant que récepteurs, molécules de reconnaissance (par les lectines par exemple). Les glycolipides confèrent aux bactéries l'originalité de leur paroi. De même, la paroi de la plupart des procaryotes et des plantes est constituée de polysaccharides.

De nombreux polysaccharides naturels extraits de la paroi cellulaire des végétaux ou synthétisés par les microorganismes sont exploités de manière industrielle. Ils présentent un enjeu économique très important. Ils sont utilisés généralement comme agents de texture et suivant leur structure comme stabilisant, épaississant ou gélifiant.

Toutefois, ces sucres n'ont pas toujours les propriétés physico-chimiques souhaitées pour leurs différentes applications ; ils peuvent être modifiés chimiquement par différentes réactions : estérification, étherification grâce aux fonctions alcool, permettant soit d'améliorer leurs propriétés déjà existantes, soit de leur en conférer de nouvelles, élargissant ainsi leur domaine d'application. La dégradation et la réticulation sont également des modifications chimiques qui contribuent à la variation (augmentation ou diminution) de la viscosité et induisent ainsi une modification des propriétés rhéologiques des polysaccharides. Ces composés modifiés sont utilisés dans des domaines très variés comme l'agro-alimentaire, la papeterie, la médecine, l'industrie du pétrole et du textile.

Depuis plusieurs années, le Laboratoire de Recherche sur les Macromolécules s'intéresse plus particulièrement à une classe de polymère : le dextrane. Modifié chimiquement de manière judicieuse, ce polymère hydrosoluble présente de nombreuses activités biologiques que nous allons passer en revue.

Le dextrane

11.1.2.1 Description structurale

Le dextrane est un nom commun donné à une grande classe de polysaccharides obtenus par fermentation de microorganismes et composés exclusivement d'un enchaînement d'unités α -D-glucopyranose, principalement liées par des liaisons α (1 \rightarrow 6), mais pouvant toutefois contenir une proportion variable de liaisons α (1 \rightarrow 2), α (1 \rightarrow 3) et α (1 \rightarrow 4). Ce polymère est obtenu à partir de différentes souches de bactéries (*Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Lactobacillus*) par une enzyme, la dextransucrase, avec le sucrose comme substrat en milieu anaérobie [Miller et al., 1986]. Chacune des souches bactériennes produit un dextrane différent en structure et en propriété (masse molaire, degré de branchement des macromolécules, proportion relative des différentes liaisons glycosidiques, solubilité et propriétés physico-chimiques).

Le dextrane le plus répandu est produit par la souche *Leuconostoc mesenteroides* NNRL B-512(F) qui a été la plus étudiée pour les applications industrielles. Il est constitué de 95% d'une chaîne principale linéaire de résidus glycosylés liés par des liaisons α -D-(1 \rightarrow 6) (Figure A-2) et de 5% de chaînes branchées par des liaisons α -D-(1 \rightarrow 3) [Jeanes, 1965].

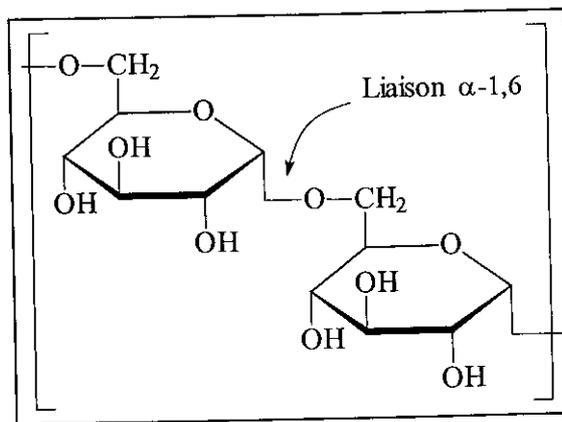


Figure A-2 : Structure de la chaîne principale du dextrane

Le dextrane natif est un polymère de masse molaire très élevée (10^7 à 10^8 g.mol⁻¹) et très polydisperse (Mp/Mn = 100 à 1 000). Le dextrane clinique est obtenu par différentes méthodes de dégradation : enzymatique, thermique, chimique ou par irradiation ;

l'hydrolyse suivie de fractionnement permet une diminution de la polymolécularité ($M_p/M_n = 1,2$ à $1,5$) et du degré de branchement.

Le dextrane présente une très grande solubilité en milieux aqueux et dans certains solvants organiques très polaires (formamide, diméthylformamide) du fait de la proportion de liaisons glycosidiques de type α -D-(1→6).

La nature de la liaison glycosidique, selon qu'elle est du type α (1→2), α (1→3), α (1→4) ou α (1→6), procure au polymère une sensibilité différente aux conditions de dégradation. Ainsi, la proportion élevée de liaisons α (1→6) confère au dextrane une meilleure stabilité dans les conditions acide ou basique [Antonini et al., 1964].

Les trois fonctions hydroxyle libres en position 2, 3, 4, du résidu glycosylé sont susceptibles d'être substituées par différents groupements chimiques neutres, chargés positivement ou négativement. La répartition des différents substituants et leur proportion relative sont fonction de la réactivité des fonctions hydroxyle, celle située sur le carbone 2 semble la plus réactive [Krentsel et al., 1997]. Ainsi, différents types d'esters et d'éthers de dextrane peuvent être obtenus avec diverses propriétés qui dépendent du type de substituant, du degré de substitution et de la masse molaire du dextrane.

II.1.2.2 Propriétés

Le dextrane et ses dérivés, le plus souvent inertes, couvrent un champ très large d'application : industrie agro-alimentaire, domaine biomédical, cosmétique, ... Des dextrans partiellement hydrolysés sont employés comme substituts du plasma sanguin. Le dextrane est aussi très utilisé comme support chromatographique. Le Sephadex® provenant d'une réticulation du dextrane par amination réductrice est utilisé en chromatographie d'exclusion stérique basse pression. Par substitution du Sephadex® par des groupements diéthylaminoéthyle ou carboxyméthyle, on obtient des supports de chromatographie d'échange d'ions.

Ce polymère hydrosoluble établit des interactions hydrogène avec l'eau et peut épaissir, gélifier ou stabiliser une solution. Ses propriétés rhéologiques (capacité à modifier la viscosité d'une solution) et sa biocompatibilité en font un matériau de choix pour des gels biologiques ou comme matrice utilisable pour la libération contrôlée ou retardée de médicaments.

Mais l'intérêt de ce polysaccharide, ses propriétés rhéologiques mises à part, réside aussi dans ses propriétés biospécifiques intéressantes vis-à-vis de différents constituants du vivant, générées par l'intermédiaire de modifications chimiques.

II.1.3 Les dextrans modifiés : structures et fonctions

Les dextrans substitués sont obtenus en se basant sur le principe suivant : la substitution statistique d'un polymère préformé par des groupes fonctionnels convenablement choisis peut générer la biospécificité. Dans ce contexte et depuis plusieurs années, le LRM étudie une famille de polysaccharides modifiés : les CMDBS ou Carboxyméthyl-dextrans Benzylamide Sulfate/Sulfonate, possédant diverses activités biologiques.

Les polymères décrits sont préparés à partir d'un dextrane natif de masse molaire moyenne de $40\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Ce dextrane ne présente pas de risque d'accumulation dans l'organisme, car il est facilement excrété.

Historiquement, le but de la synthèse de dextrans fonctionnalisés était d'obtenir des composés antithrombiques "heparin-like". Les héparines d'origine naturelle risquent de véhiculer des agents infectieux. En outre, l'utilisation prolongée d'héparine peut entraîner des complications comme des allergies ou des hémorragies. Beaucoup d'efforts ont été déployés depuis près de vingt ans pour purifier différents antithrombiques "heparin-like", comme le polysulfate de pentosane, le sulfate de dermatane, le sulfate de chondroïtine, les fucanes ou les carraghénanes extraits d'algues brunes, les dérivés de l'héparine ou les poly(glycosyloxyéthyl) méthacrylates sulfatés. Les dérivés du dextrane sont des macromolécules synthétiques avec des groupes chargés presque similaires à ceux du site actif de l'héparine et conçus pour mimer ce polysaccharide naturel. Cette approche implique la substitution de polymères avec différents groupements chimiques.

Par ailleurs, au LRM, la substitution statistique du dextrane (D) avec trois groupements chimiques différents, carboxyméthyle (CM), benzylamide (B) et sulfate/sulfonate (Su/S) (Figure A-3) a permis d'obtenir une famille de polymères présentant certaines propriétés équivalentes à celles de l'héparine [Mauzac et Jozefonvicz, 1984].

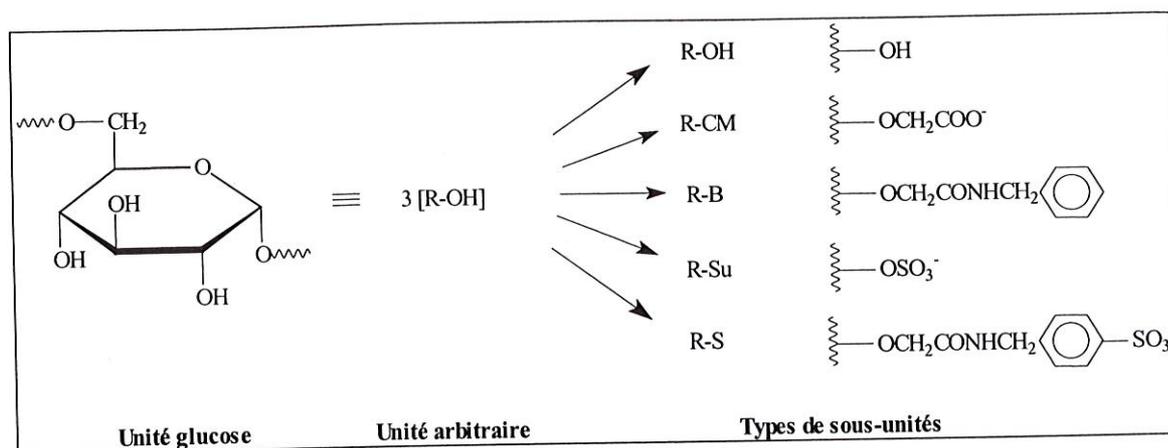


Figure A-3 : Structure schématique des CMDBS

Si l'on considère l'unité glucose comme l'addition de trois sous-unités alcool qui peuvent être fonctionnalisées, les dérivés du dextrane peuvent être considérés comme des copolymères de ces sous-unités, ce qui permet d'accéder facilement aux degrés de substitution [Chaubet et al., 1995].

La disposition de ces groupements chimiques est aléatoire le long de la chaîne macromoléculaire et dépend de la composition globale du polymère. Par exemple, l'activité anticoagulante des CMDBS est dépendante de la masse moléculaire et de la proportion en groupements CM et Su/S [Mauzac et Jozefonvicz, 1984 ; Chaubet et al., 1995]. Outre l'activité anticoagulante, les CMDBS possèdent une série d'activités biologiques : inhibition de l'activation du complément, amélioration *in vivo* de la cicatrisation chez le rat, activité antivirale, effet antiprolifératif sur les CML d'aortes de rat *in vitro* [Letourneur et al., 1993a] et stimulation *in vitro* de la prolifération de cellules endothéliales provenant de cordons ombilicaux humains [Letourneur et al., 1993b].

Parallèlement aux CMDBS, les CMDB en absence de groupements sulfate et sulfonate, ne présentent pas d'activité anticoagulante. Les CMDB possèdent cependant d'autres activités biologiques : activité *in vitro* et *in vivo* antitumorale de cellules épithéliales mammaires [Bittoun et al., 1999] et stimulation *in vitro* de la croissance de cellules endothéliales.

II.1.4 L'héparine : structure et fonctions

En 1916, Mac Lean découvre une substance qui retarde la coagulation du sang. Comme elle provient du foie (*hepar grec*), elle est nommée héparine. L'héparine est un polysaccharide naturel de type glycosaminoglycane (hétéropolysaccharide linéaire possédant une séquence disaccharidique répétée caractéristique) distribué dans le tissu animal, particulièrement

concentré dans le système réticulo-endothélial et stocké en particulier dans les poumons, l'intestin et le foie. La structure majoritaire de l'héparine est l'acide α -L-iduronique-2-OSO₃⁻-(1-3)- α -D-glucosamine SO₃⁻-6-OSO₃⁻ (Figure A-4). L'héparine endogène, sous forme de chaînes macromoléculaires d'environ 750 000 g.mol⁻¹, ne possède que 10 à 20% de l'activité anticoagulante de l'héparine commerciale dont la masse molaire moyenne est de 15 000 g.mol⁻¹.

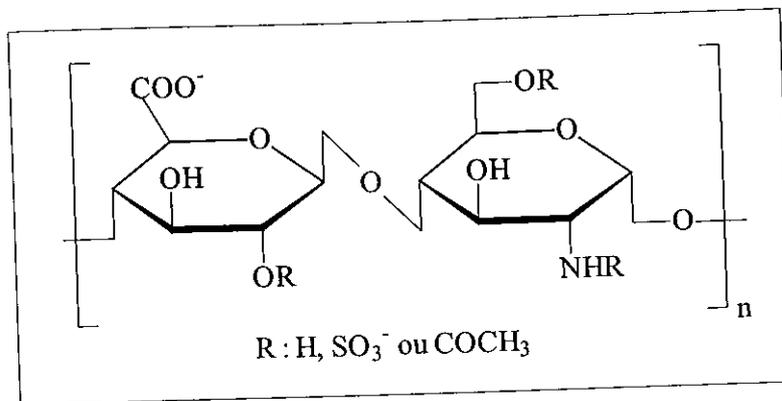


Figure A-4 : Structure de l'héparine

La biosynthèse de l'héparine s'effectue dans les mastocytes situés dans le tissu conjonctif de la paroi interne des vaisseaux sanguins. Cette large distribution, en particulier dans le système vasculaire, est essentielle pour assurer l'intégrité de la paroi interne des vaisseaux sanguins. Ce polysaccharide anionique est capable d'interférer avec la coagulation sanguine en accélérant l'inactivation des enzymes de coagulation par des inhibiteurs plasmatiques naturels tels que l'antithrombine (AT) et le cofacteur II (HCII). L'activité anticoagulante de l'héparine est expliquée principalement par la forte concentration en groupes sulfate, sulfamate et acide carboxylique, associée à l'ordre stérique et à la conformation le long de la chaîne, mais également à la présence de séquences spécifiques. Des preuves ont été apportées sur l'existence d'une séquence pentasaccharidique très spécifique contenant des entités glucosamine 3,6-O et 6-O sulfatée et qui représente un site de liaison qui est reconnu par l'AT. Parallèlement à cette activité anticoagulante, l'héparine possède d'autres effets pharmacologiques comme une capacité inhibitrice sur la prolifération des cellules musculaires lisses *in vitro* et *in vivo* [Clowes et Karnowski, 1977]. La prolifération et la migration des cellules musculaires lisses jouent un rôle fondamental dans les plaques d'athérome et dans la resténose après angioplastie. L'héparine par son effet inhibiteur, limite la formation de plaques d'athérome *in vivo*, mais sa capacité anticoagulante ne permet pas de l'utiliser de façon prolongée. Les mécanismes d'action ne sont pas totalement élucidés. Une hypothèse suppose que l'effet antiprolifératif de l'héparine s'effectuerait grâce à la

présence de sites spécifiques de haute affinité présents à la surface des cellules musculaires lisses [Letourneur et al., 1995].

II.2 MARQUAGE DES POLYSACCHARIDES

II.2.1 Problème de mise en évidence. Nécessité d'un marquage

En absence de groupement chromophore, les méthodes de caractérisation des polysaccharides sont relativement restreintes. Les tests colorimétriques permettent de mettre en évidence les sucres totaux. Toutefois, ces méthodes sont peu sensibles et sont inadaptées à la CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) ou l'électrophorèse [El Rassi, 1995].

Dans le cadre d'une étude structurale et biologique, il est important de pouvoir détecter la molécule d'intérêt à chaque étape et quelle que soit la technique utilisée. Les méthodes actuelles analytiques des oses consistent à fixer de manière covalente, à la chaîne polysaccharidique, un atome ou une molécule pour former un composé fortement absorbant en UV, fluorescent ou radioactif. Ce composé peut être étudié par différentes techniques analytiques et structurales si le choix du marqueur et son emplacement sont pertinents. En effet, pour le marquage de polysaccharides bioactifs, il est important de fixer un nombre connu et le plus restreint possible de molécules de traceurs, afin de ne pas modifier les propriétés et les activités biologiques tout en offrant une grande sensibilité de détection. Le marquage peut se réaliser par substitution lorsque par exemple un atome d'hydrogène est remplacé par son isotope radioactif ou par une réaction d'addition d'un marqueur froid.

L'objectif de cette revue bibliographique est de répertorier les différentes techniques de marquage des polysaccharides les plus adaptées pour répondre aux exigences des milieux biologiques.

II.2.2 Marquage radioactif des polymères

II.2.2.1 Généralités : Historique et méthodes

Trois grands savants français, Henri Becquerel, Pierre et Marie Curie ont contribué à la découverte de la radioactivité, le premier mettant le phénomène en évidence, les deux autres en en donnant l'interprétation, et en lui apportant leur nom. Cette découverte a été le point de départ d'une multitude d'applications médicales qui se sont progressivement amplifiées et diversifiées [Frangin et al., 1997]. Les premières utilisations des radiomarqueurs ont porté sur l'exploration de la thyroïde avec l'iode 131.

Le développement de la biologie au cours du XX^{ème} siècle a très largement reposé sur l'exploitation des propriétés du noyau atomique et des rayonnements.

La notion de marquage et de traceurs isotopiques est essentielle. Elle a permis l'étude des grandes fonctions du vivant, de la cellule à l'organisme entier et est à la base de l'imagerie médicale moderne.

Aujourd'hui, presque toutes les petites molécules courantes sont disponibles sous une forme radioactive dans le commerce et pratiquement toute molécule biologique quel que soit son degré de complexité peut être marquée par radioactivité. Les radiations peuvent être détectées par plusieurs techniques. Le comptage proportionnel (compteur Geiger), le comptage en liquide scintillant et l'autoradiographie sont les techniques les plus utilisées en biochimie. Les compteurs proportionnels détectent électroniquement l'ionisation d'un gaz provoquée par le passage de radiations. Dans la technique du comptage en liquide scintillant, un échantillon radioactif est dissous ou mis en suspension dans une solution de substances fluorescentes qui émettent des photons sous l'action des radiations. Le noyau émetteur peut ainsi être identifié car l'intensité photonique est proportionnelle à l'énergie de la radiation (le nombre de molécules fluorescentes excitées par une particule radioactive est proportionnel à l'énergie de la particule). Dans le cas de l'autoradiographie, la radiation est révélée par son noircissement sur une pellicule photographique.

II.2.2.2 Marquage radioactif des polysaccharides

Pour l'étude des fonctions biologiques, les traceurs isotopiques les plus couramment utilisés sont le tritium, l'iode 125 et l'iode 131, le soufre 35, le carbone 14 et le phosphore 32 dont les caractéristiques sont regroupées dans le Tableau A-1.

Isotope	Radiation	Demi-vie*
^{32}P	β	14 jours
^{131}I	β, γ	8,1 jours
^{125}I	γ	59,4 jours
^{35}S	β	87 jours
^3H	β	12,3 années
^{14}C	β	5 570 années

Tableau A-1 : Quelques radioisotopes d'un usage courant en Biologie

* La demi-vie est le temps correspondant à la désintégration de 50% des atomes d'un isotope

Les radioéléments permettent une détection très faible qui est de l'ordre du picogramme.

Parmi les radiomarqueurs sont distingués :

- les radiotraceurs proprement dits qui proviennent de la molécule de référence par remplacement de l'un ou de plusieurs de ses atomes constitutifs par des radioisotopes des mêmes atomes, à l'exclusion de toute addition d'atomes supplémentaires,
- les analogues radioactifs de la substance considérée qui résultent de l'adjonction à la molécule d'un ou de plusieurs radioisotopes ou de groupes chimiques supplémentaires porteurs du ou des radionucléide(s). Dans ce cas, il est nécessaire d'effectuer une étude du comportement biologique de la nouvelle substance obtenue.

Nous allons présenter les différentes méthodes pour marquer les polysaccharides avec des traceurs radioactifs.

➤ Marquage radioactif à l'iode 125

C'est la méthode la plus utilisée afin d'obtenir un radioligand, elle présente plusieurs avantages :

- L'iode 125 (Na^{125}I), est une molécule peu coûteuse, assez peu ionisante, mais suffisamment énergétique pour que le rayonnement émis soit mesurable.
- Les méthodes d'incorporation de l'iode radioactif font appel à une chimie simple (simple substitution nucléophile si la structure de la biomolécule l'autorise).
- La période de cet élément (60 jours) est 73 fois plus courte que celle du tritium (12,3 ans). Tous les 60 jours, la radioactivité spécifique des déchets iodés sera diminuée par deux. Très rapidement, ces déchets ne seront plus radioactifs.

- Le rendement de conversion électrochimique sur film photographique de l'iode 125 est de 3-10% (selon le type de film) alors que celui du tritium est inférieur à 1%. L'image sera obtenue 200-500 fois plus vite avec un ligand marqué à l'iode plutôt que le tritium.

Les polysaccharides peuvent être couplés à l'iode 125 par une méthode calquant le radiomarquage des protéines dépourvues de tyrosine. Les polysaccharides sont marqués par l'intermédiaire d'une molécule de liaison, le 3-(4-hydroxy-3,5-¹²⁵I)diiodophényl) propionate de N-succinimidyle ou réactif de Bolton et Hunter [Bolton et Hunter, 1973]. Il est nécessaire au préalable de greffer un groupement amino sur le polysaccharide (Figure A-5). Le marquage est réalisé en solution aqueuse avec un temps de réaction le plus court possible du fait de l'instabilité de la fonction amide du réactif de Bolton.

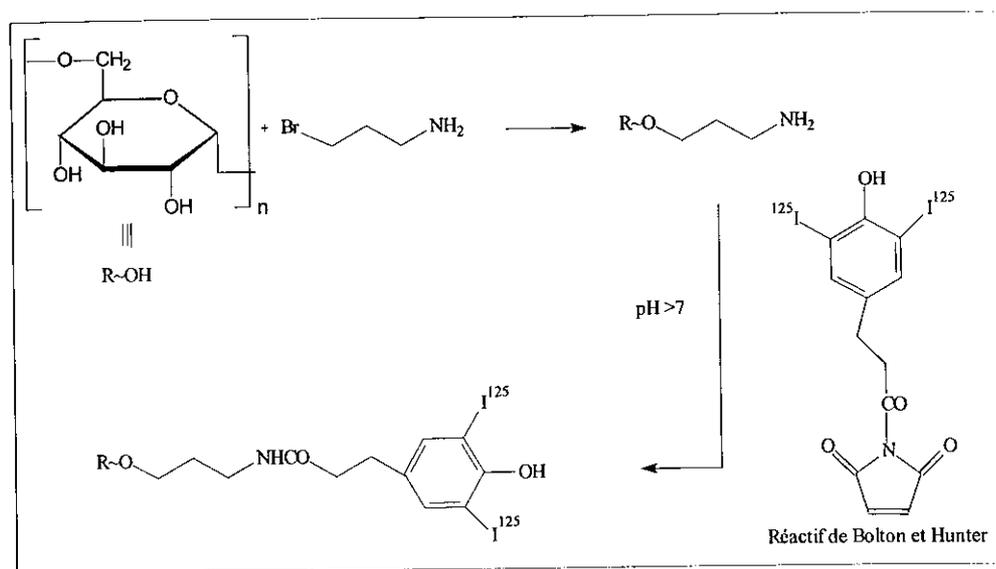


Figure A-5 : Marquage des polysaccharides à l'aide du réactif de Bolton et Hunter

Une autre méthode de marquage, utilisée notamment pour l'héparine, consiste à traiter l'héparine par de l'acide nitrique pour obtenir des fragments de bas poids moléculaire terminés par du 2,5-anhydromannose, qui peut réagir ensuite avec un groupement tyramine (4-amino-éthylphénol) par amination réductrice en présence de cyanoborohydrure de sodium. Il est alors possible de radiomarquer le résidu aryle par de l'iode 125 ou 131 par réaction d'oxydation avec de la chloramine T (Figure A-6) [Malsch et al., 1994 ; Harenberg et al., 1996].

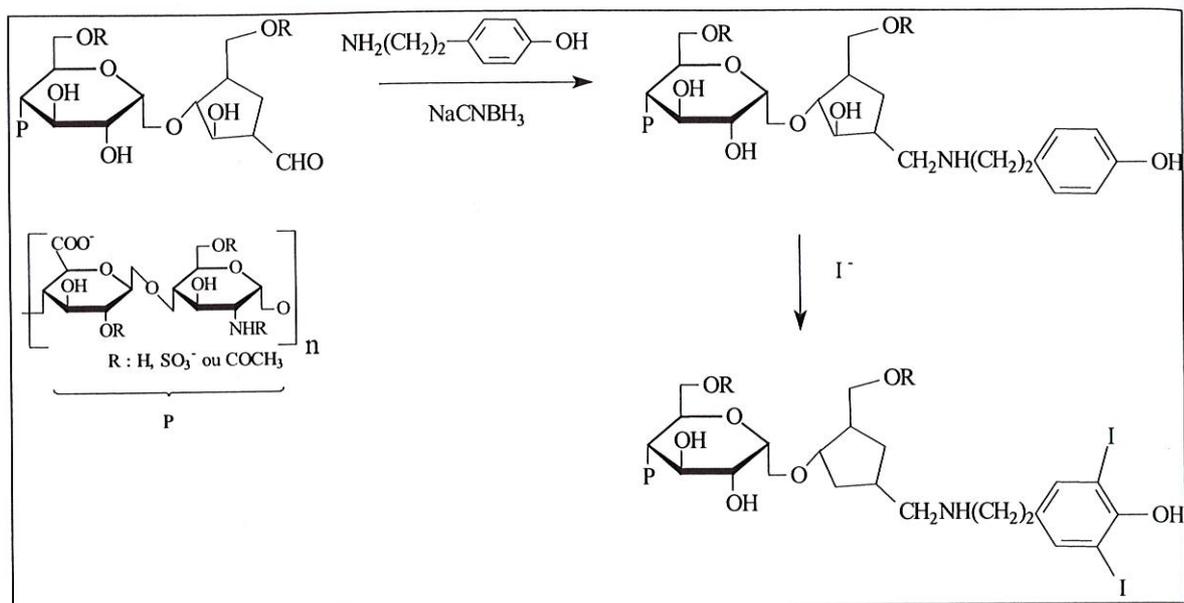


Figure A-6 : Marquage indirect à l'iode de l'héparine selon la méthode de Malsch

Il est possible également de radiomarquer à l'iode 125 des polysaccharides préalablement couplés à la fluorescéinamine en incubant les polysaccharides fluorescents comme l'héparine avec des billes appelées "iodobeads" et une solution de Na^{125}I [Glabe et al., 1983 ; Logeart et al., 1997].

➤ Marquage radioactif au tritium

En ce qui concerne les polysaccharides, les extrémités carbonyle peuvent être réduites en alditoles de manière stœchiométrique avec du borohydrure de sodium tritié (NaBT_4) (Figure A-7). Le tritium se fixe sur les unités glycosyle terminales par réduction. Ces dérivés radiomarqués ont des caractéristiques chimiques équivalentes et des propriétés biologiques identiques aux composés natifs. Le rapport $[\text{NaBT}_4]/[\text{polysaccharide}]$ doit être d'environ 20 pour obtenir un rendement optimal. De tels marquages ont été réalisés sur l'héparine [Hatton et al., 1980 ; Atha et al., 1984]. Les ligands tritiés, une fois marqués et purifiés, sont utilisables pendant des années (demi-vie = 12,3 ans). Il faut néanmoins les maintenir dans un solvant organique pour éviter les échanges isotopiques du tritium avec les protons de l'eau. Le faible encombrement stérique apporté par le groupement tritié permet, dans certains cas, d'avoir à disposition des ligands ayant une meilleure affinité que leurs homologues iodés.

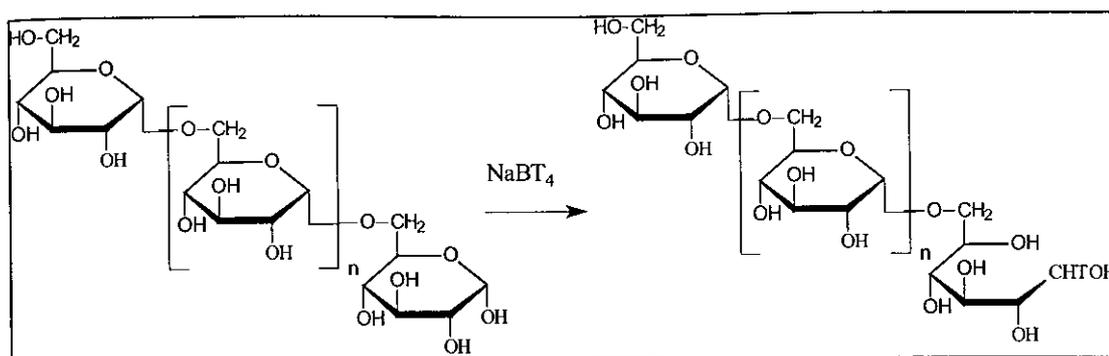


Figure A-7 : Marquage d'un polysaccharide au tritium

➤ Marquage radioactif au soufre 35

Le marquage d'héparanes sulfates a été réalisé par voie enzymatique en utilisant des cellules en culture *in vitro* et du $(\text{Na})_2(^{35}\text{S})\text{O}_4$ dans le milieu de culture. Les glycosaminoglycanes de la surface cellulaire ayant incorporé du ^{35}S sont ensuite extraits et purifiés [Biswas, 1988 ; Shworak et al., 1994]. Cette méthode par voie enzymatique est particulière et ne peut être généralisée à tous les glycanes.

II.2.2.3 Bilan des méthodes de marquage radioactif

Les protocoles de marquage des polysaccharides par des radioisotopes sont relativement simples et rapides. Cependant, le matériel et l'infrastructure obligatoires pour l'utilisation de radioisotopes sont coûteux et nécessitent l'obtention d'autorisations ; se posent aussi les problèmes du stockage et de l'élimination des déchets radioactifs.

Par ailleurs, relativement au marquage de polysaccharides, nous avons vu qu'il était souvent nécessaire de les modifier chimiquement du fait de l'absence de groupements réactifs adéquats. L'échange isotopique est une solution, mais très peu de laboratoire la pratique. C'est pourquoi les chercheurs ont été amenés à développer d'autres techniques de marquage dites froides et en particulier *via* la fluorescence [Mayer et Neueenhofer, 1994].

II.2.3 Marquage fluorescent des polysaccharides

Dans le domaine de la biologie, les techniques de fluorescence sont de plus en plus utilisées pour visualiser la structure et la dynamique de la matière des systèmes vivants [Lakowicz, 1999]. De nombreuses applications requièrent que le traceur fluorescent soit lié chimiquement à une protéine, un acide nucléique, un médicament ou toute autre molécule

qui puisse interagir sélectivement avec un récepteur. L'immunofluorescence est par exemple une application classique pour ce type de sonde fluorescente.

En général, les fluorophores sont modifiés chimiquement afin d'introduire un groupe fonctionnel pouvant réagir avec un site particulier d'une biomolécule. De nombreuses sondes fluorescentes contiennent différents types de groupes fonctionnels développés essentiellement pour la modification des protéines (Tableau A-2).

Groupe fonctionnel	Site réactif
Réactifs typiques "amine"	
Isocyanate	Amine, Alcool, Phénol
Anhydride et halogénure d'acide	Amine, Alcool, Phénol
Nitrile	Amine, Alcool
Ester d'imide	Amine
Chlorure de sulfonyle	Amine, Phénol
Dichlorotriazine	Amine, Phénol
Isothiocyanate	Amine
Azide	Amine (Alcool après réarrangement de Curtius)
Ester activé	Amine
Aldéhyde	Amine, Amide
Réactifs typiques "thiol"	
Iodoacétamide	Thiol, Amine
Halogénure d'alkyle	Thiol, Amine, Imidazole, Phénol
Disulfide	Thiol, Imidazole, Phénol
Thiosulfate	Thiol
Réactifs typiques "acide carboxylique"	
Diazoalkane	
Carbodiimide	
Amine aliphatique primaire ou secondaire	
Amine	
Dérivés d'hydrazine	
Halogénure d'alkyle	
Alcool	

Tableau A-2 : Groupes fonctionnels communs et leurs sites réactifs [Haugland, 1991]

D'après le Tableau A-2, les fluorophores peuvent être séparés en deux groupes, en fonction de leur groupement réactif : les groupements réactifs sur les amines (peptides, protéines, oligonucléotides) et les groupements réactifs sur les thiols (protéines).

En ce qui concerne les polysaccharides, les méthodes d'investigation sont restreintes, car il existe peu ou pas de groupement fonctionnalisable si ce n'est les groupements hydroxyle ou les extrémités réductrices du sucre terminal. Deux types de réaction sont donc envisageables : soit greffer le fluorophore sur les fonctions hydroxyle, soit faire réagir l'extrémité réductrice du polysaccharide. Nous allons passer en revue les fluorophores les plus couramment utilisés en synthèse.

II.2.3.1 Réaction sur les fonctions alcool

Les fonctions alcool sont présentes en grand nombre le long d'une chaîne polysaccharidique, il est donc possible de fixer plusieurs molécules de traceurs. Ceci permet une meilleure détection du signal mais peut poser des problèmes quant à l'intégrité des fonctions biologiques des oses marqués. La fixation du marqueur peut avoir lieu au niveau d'un site de reconnaissance et empêcher par exemple l'interaction protéine-sucre.

Les fonctions hydroxyle des polyols sont peu réactives, mais elles peuvent être activées, afin d'y fixer un marqueur, par amination en milieu basique, *via* un bras espaceur de type bromopropylamine [Prigent-Richard et al., 1998]. Une autre voie de marquage consiste à faire réagir le bromure de cyanogène avec les fonctions hydroxyle pour générer une fonction imidocarbonate, qui peut alors réagir avec une fonction amine [Kohn et Wilchek, 1978] (Figure A-8).

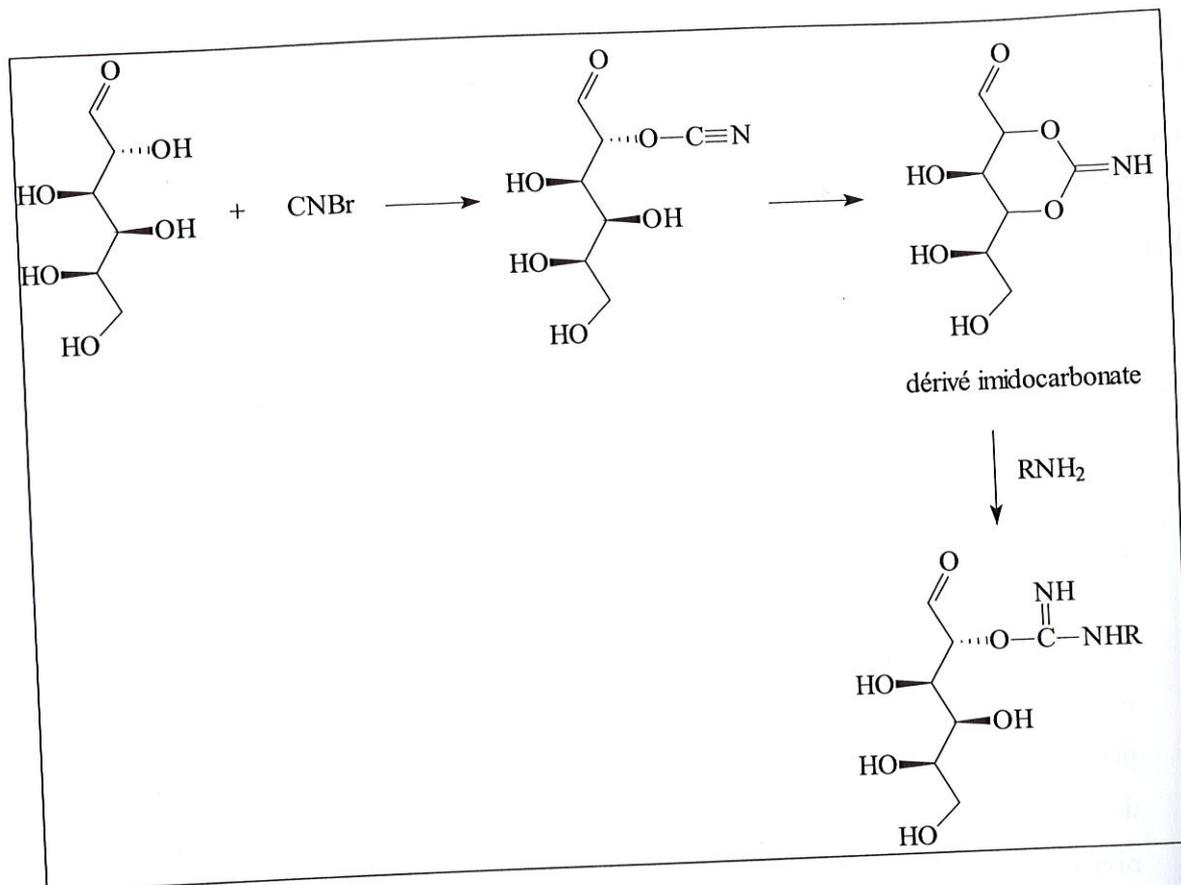


Figure A-8 : Mécanisme d'activation de fonctions alcool par le bromure de cyanogène

II.2.3.1.1 Marquage avec des dérivés de la fluorescéine

Il existe différents dérivés de la fluorescéine utilisés dans le marquage des polysaccharides. Trois principaux dérivés sont représentés dans la Figure A-9.

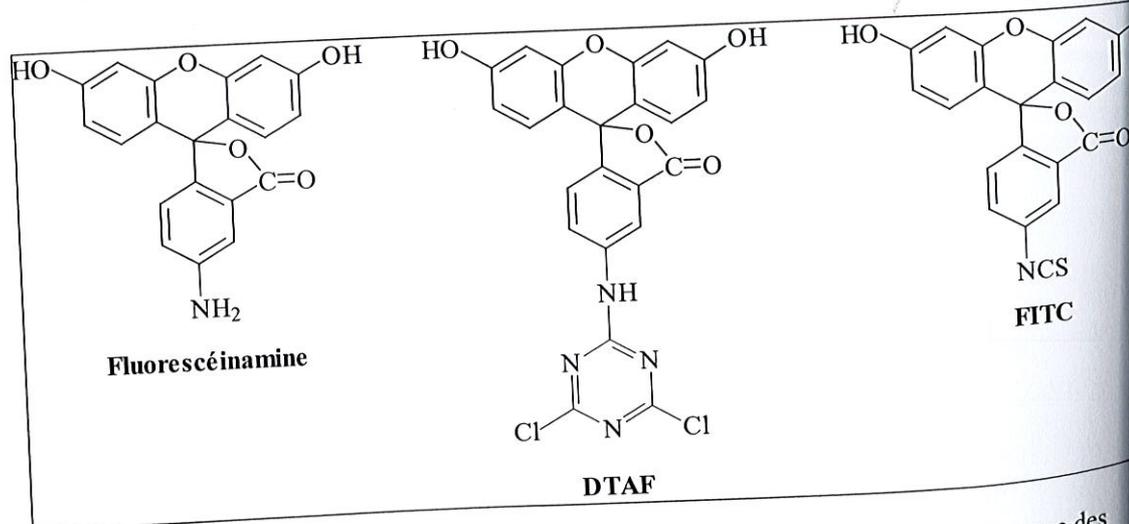


Figure A-9 : Les dérivés principaux de la fluorescéine utilisés dans le marquage des polysaccharides

➤ Marquage avec la FITC

La sonde fluorescente probablement la plus courante est un dérivé de la fluorescéine : la fluorescéine isothiocyanate (FITC). La FITC réagit directement avec les fonctions hydroxyle, pour donner des O-(fluorescéinylthiocarbamyl)polysaccharides, ou les fonctions amino pour donner les N-(fluorescéinylthiouréyl)polysaccharides [Uchiyama et Nagasawa, 1981]. Toutefois, si le polysaccharide comporte des fonctions sulfate, cette méthode est déconseillée, car elle entraîne des réactions de désulfatation par solvololyse [Glabe et al., 1983 ; Liberda et al., 1997]. Par ailleurs, le dextrane-FITC existe sous forme commerciale [Atkins et al., 1993 ; De Smedt et al., 1997 ; Vassiliou et al., 1998].

➤ Marquage à la fluorescéinamine

En activant les fonctions hydroxyle du polysaccharide par le bromure de cyanogène, la fluorescéinamine est greffée pour donner un dérivé fluorescent comportant une fonction isourée. Cette méthode a été utilisée pour marquer différents polysaccharides (héparine, dextrane, sulfate de chondroïtine) afin de localiser par microscopie de fluorescence des complexes sucres-lectine [Glabe et al., 1983 ; Arnosti et al., 2000].

➤ Marquage à la DTAF

La DTAF (Dichloro-Triazine-Amino-Fluorescéine) est plus stable que la fluorescéine. Il est nécessaire de greffer au préalable sur le polysaccharide un bras espaceur de type bromopropylamine, dont la fonction amine primaire peut réagir spontanément sur un chlore du DTAF [Prigent-Richard et al., 1998]. Cette méthode a été utilisée pour marquer l'héparine et le fucane. La DTAF peut aussi être couplée à l'¹²⁵I [Stearns et al., 1997].

II.2.3.1.2 Marquage à l'anhydride N-méthylisatoïque

Cette méthode permet de faire réagir directement le polymère de type dextrane ou héparine, sans bras espaceur, avec l'anhydride N-méthylisatoïque en milieu basique (Figure A-10) [Deangelis, 2000].

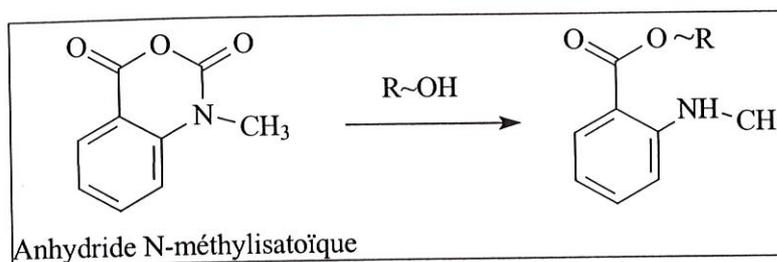


Figure A-10 : Synthèse du 2-(N-méthylbenzoyl)-polysaccharide

II.2.3.2 Réaction sur les extrémités réductrices

Il est parfois utile de faire un marquage à un seul endroit de la chaîne polysaccharidique. La fonction carbonyle des sucres réducteurs est un site privilégié pour réaliser des réactions d'addition. La méthode la plus courante consiste à faire réagir une amine sur l'aldéhyde afin de former une base de Schiff. La double liaison de cette forme instable est ensuite réduite par le cyanoborohydrure de sodium (Figure A-11) [Hase et al., 1984].

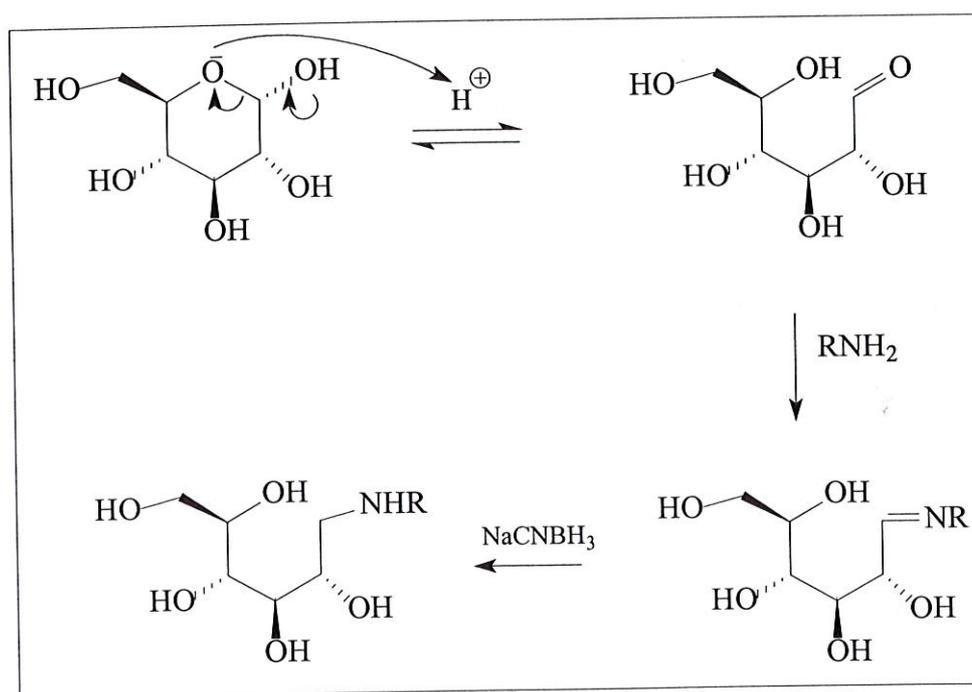


Figure A-11 : Mécanisme réactionnel de l'amination-réduction [Hase et al., 1984]

Le marqueur est fixé par une liaison covalente non hydrolysable à la molécule d'intérêt. L'avantage de cette réaction est sa spécificité, elle permet une analyse quantitative. Cependant la sensibilité de détection diminue quand le poids moléculaire augmente.

Parmi les marqueurs aminés usités pour ce type de réaction, les plus utilisés sont les suivants :

➤ 2-Aminopyridine (2-AP)

Le marquage de mono et d'oligopolysaccharides *via* la 2-aminopyridine (Figure A-12) est décrit pour la première fois en 1984 par Hase. Ce composé a été utilisé pour l'analyse du métabolisme *in vitro* et *in vivo* de sulfate de dextrane [Araki et al., 2001].

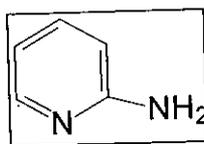


Figure A-12 : Structure de la 2-aminopyridine

➤ Acide 8-aminonaphtalène-1,3,6-trisulfonique (ANTS) et acide 8-aminopyrène-1,3,6-trisulfonique (APTS)

La structure chimique de ces deux marqueurs (Figure A-13) et la position de marquage sont telles qu'ils peuvent être utilisés pour l'analyse structurale. Ils sont aussi adaptés à une analyse des fonctions biologiques pour un suivi des composés lors de l'interaction protéine-sucre [O'Shea et al., 1998].

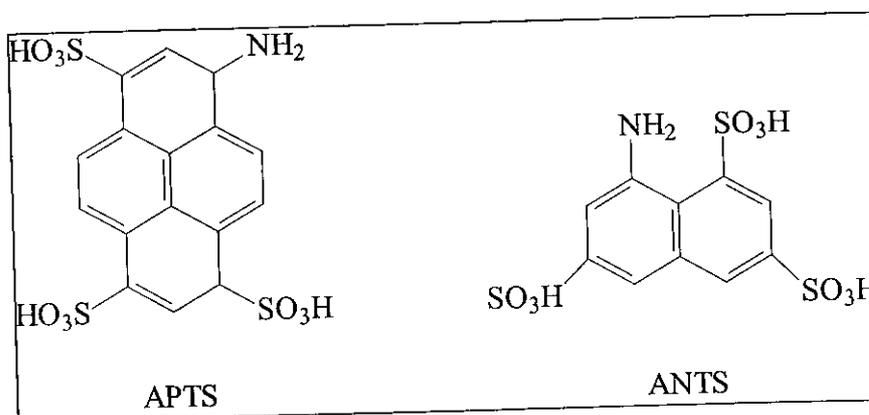


Figure A-13 : Structures de l'APTS et de l'ANTS

➤ 2-Aminoacridone ou 2-AMAC

Le marqueur 2-AMAC (Figure A-14) est surtout utilisé en analyse structurale des polysaccharides [Calabro et al., 2000].

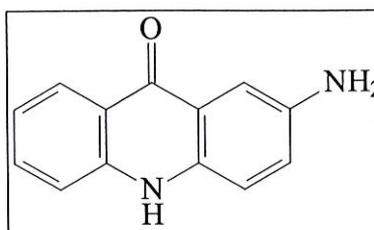


Figure A-14 : Structure 2-aminoacridone

➤ Biotine

La biotine est utilisée dans différents modes de détection (UV, fluorescence). La fonction acide de la biotine activée est tout d'abord couplée à une fonction amine de la 2,6-diaminopyridine. La fonction amine libre est ensuite couplée à l'extrémité réductrice du polysaccharide (Figure A-15) [Rothenberg et al., 1993].

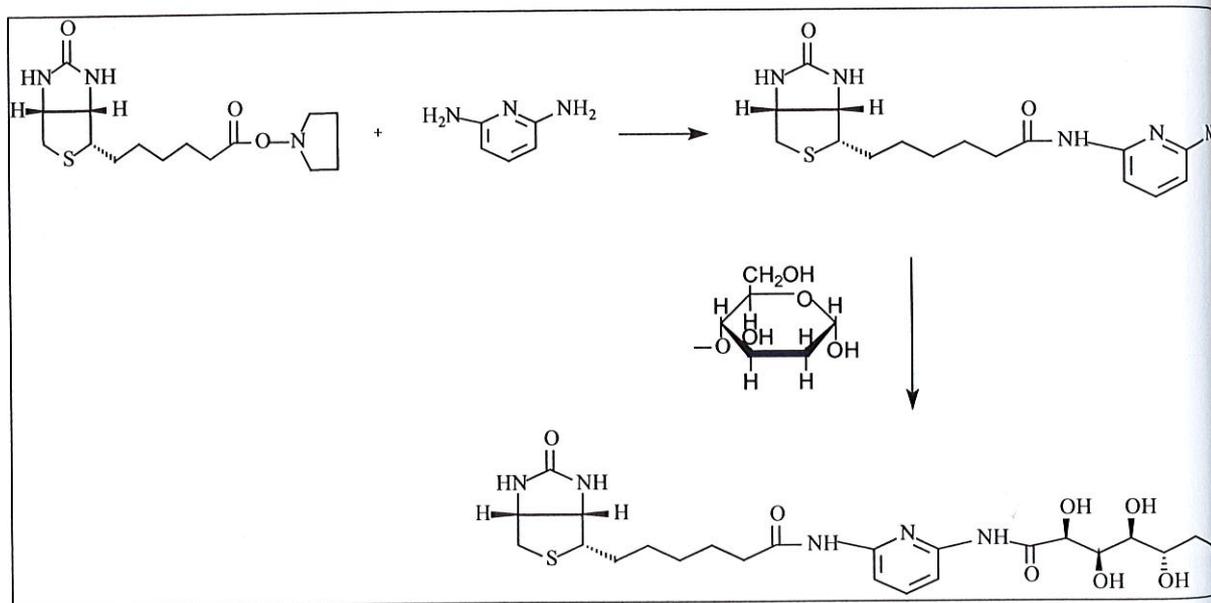


Figure A-15 : Biotinylation sur l'extrémité réductrice d'un polysaccharide

La biotine peut être directement utilisée pour le marquage des polysaccharides possédant des fonctions amine par la technique de Glabe [Huang et al., 1996].

➤ 2-aminobenzamide ou 2-AB

Le marquage d'oligosaccharides par le 2-aminobenzamide (Figure A-16) a été décrit par Bigge et al., 1995. Des disaccharides de dérivés d'héparine, obtenus par dégradation enzymatique, ont ainsi été marqués [Kinoshita et Sugahara, 1999].

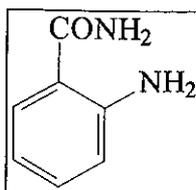


Figure A-16 : Structure du 2-aminobenzamide

II.2.3.3 Bilan des méthodes de marquage fluorescent

L'addition d'un marqueur est une technique indispensable à l'étude physico-chimique et biologique des polysaccharides. Actuellement, il est difficile de combiner le marquage fluorescent à la fois pour les études biologiques et l'analyse structurale. De plus, les propriétés spectroscopiques pour l'analyse biologique sont très importantes. Nous avons résumé les propriétés spectroscopiques des différents traceurs fluorescents dans le Tableau A-3 suivant.

Fluorophore	λ_{ex} (nm)	$\lambda_{\text{f max}}$ (nm)
Fluorescéine et dérivés	490	530
2-AMAC	425	520
Biotine	345	400
2-AB	330	420
ANTS	325	520
APTS	335	525
2-AP	320	400

Tableau A-3 : Longueurs d'onde d'excitation et d'émission des différents marqueurs fluorescents

Pour les études biologiques, il est généralement préférable de disposer de sondes fluorescentes excitables au-delà de 450 nm, domaine d'absorption des composés cellulaires. Dans cet objectif, depuis quelques années, le DCPR-GRAPP développe des rotors moléculaires fluorescents de type coumarine.

Dans le paragraphe suivant, nous présentons les propriétés des rotors moléculaires fluorescents de type coumarine.

II.3 LES ROTORS MOLECULAIRES FLUORESCENTS

II.3.1 Définition des rotors moléculaires fluorescents

Les rotors moléculaires sont des composés qui par absorption photonique entraînent la formation d'état(s) électronique(s) excité(s) qui peut(vent) se relaxer au moins par deux voies :

- des processus radiatifs, dont la fluorescence,
- des processus non radiatifs, dont des rotations internes, des isomérisations, etc.

Ces derniers processus dépendent, entre autres, de la viscosité du milieu, de l'espace accessible pour une(des) rotation(s) et de la participation des molécules du solvant.

Dans la plupart des utilisations, les sondes sont de type extrinsèques, *i.e.* simplement incorporées au milieu d'étude. De ce fait, la connaissance de leur localisation est très importante, puisque l'information qui sera prise n'est que le reflet de la sonde dans son environnement local à l'échelle moléculaire. La localisation de la sonde dans des milieux microhétérogènes répond à divers critères liés à son degré de solubilisation dans les différentes parties du milieu. Les paramètres d'influence sont entre autres le caractère hydrophile/hydrophobe de la sonde et les propriétés du milieu (polarité, force ionique, température, viscosité, etc.).

Ainsi, il a été constaté pour ces traceurs fluorescents que :

- leur rendement quantique de fluorescence varie avec la rigidité de la molécule, la viscosité du solvant, la température, etc. [Loufty et Arnold, 1982 ; Adibnejad, 1996 ; Zusatz, 1997 ; Geoffroy-Chapotot, 1998],
- la position des longueurs d'onde d'émission de fluorescence dépend essentiellement de la polarité du milieu [Rettig, 1994].

II.3.2 Etude des états excités des rotors moléculaires

Plus récemment, les sondes fluorescentes subissant un procédé de transfert d'électron intramoléculaire photo-induit (PET) ont été d'un très grand intérêt. Le procédé PET est typique des systèmes aromatiques ayant des substituants fortement accepteurs et donneurs.

lesquels présentent souvent des propriétés d'émission "anormales", comme par exemple un grand déplacement de Stokes (expliqué par l'augmentation du moment dipolaire de l'état excité stabilisé dans les solvants polaires) ou une double fluorescence (probablement due à une relaxation interne, avec plusieurs rotations autour des liaisons moléculaires) dans les solvants polaires.

Ces systèmes sont utiles dans l'étude des systèmes polymères par leur très grande sensibilité à la viscosité et à la polarité des molécules de solvant environnantes.

Il est connu que certaines molécules comme le 4-(N,N-diméthylamino)benzonitrile (DMABN) (Figure A-17) ou 4-(N,N-diméthylamino)benzoate (DMAB) présentent une double fluorescence correspondant à deux types d'états excités. En effet, le DMABN présente une bande d'émission de fluorescence dite "normale" autour de 350 nm (bande B) et une bande dite "anormale" (bande A) apparaissant dans les solvants polaires autour de 450 nm.

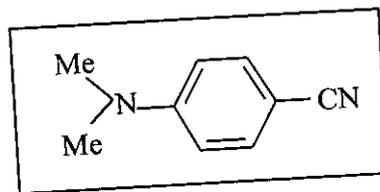


Figure A-17 : Structure du 4-(N,N-diméthylamino)benzonitrile (DMABN)

La première hypothèse pour expliquer ce phénomène, formulée par Lippert en 1962 [Lippert, 1962], était basée sur un renversement de deux états excités S_1 et S_2 les plus faiblement peuplés provoqué par la polarité du solvant. Bien qu'il ait été remarqué qu'une différence d'énergie $\Delta E(S_1, S_2)$ faible était essentielle pour l'apparition d'une double émission, la configuration moléculaire des deux états émetteurs n'était pas discutée.

Dans les années suivantes, plusieurs modèles ont été proposés pour tenter d'expliquer cette double fluorescence [bilan dans Geoffroy-Chapotot, 1998]. Cependant même si les faits expérimentaux sont clairs, leur interprétation reste encore aujourd'hui sujet à discussion controversée.

Toutefois, Rothmund et Rettig, 1997 ont confirmé le succès du modèle TICT "Twisted Intramolecular Charge Transfer" dans la prédiction de la double fluorescence de certains composés ou bien pour montrer pourquoi certains composés relativement très proches ne montrent pas de double fluorescence.

C'est pourquoi dans toute l'étude qui sera faite par la suite, nous considérons uniquement le concept TICT. Nous retiendrons tout de même que la formation de deux espèces excitées est commune à tous les mécanismes :

- l'espèce excitée plane (LE), état B^* émettant à la plus courte longueur d'onde,
- l'espèce de transfert de charge (CT) formée à partir de la précédente, qui émet à une longueur d'onde plus grande.

II.3.3 Concept de l'état TICT

Selon l'hypothèse TICT proposée par Grabowski et al., 1979, la bande d'émission à plus courte longueur, correspondant à l'état B^* , est due à la conformation plane de la molécule alors que la longueur d'onde plus grande, correspondant à l'état A^* , provient de la molécule ayant une conformation perpendiculaire (Figure A-18). A l'état excité, la partie donneur (groupe diméthylamino) de la molécule initialement plane tourne autour de la liaison azote-carbone aromatique, cette rotation est suivie d'un transfert de charge intramoléculaire. C'est pourquoi, le spectre de fluorescence de ces molécules dépend fortement, non seulement de la polarité du solvant mais aussi de la viscosité du milieu, les molécules agissent donc comme des sondes moléculaires.

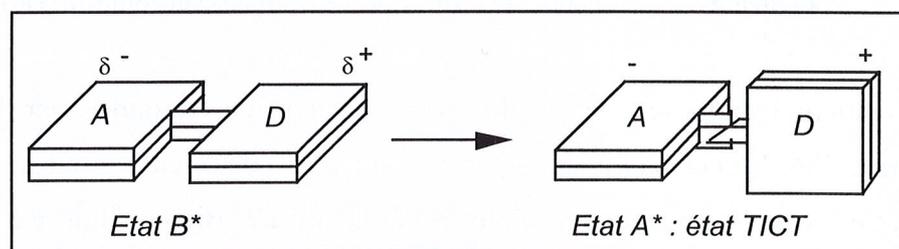


Figure A-18 : Représentation du transfert de charge intramoléculaire à l'état excité et du changement d'arrangement géométrique des groupes donneur et accepteur

Pour la conformation plane (état B^*), il existe une interaction mésomère entre les groupements donneur et accepteur qui conduit ensuite à une séparation de charges dans l'état TICT (état A^*) ; dans cet état, les orbitales n du donneur (groupement diméthylamino) et π de l'accepteur (groupement nitrile) sont orthogonales et ne se recouvrent pas, elles ne sont donc pas couplées, le moment dipolaire minimal dans l'état fondamental, est maximal dans cet état excité.

Le DMABN (diméthylaminobenzonitrile), par exemple, possède ce double minimum de potentiel pour l'état excité : en plus du minimum d'énergie correspondant à la géométrie plane, il existe un minimum d'énergie inférieur avec une séparation totale des charges (pas d'interaction mésomère entre D et A) correspondant à la géométrie perpendiculaire de l'état TICT (Figure A-19).

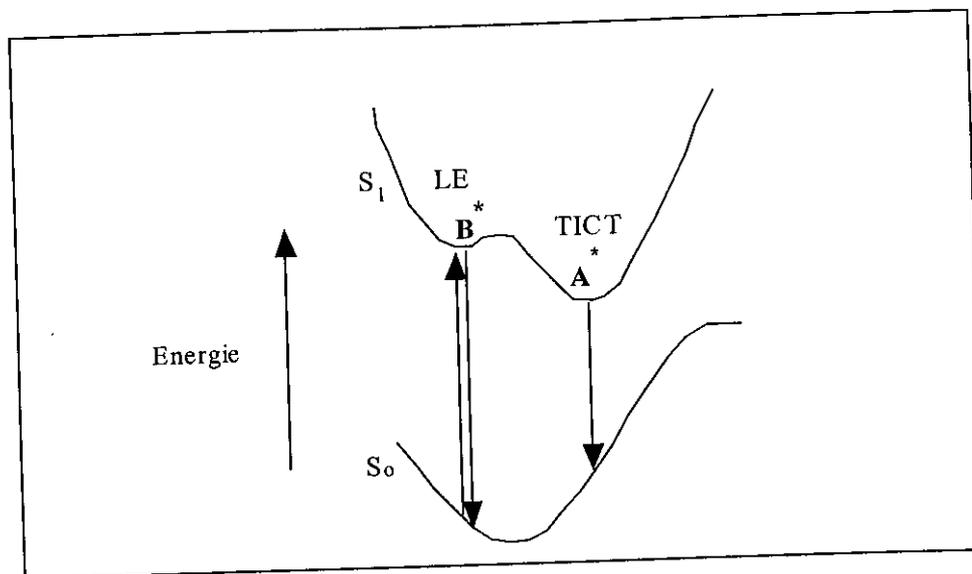


Figure A-19 : Représentation schématique de la surface d'énergie potentielle des états B* et A*

L'existence d'un état TICT est possible si son minimum d'énergie est situé sur un niveau plus bas que celui de l'état plan (B*), cette condition étant exprimée par l'inégalité suivante [Rettig, 1986] :

$$E_{B^*} - E_{TICT} > 0$$

$$\text{avec : } E_{TICT} = IP(D) - EA(A) + C + E_{\text{solv}}$$

- E_{B^*} : minimum d'énergie à l'état excité de l'état B*,
- E_{TICT} : minimum d'énergie à l'état excité de l'état A* (état TICT),
- IP : potentiel d'ionisation du groupement donneur,
- EA : affinité électronique du groupement accepteur,
- C : attraction coulombienne mutuelle des groupements donneur et accepteur,
- E_{solv} : énergie de stabilisation polaire par le solvant.

La position du niveau d'énergie de l'état A* (état TICT) par rapport à celui de l'état B* dépend des propriétés donneur-accepteur d'électrons des sous-systèmes, représentées par IP

et EA. La stabilisation par le solvant et l'attraction coulombienne mutuelle permettent également la stabilisation préférentielle de l'état A^* par rapport à l'état précurseur B^* .

Il faut souligner, que pour expliquer la formation de la deuxième bande d'émission de fluorescence, généralement présente dans les composés de type "benzène" [Rothmund et Rettig, 1997], plusieurs mécanismes ont été proposés parallèlement à la notion d'état TICT [Rettig, 1994].

Toutes les propositions allaient dans le sens d'une explication des rôles importants joués par d'une part, la rotation de la liaison entre le groupe amino et le cycle benzénique et d'autre part, la solvation.

II.3.4 Les rotors de type 7-diéthylamino coumarine substituée en position 3

Il existe différentes classes de rotors moléculaires ayant des groupements qui absorbent et émettent à diverses longueurs d'onde. Depuis quelques années, le DCPR-GRAPP développe des rotors moléculaires fluorescents, en particulier ceux possédant comme unité de base le motif coumarine (Figure A-20).

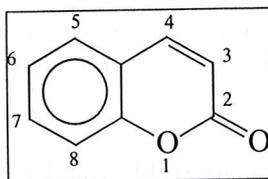


Figure A-20 : Structure coumarine

Les coumarines en grande majorité absorbent la lumière au-dessus de 350 nm et présentent le plus souvent des rendements quantiques de fluorescence relativement élevés dans la plupart des solvants organiques.

Les 7-aminocoumarines, du fait de leur fluorescence située dans la partie bleu-verte du spectre visible, sont particulièrement utiles pour de nombreuses applications. Ces structures ont fait l'objet de nombreuses études, qui ont mis en évidence le rôle de la fonction amino et l'influence du substituant alkyle porté par cette fonction ainsi que les fonctions placées en position 3 ou 4, sur les propriétés de fluorescence.

L'influence du solvant ou du substituant est interprétée en terme de structures ICT et TICT (Figure A-21) qui représentent la contribution de la résonance de la molécule, et de façon approximative les états électroniques excités des molécules de type aminocoumarine.

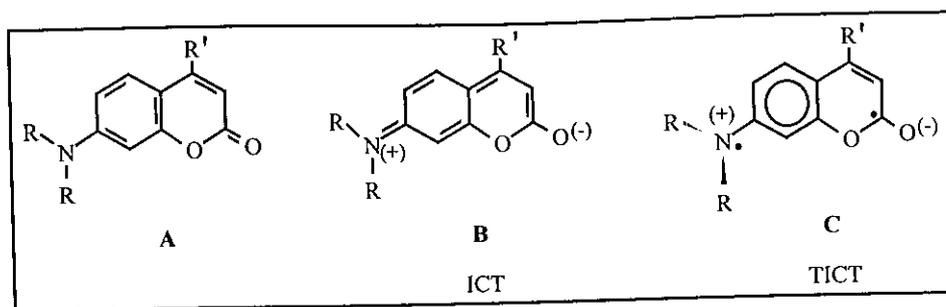


Figure A-21 : Les différents états accessibles aux 7-dialkylaminocoumarines substituées en position-3 [Bangar Raju et Varadarajan, 1994]

L'état excité de plus faible énergie (état S_1) est majoritairement représenté par un état polaire, à transfert de charge intramoléculaire (état ICT). L'état S_1 présente un moment dipolaire élevé, et en ajoutant sur le chromophore des substituants supplémentaires, on augmente ou diminue le moment dipolaire de l'état excité.

Ainsi, la formation d'un état excité est suivie par une première relaxation vers un état plan à transfert de charge intramoléculaire (ICT), hautement émissif et modérément polaire. Pour les composés qui n'ont pas une géométrie rigide, cette relaxation peut se poursuivre par la rotation du groupement amino, qui conduit à une conformation non plane : un état "twisté" à transfert de charge intramoléculaire (TICT) d'énergie plus basse que l'état ICT. Cet état présente une grande séparation de charges qui devient de plus en plus importante en milieu polaire (Figure A-22).

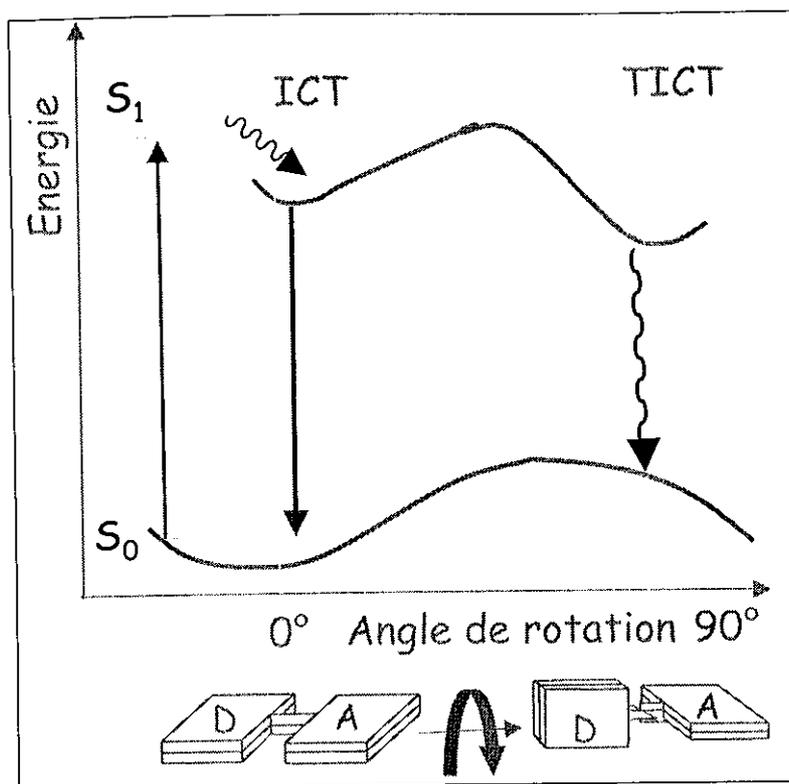


Figure A-22 : Représentation schématique des courbes d'énergie potentielle de l'état fondamental et des états excités ICT et TICT de dérivés coumarine fluorescents

La formation et la stabilisation de l'état TICT des aminocoumarines sont déterminées par les caractéristiques des groupements électrodonneurs et accepteurs portés par la structure coumarine, et par la polarité du solvant qui stabilise l'état TICT très polaire. Ainsi les coumarines présentent un rendement de fluorescence réduit dans un environnement de polarité même moyenne (comme par exemple dans l'éthanol ou le méthanol). De plus, il a été observé que le mécanisme de désactivation non radiatif n'avait pas lieu lorsque la coumarine se trouvait dans un milieu peu polaire [Jones II et Rahman, 1994].

La viscosité du solvant peut également affecter la désactivation non radiative dans la mesure où ce procédé met en jeu une rotation des liaisons qui relient les groupements donneur et accepteur à la structure coumarine.

III SYNTHÈSE ET ÉTUDE
DES POLYSACCHARIDES
FLUORESCENTS

III.1 SYNTHÈSE DES DEXTRANES MODIFIÉS

Dans le cadre de recherche de nouveaux agents à intérêt thérapeutique, le Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules a mis au point la synthèse de polymères CarboxyméthylDextrane Benzylamide (Figure A-23) à partir de dextrane natif de poids moléculaire égal à 40 000 g/mol.

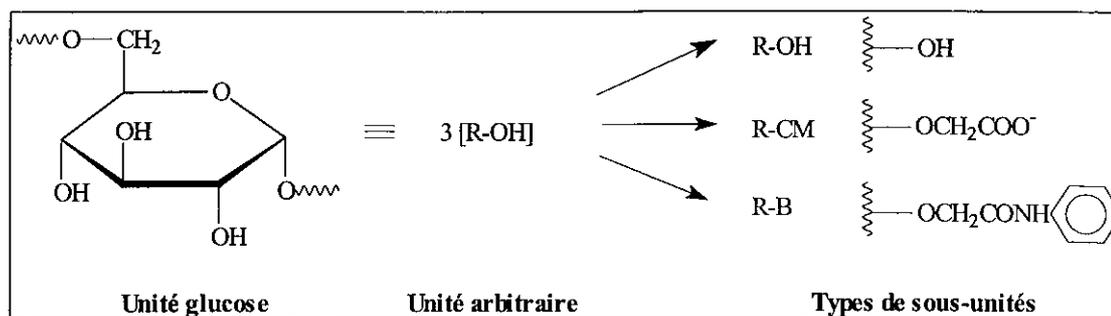


Figure A-23 : Structure des dextrans modifiés

Ces polymères possèdent des substituants différents répartis le long de la chaîne macromoléculaire du dextrane, ce qui leur confère des propriétés d'interaction vis-à-vis des composés d'intérêt biologique. En absence de groupement benzylamide, ces polymères ne présentent aucune activité biologique. Nous présentons les différentes étapes de synthèse qui nous ont permis de préparer ces composés, suivies des méthodes permettant de les caractériser.

III.1.1 Carboxyméthylation du dextrane

L'étape de carboxyméthylation, permettant d'introduire des groupements carboxylate, est réalisée selon la réaction suivante :

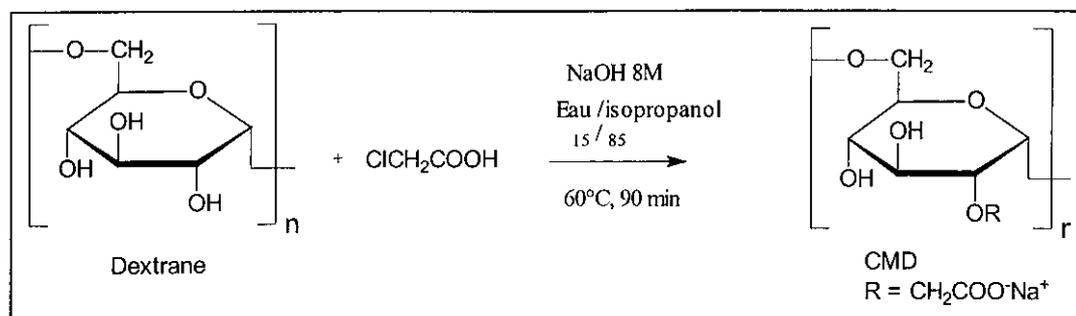


Figure A-24 : Carboxyméthylation du dextrane [Huynh et al., 1998]

En milieu basique, les fonctions hydroxyle du dextrane sont transformées en fonctions alcoolate qui vont pouvoir réagir par substitution nucléophile sur l'acide monochloroacétique. Afin d'obtenir une substitution d'au moins une fonction carboxyméthyle par unité glycosidique, la réaction est réalisée dans un mélange eau/isopropanol, 15/85, v/v, en présence de 2,5 équivalents d'acide monochloroacétique. Au terme de la réaction, le CMD est précipité 3 fois dans l'éthanol à froid. C'est la fonction hydroxyle en position 2 qui réagit en premier.

III.1.2 Réaction de benzylamidification

Les groupements carboxyliques sont activés sous la forme d'un anhydride mixte à l'aide d'un agent de couplage organosoluble, la N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine (EEDQ), permettant le couplage de la benzylamine au CMD (Figure A-25).

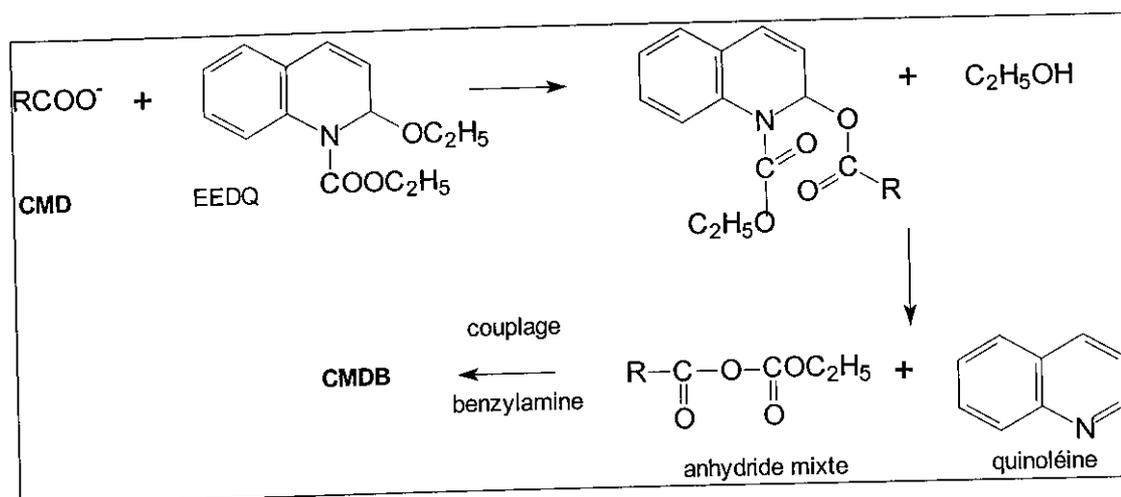


Figure A-25 : Réaction de benzylamidification des CMD [Chaubet et al., 1995]

Il est préférable d'effectuer deux étapes de benzylamidification successives pour obtenir un nombre suffisant de groupements benzylamide (l'activité biologique dépend du degré de substitution en B). Dès la première étape de benzylamidification, des difficultés sont apparues pour filtrer le produit, le CMDB précipité étant très fin. Le filtrat a donc été conservé, décanté puis refiltré.

III.1.3 Caractérisation des produits

La caractérisation des CMDB obtenus est réalisée par dosages acidimétriques des fonctions carboxylate. Avant chaque dosage et donc chaque pesée, il est nécessaire de sécher

correctement les polymères car ils sont très hygroscopiques (la teneur en eau a été estimée à environ 10% par simple pesée avant et après séchage).

La teneur en B est obtenue par différenciation du nombre de fonctions carboxylate avant et après benzylamidification. Un calcul peut être effectué pour obtenir les degrés de substitution (ds).

La composition d'un polymère peut s'exprimer sous la forme de degrés de substitution de chaque groupe fonctionnel qui le constitue. Dans le cas du dextrane natif, dont l'unité glycosidique possède une masse molaire de 162 g/mol, nous pouvons considérer de manière virtuelle 3 fonctions du type ROH sur l'unité glycosidique et ainsi calculer les degrés de substitution (Figure A-26).

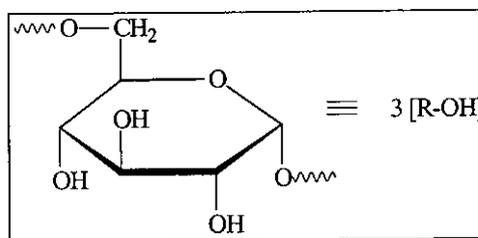


Figure A-26 : Structure unité glucose

Nous présentons, à titre d'exemple, le calcul pour obtenir le ds des CMD.

En considérant les masses molaires (M) des fonctions virtuelles, nous pouvons écrire :

$$(h) M (R-OH) = 54 \text{ g/mol } (162/3)$$

$$(c) M (R-O-CM) = 134 \text{ g/mol (sous forme de sel de sodium)}$$

En considérant les masses molaires M en g par mmol, nous obtenons l'équation suivante :

$$(1) 0,054h + 0,134c = 1 \text{ g} \quad \text{avec } c \text{ donné par le dosage acidimétrique en méq./g}$$

Le degré de substitution en groupes carboxyméthyle peut être alors calculé en posant :

$$ds_{CM} = (c/(c+h)) \times 3$$

Un calcul similaire est nécessaire pour obtenir le ds du CMDB en ajoutant dans l'équation (1) la variable b de masse molaire $M(R-O-B) = 201 \text{ g/mol}$

Les résultats sont regroupés dans le Tableau A-4 suivant.

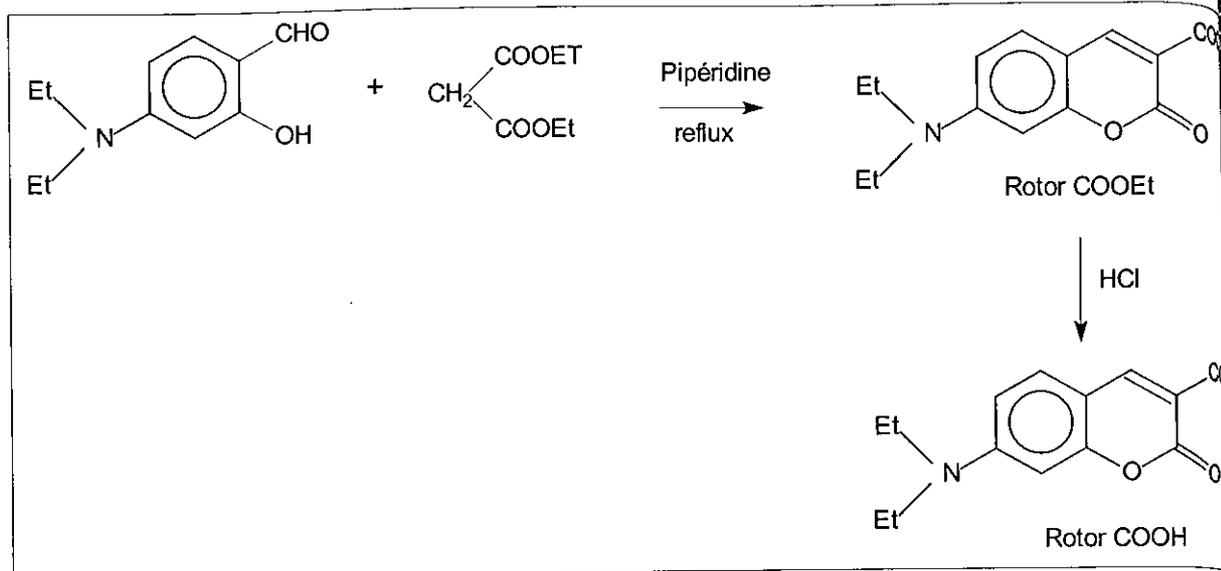


Figure A-29 : Schéma de synthèse du rotor COOH

A l'issue de cette synthèse, nous avons obtenu un produit cristallisé de couleur orange avec un rendement de 60%. Le rotor COOEt intermédiaire est un produit cristallisé de couleur jaune.

III.2.2.2 Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique, rotor CNCOOH

Le rotor CNCOOH a été obtenu par condensation de Knoevenagel entre la 3-formyl-7-(N,N-diéthylamino)coumarine et l'acide cyanoacétique en solution dans le méthanol, en présence de pipéridine (en quantité catalytique) ou d'oxyde de magnésium (1,2 éq.) (Figure A-30).

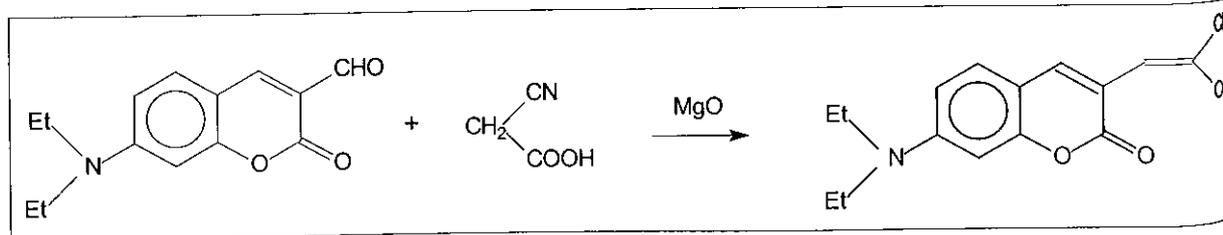


Figure A-30 : Synthèse du rotor CNCOOH

Le rendement de la réaction est de 80% et le produit obtenu est de couleur rouge.

Nous avons réalisé un protocole similaire pour obtenir le rotor CNCOOEt avec 80% de rendement. Cet ester, correspondant au rotor CNCOOH, est étudié dans la partie photophysique.

III.2.2.3 Greffage d'un bras espaceur sur les rotors COOH et CNCOOH

Dans le but de pouvoir greffer les sondes fluorescentes sur les polysaccharides, nous avons ajouté un bras espaceur de type 5-aminopentanol, en utilisant une activation de la fonction carboxylique par le couple HOBt/DCCI [Dardoize et al., 1989]. Dans une seconde étape la fonction alcool a été substituée par un brome (Figure A-31).

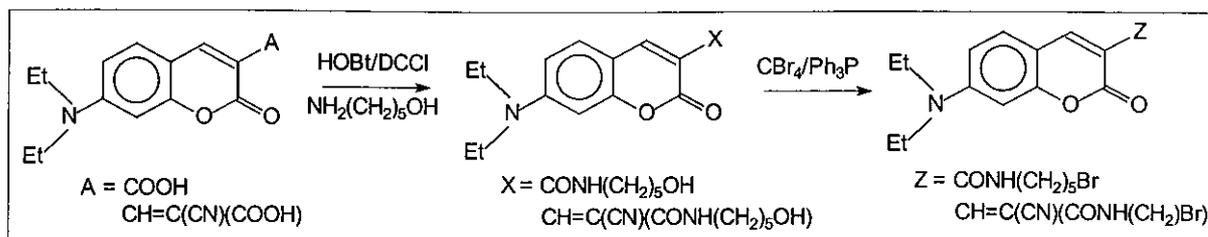


Figure A-31 : Synthèse des rotors avec un bras espaceur

Par cette méthode, nous avons obtenu le rotor DECB_r (Z = CONH(CH₂)₅Br) de couleur jaune et le rotor DECCNBr (Z = CH=C(CN)(CONH(CH₂)₅Br)) de couleur rouge avec des rendements respectifs de 64 et 68%.

III.2.3 Synthèse des polysaccharides fluorescents

Afin de mieux comprendre le rôle physiologique, la distribution dans la cellule et le devenir de ces polysaccharides, la méthode la plus simple consiste à les marquer *via* des traceurs fluorescents. En général, les sondes utilisées sont la fluorescéine ou des dérivés comme la dichloro-triazine-amino-fluorescéine (DTAF) qui est plus stable que la fluorescéine [Prigent-Richard et al., 1998]. L'avantage des rotors moléculaires sur ces composés résidera dans leur comportement photophysique très sensible à la polarité et à la viscosité de leur environnement.

Le but essentiel est de fixer une quantité minimale de rotor (jusqu'à un seuil de détection) afin de ne pas perturber l'activité biologique.

III.2.3.1 Synthèse à partir des rotors modifiés par un bras espaceur

Dans un premier temps, nous avons fait réagir sur le dextrane le rotor DECB_r, en même temps que l'acide monochloroacétique, pour réaliser la synthèse du CMD. Cette méthode est intéressante car elle permet de greffer directement le traceur fluorescent *via* une fonction éther, sans modifier le polysaccharide au préalable.

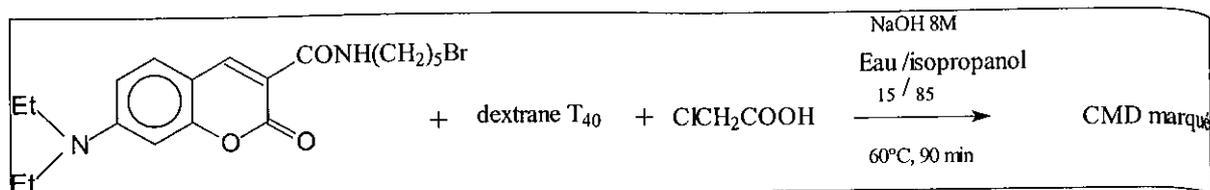


Figure A-32 : Synthèse d'un CMD marqué à partir du rotor DECBBr

La réaction est réalisée avec 1 g de dextrane dans les mêmes conditions que celles décrites pour la synthèse des CMD. Le rapport molaire coumarine/unité glucose a été fixé à 0,04. Ce CMD marqué par le traceur fluorescent a été analysé en CLHP pour vérifier le marquage. Il reste toutefois 2% de coumarine bromée libre. Le CMD fluorescent a été obtenu avec un ds estimé à 0,04.

Cette voie n'a pas pu être transposée à la coumarine DECCNBr, car la fonction CN s'hydrolyse en milieu basique même à faible température.

Compte tenu de ces résultats, nous avons choisi l'autre stratégie, c'est-à-dire greffer un bras espaceur sur les polysaccharides puis, le traceur fluorescent.

III.2.3.2 Synthèse à partir des polysaccharides modifiés

III.2.3.2.1 Greffage du bras espaceur sur les polysaccharides

Afin de pouvoir fixer des rotors moléculaires fluorescents, les polysaccharides, CMD, CMDB et héparine ont été modifiés par greffage de fonctions amine.

Le greffage des fonctions amine primaire sur les différents polymères est réalisée à l'aide de la bromopropylamine en milieu basique (Figure A-33). La bromopropylamine se fixe sur les fonctions hydroxyle libres des unités osidiques *via* une réaction d'éthérisation ; nous supposons qu'elle se fixe de manière non préférentielle sur une des fonctions hydroxyle. Plus l'unité osidique est substituée, moins elle pourra réagir avec la bromopropylamine.

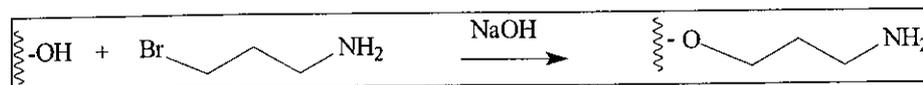


Figure A-33 : Greffage de la bromopropylamine sur les polysaccharides

Le taux de groupements aminés est estimé à l'aide de la fluorescamine. Le rapport molaire bromopropylamine/unité glucose a été optimisé à 1 pour les dextrans modifiés et à 2 dans le cas de l'héparine. L'héparine possède des fonctions amine (5%), mais les essais de

greffage de la coumarine COOH sur le polymère natif n'ont pas abouti à un composé fluorescent.

III.2.3.2.2 Greffage des rotors COOH et CNCOOH

Les fonctions acides sont activées par le couple N,N-dicyclohexylcarbodiimide/N-hydroxysuccinimide dans un minimum de DMF. Après filtration de l'urée, l'acide activé est ajouté à une solution aqueuse de polysaccharide préalablement aminé. La solution est ensuite à nouveau filtrée et dialysée. Le marquage est vérifié par CLHP.

III.2.3.2.3 Caractérisation des polymères fluorescents

a) Dosage des amines

Le dosage quantitatif des fonctions amine des polymères est réalisé par utilisation de fluorescamine, réactif non fluorescent qui réagit avec les amines primaires pour donner un composé fluorescent ($\lambda_f = 475$ nm) (Figure A-34) (la méthode utilisée pour effectuer les spectres de fluorescence est décrite dans la partie IV).

Plusieurs voies de synthèse de dérivés fluorescents d'amine primaire sont maintenant bien connues. Un des agents les plus répandus est la fluorescamine (FC) qui a été introduite par Udenfriend et al., 1972 et qui a prouvé son utilité depuis plus de trente ans. Toutefois la fluorescamine est surtout utilisée pour les dosages qualitatifs et non quantitatifs [Sogawa et Takahashi, 1978 ; Wilson et Schiffrin, 1995]. Le but de ce dosage est de déterminer, par une méthode d'analyse simple et quantitative, le taux de bromopropylamine fixée sur le dextrane ou l'héparine en milieu basique, par greffage covalent de la fluorescamine avec les fonctions amine primaire. Les différentes conditions expérimentales, spécialement le pH et les quantités de fluorescamine, doivent être définies de manière rigoureuse car ces différents paramètres influencent fortement l'efficacité de la réaction de couplage. En ce qui concerne le pH, il a été montré qu'il devait être basique pour les amines primaires aliphatiques mais acide pour les amines primaires aromatiques [De Silva et Strojny, 1975]. L'ordre d'ajout des réactifs n'influence pas le résultat.

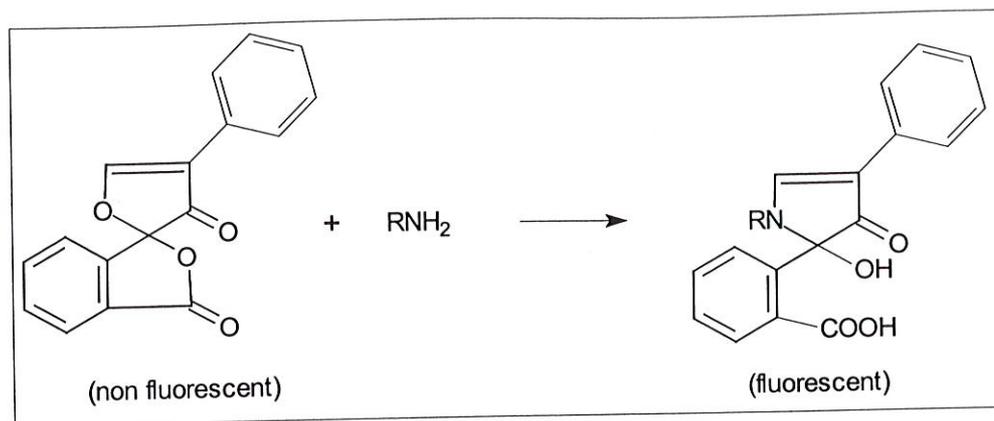


Figure A-34 : Schéma de la réaction d'une amine primaire avec la fluorescamine

Suite aux difficultés rencontrées pour obtenir une courbe d'étalonnage correcte, nous avons cherché à évaluer la quantité de fluorescamine conduisant à une intensité de fluorescence maximale et nécessaire pour un dosage fiable (Figure A-35).

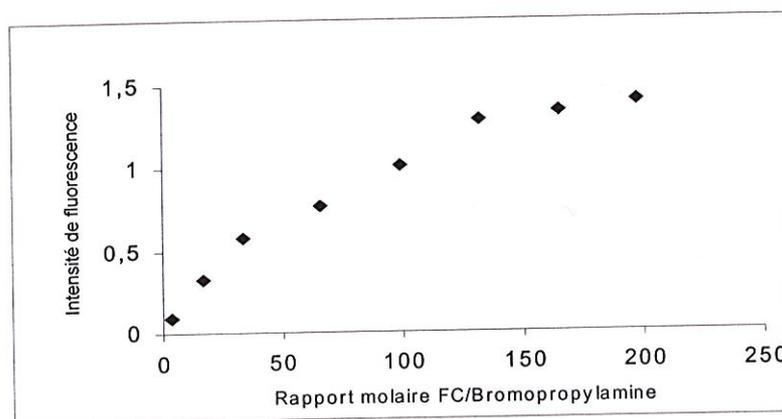


Figure A-35 : Influence du rapport molaire FC/bromopropylamine

Cette courbe montre que la quantité de fluorescamine doit être fortement supérieure à la quantité de bromopropylamine, soit un rapport de FC/bromopropylamine = 150. Ces résultats sont en accord avec ceux décrits par Segura Carretero et al., 1999. En utilisant ce rapport, nous avons ensuite réalisé une courbe d'étalonnage avec la bromopropylamine seule (Figure A-36).

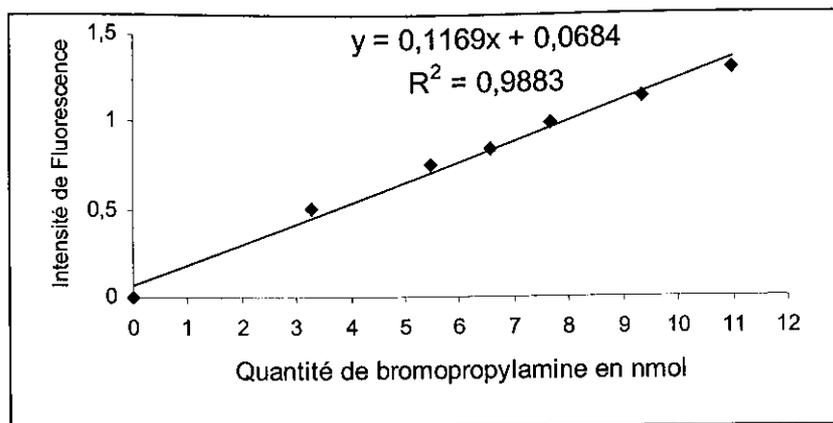


Figure A-36 : Dosage des fonctions amine par la fluorescamine :
courbe d'étalonnage établie à partir de la bromopropylamine

En comparant les valeurs de l'intensité de fluorescence des polymères aminés ayant réagi avec la fluorescamine, nous avons pu déterminer la quantité de fonctions amine réparties statistiquement le long de la chaîne du polysaccharide.

Les fonctions amine primaire sont estimées à environ 15% des unités glycosyle et à 3% pour l'héparine.

b) Dosage des fluorophores greffés

La quantité de fluorophores greffés est déterminée à partir de courbes d'étalonnage des rotors CNCOOEt (Figure A-37) et COOEt (Figure A-38) en milieu aqueux. Nous avons choisi d'utiliser ces deux rotors plutôt que leurs analogues CNCOOH et COOH car ils présentent un comportement particulier d'un point de vue photophysique (cf. partie photophysique).

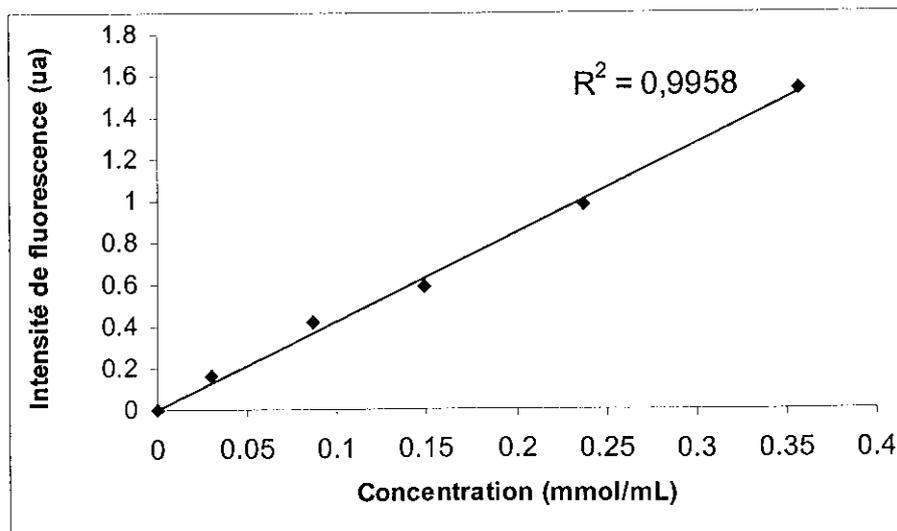


Figure A-37 : Courbe d'étalonnage du rotor CNCOOEt :
intensité de fluorescence du rotor CNCOOEt en fonction de la concentration

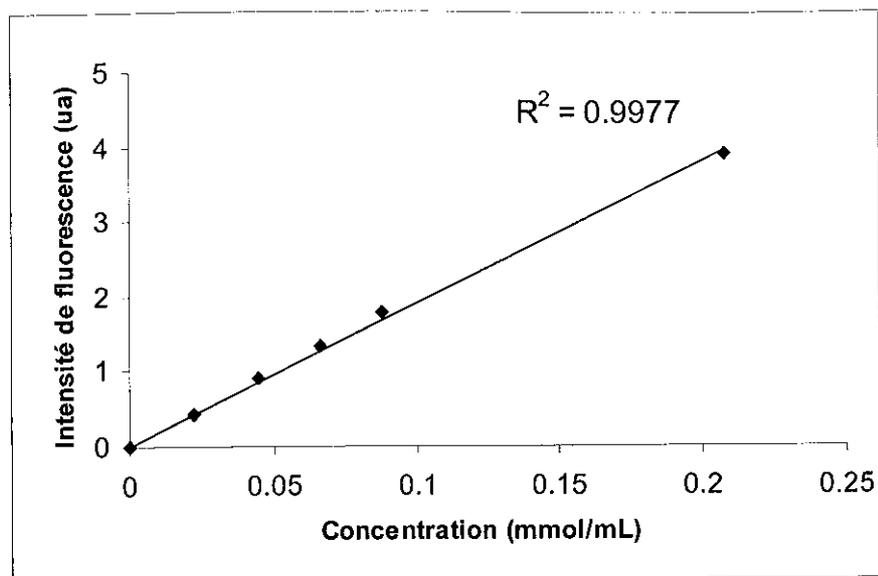


Figure A-38 : Courbe d'étalonnage du rotor COOEt :
intensité de fluorescence du rotor COOEt en fonction de la concentration

Toutes les fonctions amine initialement fixées sur le polymère ne réagissent pas avec le traceur fluorescent. Nous avons aussi dosé par la fluorescamine ces fonctions amine restantes. Il est dans ce cas nécessaire de tenir compte de la fluorescence du polymère marqué et par conséquent, il convient de soustraire le spectre obtenu après réaction avec la fluorescamine et le spectre du polymère fluorescent. Nous rapportons sur la Figure A-39 le type de spectre obtenu.

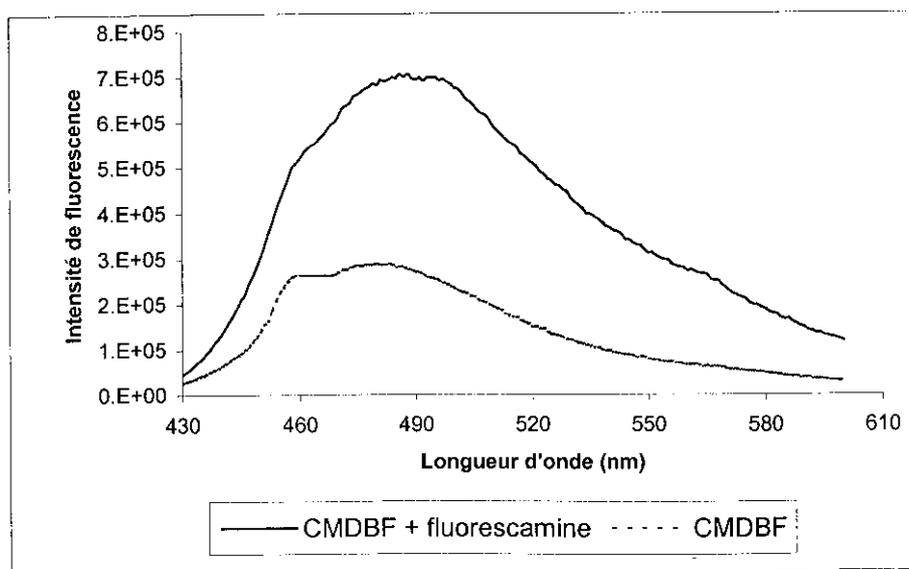


Figure A-39 : Spectres en émission de fluorescence d'un CMDB aminé marqué avec le rotor COOH (CMDBCou) et du même CMDB fluorescent après réaction avec la fluorescamine

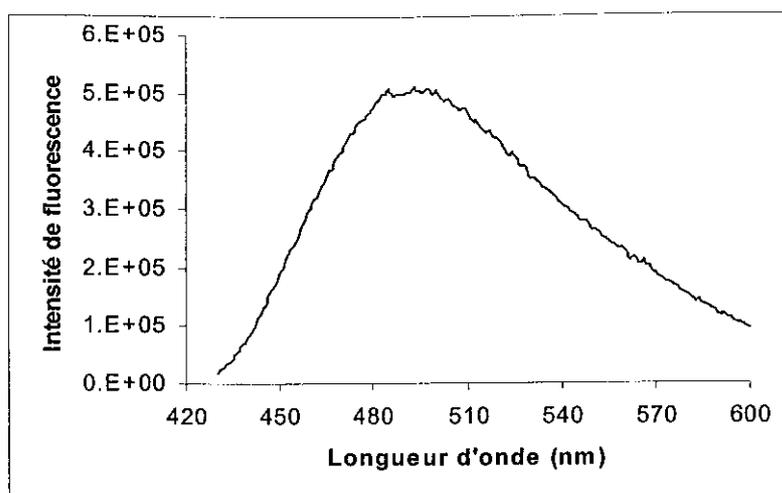


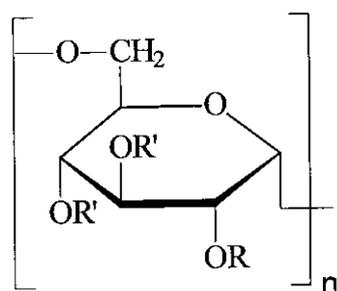
Figure A-40 : Spectre corrigé en émission de fluorescence d'un CMD aminé marqué avec le rotor COOH après réaction avec la fluorescamine et correction du spectre initial

De cette manière, nous pouvons aussi accéder à la quantité de fluorophores en soustrayant la quantité d'amine avant et après greffage du fluorophore. Les résultats obtenus sont concordants et nous avons vérifié que seule la moitié des fonctions amine fixées réagissent (cf. Tableau A-5).

c) Composition des différents polymères

➤ Polymères dérivés du dextrane

Nous avons résumé dans le Tableau A-5 les résultats obtenus avec les polymères dérivés de dextrane, CMD et CMDDB fluorescents ou non, ainsi que les degrés de substitution des différents groupes (seuls figurent les résultats obtenus avec les polymères que nous avons ensuite testés en culture cellulaire).



Polymère	R	R'	ds
Dextrane	H	H	
CMD	CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	H	D = 1
CMDDB	CH ₂ COO ⁻ Na ⁺ CH ₂ CONHCH ₂ C ₆ H ₅	H	B = 0,4
CMDN	CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	H (CH ₂) ₃ NH ₂	N = 0,16
CMDBN	CH ₂ COO ⁻ Na ⁺ CH ₂ CONHCH ₂ C ₆ H ₅	H (CH ₂) ₃ NH ₂	N = 0,15
CMDNCou	CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	H (CH ₂) ₃ NH ₂ (CH ₂) ₃ NHCou	Cou = 0,09
CMDNCouCN	CH ₂ COO ⁻ Na ⁺	H (CH ₂) ₃ NH ₂ (CH ₂) ₃ NHCouCN	CouCN = 0,08
CMDBNCou	CH ₂ COO ⁻ Na ⁺ CH ₂ CONHCH ₂ C ₆ H ₅	H (CH ₂) ₃ NH ₂ (CH ₂) ₃ NHCou	Cou = 0,08
CMDBNCouCN	CH ₂ COO ⁻ Na ⁺ CH ₂ CONHCH ₂ C ₆ H ₅	H (CH ₂) ₃ NH ₂ (CH ₂) ₃ NHCouCN	CouCN = 0,07

Tableau A-5 : Tableau récapitulatif des essais effectués

N.B. : La notation Cou correspond à la sonde COOH et la notation CouCN correspond à la sonde CNCOOH

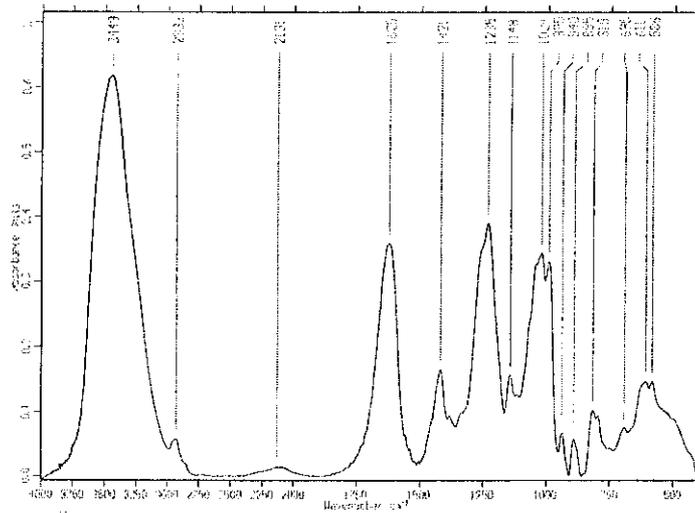
➤ Polymères dérivés de l'héparine

Les groupements amino sont greffés de façon covalente à environ 3% d'unités glycosyles. La valeur moyenne de la masse molaire de l'héparine est de 18 000 g/mol ce qui représente environ 60 unités osidiques par chaîne (la masse molaire du motif est de 315 g/mol). Il y a donc environ deux groupements amino par chaîne d'héparine. La quantité de rotors fixés (rotor COOH ou rotor CNCOOH) est d'environ 1 à 2%, ce qui représente environ un

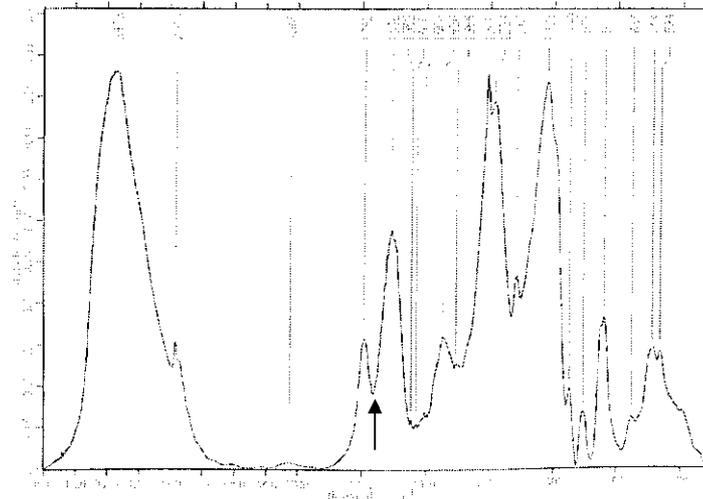
fluorophore par chaîne. Il est difficile de réaliser une estimation exacte compte tenu du faible taux de marquage qui doit être suffisant pour la visualisation par microscopie de fluorescence mais très faible pour ne pas perturber l'activité biologique.

d) Etude Infra-Rouge

Le marquage de l'héparine avec les rotors se traduit en IR par l'apparition d'une bande à 1720 cm^{-1} (Figure A- 41) correspondant à une liaison amide.



(a)



(b)

Figure A-41 : Spectres IR de l'héparine avant (a) et après marquage avec la sonde CNCOOH (b)

En ce qui concerne les dérivés CMDB, le greffage du fluorophore ne peut pas être mis en évidence par IR car des liaisons amide sont déjà présentes dans le polymère.

III.2.3.3 Bilan des greffages des fluorophores

A l'issue de ce travail, nous disposons de divers polymères fluorescents de compositions différentes mais connues. La méthode de greffage est bien maîtrisée, reproductible et par conséquent, envisageable pour le marquage d'autres polysaccharides.

La synthèse des rotors moléculaires de type coumarine est facile à mettre en œuvre avec l'obtention de bons rendements.

La fonction amino obtenue après condensation du bras espaceur peut être dosée facilement grâce à la spectroscopie de fluorescence en utilisant la fluorescamine comme réactif. Cette méthode est très sensible et permet de doser de très faibles quantités d'amine. De la même façon, il est aisé de quantifier la quantité de fluorophores greffés par comparaison avec des courbes étalon obtenues à partir des fluorophores libres.

Suite à ces synthèses, nous allons étudier les propriétés photophysiques des différents composés obtenus.

III.2.4 Partie expérimentale

III.2.4.1 Matériels et méthodes physico-chimiques

Produits chimiques

Acide chlorhydrique	(Fluka, réf. 84 419)	M = 36,50 g/mol
Acide chloroacétique	(Lancaster, réf. 2011784)	M = 94,50 g/mol
Acide cyanoacétique	(Aldrich, réf. 23,997-6)	M = 85,90 g/mol
Benzylamine	(Aldrich, réf. 18,570-1)	M = 107,16 g/mol
3-Bromopropylamine	(Aldrich, réf. B7,980-3)	M = 218,93 g/mol
Hydrogénocarbonate de sodium	(Lancaster, réf. 13292)	M = 84,01 g/mol
Cyanoacétate d'éthyle	(Fluka, réf. 28 429)	M = 113,12 g/mol
Dextrane T40	(Pharmacia, réf. 17-0270-01)	
1,3-Dicyclohexylcarbodiimide	(Aldrich, réf. D8000-2)	M = 206,33 g/mol
4-(N,N-diméthylamino)benzaldéhyde	(Fluka, réf. 39 070)	M = 149,19 g/mol
Héparine H108	(Sanofi)	
1-Hydroxybenzotriazole	(Aldrich, réf. 9,775-4)	M = 135,13 g/mol
N-hydroxysuccinimide	(Aldrich, réf. 13,067-2)	M = 115,09 g/mol
Malonate de diéthyle	(Aldrich, réf. 23,997-6)	M = 160,17 g/mol
Méthylate de sodium	(Aldrich, réf. 40,306-7)	M = 54,02 g/mol
Oxyde de magnésium	(Fluka, réf. 63 090)	M = 40,31 g/mol
Oxychlorure de phosphore	(Aldrich, réf. 20,117-0)	M = 153,33 g/mol
Pipéridine	(Aldrich, réf. 41,102-7)	M = 96,24 g/mol

Solvants

Tous les solvants utilisés sont des solvants purs pour synthèse

Acétate d'éthyle	(SdS, réf. 00202)
Acétone	(SdS, réf. 00502)
Chloroforme	(SdS, réf. 01602)
Dichlorométhane	(SdS, réf. 02902 E)
Diéthyléther	(SdS, réf. 04402)
Diméthylformamide	(SdS, réf. 03402)
Ethanol absolu	(SdS, réf. 01302)
Ether de pétrole	(SdS, réf. 04510)
Méthanol	(SdS, réf. 09302)
Pentane	(Sds, réf. 01508)

Méthodes physico-chimiques

Le suivi des réactions a généralement été effectué par chromatographie sur couche mince (CCM) en utilisant comme adsorbant des plaques de silice, Kieselgel 60 F₂₅₄ (SDS, réf. CCM 221254).

La CCM nous a servi à analyser les mélanges réactionnels de façon qualitative, à identifier les constituants des mélanges et à contrôler la pureté des produits finaux.

Les produits ont été dans la plupart des cas, purifiés par une séparation utilisant la chromatographie liquide sur colonne (gel de silice, 70-200 μm , SDS réf. 210 00 17).

Les séparations CLHP ont été effectuées sur une colonne analytique en phase inverse de type CHROMASIL (5 μm -C₁₈-silice 4,6 mm * 250 mm) avec un appareillage constitué d'une pompe Shimadzu LC-10AS associée à un détecteur UV-Visible Shimadzu SPD-10A et à un intégrateur "Spectra-Physics Chromjet Integrator".

Les points de fusion sont mesurés sur un banc Kofler.

Les spectres RMN ¹H ont été effectués sur un appareil Brüker AC 200 P. Les déplacements chimiques sont exprimés en ppm et les constantes de couplage sont données en Hz. Les formes des signaux sont données de la manière suivante : s, singulet, d, doublet, t, triplet, q, quadruplet, m, multiplet.

Les spectres Infrarouge ont été effectués sur un appareil Brüker IFS 25. Les nombres d'onde sont exprimés en cm^{-1} et seuls les signaux caractéristiques ont été répertoriés.

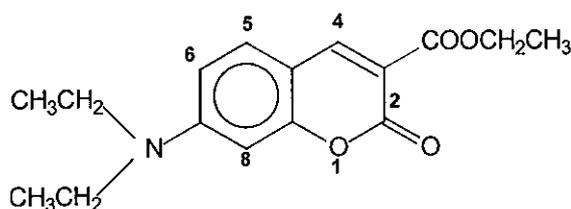
Les analyses élémentaires ont été réalisées au Centre de Microanalyses de Vernaison (CNRS).

III.2.4.2 Description des méthodes de synthèse

III.2.4.2.1 Synthèse des rotors moléculaires fluorescents dérivés de coumarine

III.2.4.2.1.1 Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle, rotor COOEt

Le malonate de diéthyle (97,5 mmol ; 11,3 g), le 4-diéthylamino-2-hydroxybenzaldéhyde (65 mmol ; 12,5 g) et la pipéridine (200 mmol ; 19,5 mL) sont dissous dans un mélange constitué de 235 mL d'acétonitrile et de 480 mL de toluène. Le mélange est porté à reflux pendant 3 h, puis distillé lentement de façon azéotropique afin d'éliminer l'eau et l'éthanol formés au cours de la réaction. Le toluène restant est évaporé sous pression réduite. Le produit obtenu est recristallisé dans un mélange hexane/acétate d'éthyle, 9/1, v/v. Les cristaux jaunes obtenus sont lavés avec du pentane et séchés au dessiccateur (48 mmol ; 14 g ; 74%).



Masse Molaire	Formule Brute
M = 289 g.mol ⁻¹	C ₁₆ H ₁₉ O ₄ N

Point de fusion : 74°C

IR (KBr) : $\nu(\text{COOEt}) = 1735 \text{ cm}^{-1}$

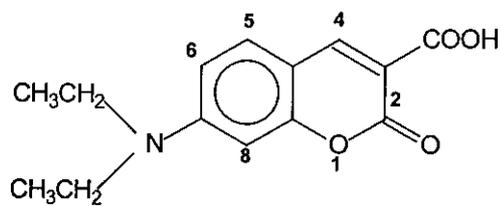
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,23 (6H, t, -N-(CH ₂ CH ₃) ₂)	6,47 (1H, d, -H ₈), J = 2,5 Hz
1,39 (3H, t, -OCH ₂ CH ₃)	6,60 (1H, dd, -H ₆), J = 2,5 et 9 Hz
3,45 (4H, q, -N(CH ₂ CH ₃) ₂)	7,37 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
4,39 (2H, q, -OCH ₂ CH ₃)	8,43 (1H, s, -H ₄)

Analyse élémentaire : Calc. % : C 66,42 ; N 4,83 ; H 6,63
Tr. : C 66,30 ; N 5,18 ; H 6,64

III.2.4.2.1.2 Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique, rotor COOH

Le 7-(N,N-diéthylamino)coumarine 3-carboxylate d'éthyle (14 mmol ; 4,1 g) est dissous dans 210 mL d'acide chlorhydrique concentré, le milieu est agité à température ambiante toute une nuit. Au mélange réactionnel refroidi par un bain de glace et maintenu sous agitation, on ajoute lentement 140 mL de NH_4OH . Le précipité orange ainsi obtenu est isolé par filtration, lavé à l'eau puis suspendu dans 300 mL d'eau. Une solution de NaOH à 10% est ajoutée goutte à goutte jusqu'à disparition du solide en suspension. La solution orange est filtrée puis réacidifiée avec une solution de HCl à 10%. L'acide précipité est lavé à l'eau et séché sous vide (10,9 mmol ; 2,85 g ; 78%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 261 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{O}_4\text{N}$

Point de fusion : 228°C

IR (KBr) : $\nu(\text{COOH}) = 1736 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{COOH}) = 3459 \text{ cm}^{-1}$

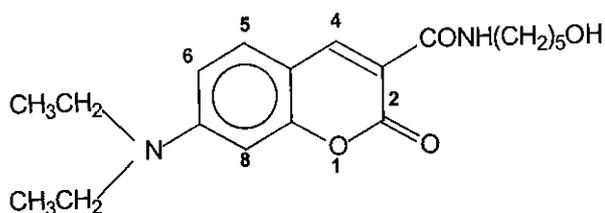
RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

1,26 (6H, t, -N-($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ₂)	7,47 (1H, d, - H_5), $J = 9 \text{ Hz}$
3,48 (4H, t, -N-($\text{CH}_2\text{-CH}_3$) ₂)	8,64 (1H, s, - H_4)
6,54 (1H, d, - H_8), $J = 2,3 \text{ Hz}$	12,5 (1H, s, -COOH)
6,73 (1H, dd, - H_6), $J = 2,3 \text{ et } 9 \text{ Hz}$	

Analyse élémentaire : Calc.% : C 64,36 ; N 5,36 ; H 5,79
 Tr. : C 64,52 ; N 5,56 ; H 6,01

III.2.4.2.1.3 Synthèse du 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-hydroxypentane]coumarine-3-carboxamide, rotor DECOH

L'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique (1 mmol ; 0,26 g) est dissous dans 5 mL de CH_2Cl_2 . A cette solution refroidie à 0°C , sous atmosphère inerte et sous agitation, sont ajoutés goutte à goutte successivement l'hydroxybenzotriazole (1,2 mmol ; 0,165 g) en solution dans 2 mL de DMF et le dicyclohexylcarbodiimide (1 mmol ; 0,206 g) en solution dans 4 mL de CH_2Cl_2 . Après retour à température ambiante et agitation du milieu réactionnel pendant 30 min, l'aminopentanol (1 mmol ; 0,10 g) solubilisé dans 5 mL de CH_2Cl_2 est additionné goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant deux jours puis filtré et lavé au CH_2Cl_2 . Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est chromatographié sur gel de silice (éluant : AcOEt/ CH_2Cl_2 , 3/7, v/v). Le produit cristallisé obtenu est de couleur jaune (0,85 mmol ; 0,294 g ; 85%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 346,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$

Point de fusion : 212°C

IR (KBr) : $\nu(\text{CONH}) = 1705 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{CONH}) = 2974 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{OH}) = 3333 \text{ cm}^{-1}$

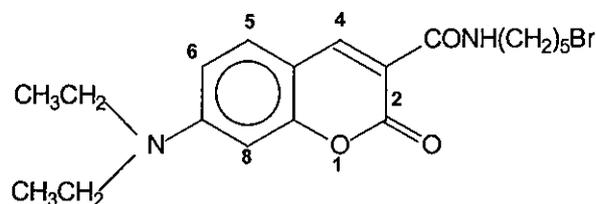
RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

1,27 (6H, t, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)	6,50 (1H, d, $-\text{H}_8$), $J = 2,92 \text{ Hz}$
1,58 (4H, m, $-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)	6,65 (1H, dd, $-\text{H}_6$), $J = 2,92 \text{ et } 8,77 \text{ Hz}$
1,91 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$)	7,43 (1H, d, $-\text{H}_5$), $J = 8,77 \text{ Hz}$
3,44 (9H, m, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$, $-\text{NHCH}_2$, $-\text{CH}_2\text{OH}$)	8,70 (1H, s, $-\text{H}_4$)
	8,82 (1H, s, CONH)

Analyse élémentaire : Calc.% : C = 65,89 ; H = 7,51 ; N = 8,09
 Tr. : C = 65,06 ; H = 7,38 ; N = 8,53

III.2.4.2.1.4 Synthèse du 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-bromopentane]coumarine-3-carboxamide, rotor DECB

A une solution de 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-hydroxypentane]coumarine-3-carboxamide (1 mmol ; 0,35 g) dans 8 mL de CH_2Cl_2 , est ajouté, sous atmosphère inerte, CBr_4 (1,4 mmol ; 0,46 g). Après 10 min d'agitation, la solution est refroidie par un bain de glace, puis Ph_3P (4,8 mmol ; 0,37 g) est additionné par fractions. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 nuit, concentré sous pression réduite, puis chromatographié sur colonne de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 9/1, v/v). Le produit cristallisé obtenu est de couleur jaune (0,8 mmol ; 0,327g ; 80%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 409,1 \text{ g.mol}^{-1}$	$\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{O}_3\text{N}_2\text{Br}$

Point de fusion : 148°C

IR (KBr) : $\nu(\text{CONH}) = 1705 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{CONH}) = 2975 \text{ cm}^{-1}$

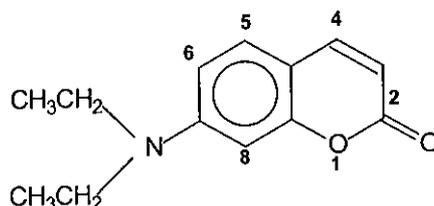
RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

1,27 (6H, t, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)	6,50 (1H, d, $-\text{H}_8$), $J = 2,92 \text{ Hz}$
1,58 (4H, m, $-(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-Br}$)	6,65 (1H, dd, $-\text{H}_6$), $J = 2,92 \text{ et } 8,77 \text{ Hz}$
1,91 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$)	7,43 (1H, d, $-\text{H}_5$), $J = 8,77\text{Hz}$
3,44 (8H, m, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2 + -\text{CH}_2\text{Br} + -\text{NHCH}_2-$)	8,70 (1H, s, $-\text{H}_4$)
	8,82 (1H, s, $-\text{CONH}$)

Analyse élémentaire : Calc.% : C 55,74 ; H 6,11 ; N 6,84 ; Br 19,54
 Tr. : C 55,80 ; H 6,22 ; N 6,89 ; Br 18,95

III.2.4.2.1.5 Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine

Un mélange de 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylate d'éthyle (7 mmol ; 2 g) dans 10 mL de HCl à 18% est porté à reflux pendant 5 h. Le mélange réactionnel est refroidi à température ambiante puis à 0°C, 2 mL d'une solution saturée d'acétate de sodium sont ensuite ajoutés. Après addition de 20 mL d'une solution de NaOH à 10% jusqu'à atteindre un pH de 4-5, le précipité obtenu est dissous, puis extrait par le dichlorométhane. La phase organique est lavée avec une solution de NaOH à 10% puis séchée sur sulfate de magnésium ; après évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif, un produit brun-jaune cristallisé est obtenu (6,3 mmol ; 1,37 g ; 90%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 217 \text{ g.mol}^{-1}$	$\text{C}_{13}\text{H}_{15}\text{NO}_2$

Point de fusion : 95°C

IR (KBr) : $\nu(\text{C}=\text{C}) = 1616 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{C}=\text{O}) = 1703 \text{ cm}^{-1}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

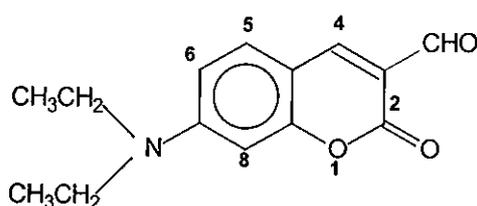
1,21 (6H, t, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)
 3,41 (4H, t, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)
 6,02 (1H, d, $-\text{H}_3$), $J = 9 \text{ Hz}$
 6,47 (1H, d, $-\text{H}_8$), $J = 2,5 \text{ Hz}$

6,55 (1H, dd, $-\text{H}_6$), $J = 2,5 \text{ Hz}$ et 9 Hz
 7,50 (1H, dd, $-\text{H}_5$), $J = 9 \text{ Hz}$
 8,22 (1H, d, $-\text{H}_4$), $J = 9 \text{ Hz}$

Analyse élémentaire : Calc.% : C 71,87 ; N 6,45 ; H 6,95
 Tr. : C 71,95 ; N 6,54 ; H 6,99

III.2.4.2.1.6 Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine

A 0,7 mL de DMF (9,5 mmol) agité, on ajoute goutte à goutte 0,9 mL de POCl₃ (9,7 mmol) sous atmosphère inerte pendant 45 min à 50°C. A cette solution est ajoutée la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine (6,8 mmol ; 1,5 g) dissoute dans 1,7 mL de DMF. Le mélange est chauffé à 60°C pendant 2 h. De l'eau (14 mL) est ensuite ajoutée dans le mélange réactionnel et l'agitation est poursuivie pendant 2 h. Le précipité orange est filtré, lavé à l'eau et séché dans un dessiccateur (5,1 mmol ; 1,25 g ; 75%).



Masse Molaire	Formule Brute
M = 245 g.mol ⁻¹	C ₁₄ H ₁₅ NO ₃

Point de fusion : 170°C

IR (KBr) : $\nu(\text{HC}=\text{O}) = 1719 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{HC}=\text{O}) = 2715 \text{ cm}^{-1}$

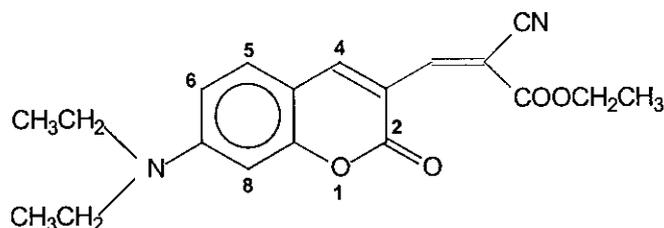
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,25 (6H, t, -N(CH ₂ CH ₃) ₂)	7,42 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
3,47 (4H, q, -N(CH ₂ CH ₃) ₂)	8,26 (1H, s, -H ₄), J = 9 Hz
6,49 (1H, d, -H ₈), J = 2,5 Hz	10,13 (1H, s, -CHO)
6,63 (2H, dd, -H ₆), J = 9 Hz et 2,5 Hz	

Analyse élémentaire : Calc.% : C 68,56 ; N 5,71 ; H 6,16
 Tr. : C 68,04 ; N 6,76 ; H 6,14

III.2.4.2.1.7 Synthèse de la 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylate d'éthyle, rotor CNCOOEt

Dans un ballon de 50 mL, un mélange constitué de la 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine (4 mmol ; 1 g) et de cyanoacétate d'éthyle (5 mmol ; 0,5 mL) dans 6 mL d'éthanol est traité avec 80 μ L de pipéridine. Le mélange est porté à reflux pendant 1 h, concentré sous pression réduite et purifié sur colonne de silice (éluant : CH₂Cl₂/Hexane, 9/1, v/v). Le produit cristallisé obtenu est de couleur rouge foncé (2,8 mmol ; 0,952 g ; 70%).



Masse Molaire	Formule Brute
M = 340 g.mol ⁻¹	C ₁₉ H ₂₀ N ₂ O ₄

Point de fusion : 170°C

IR (KBr) : $\nu(\text{COOEt}) = 1725 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{CN}) = 2211 \text{ cm}^{-1}$

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,25 (6H, t, -N-(CH ₂ CH ₃) ₂)	6,63 (2H, dd, -H ₆), J = 2,5 Hz et 9Hz
1,38 (3H, q, -OCH ₂ CH ₃)	7,42 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
3,47 (4H, q, -N(CH ₂ CH ₃) ₂)	8,26 (1H, s, -H ₄), J = 9 Hz
4,36 (2H, q, -OCH ₂ CH ₃)	8,87 (1H, s, -CH=)
6,45 (1H, d, -H ₈), J = 2,5 Hz	

Analyse élémentaire : Calc.% : C 67,04 ; N 8,23 ; H 5,93
 Tr. : C 66,89 ; N 7,93 ; H 6,08

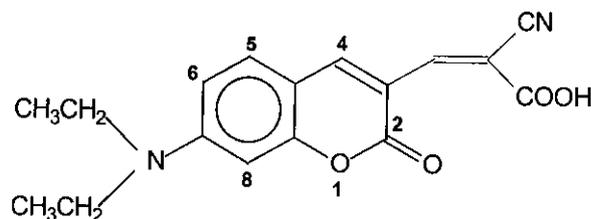
III.2.4.2.1.8 Synthèse de l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique, rotor CNCOOH

Première voie de synthèse

A température ambiante, un mélange équimolaire de 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine (4 mmol ; 1 g) et d'acide cyanoacétique (4 mmol ; 0,35 g) est additionné dans un ballon de 100 mL contenant 30 mL de méthanol et de l'oxyde de magnésium (4,9 mmol ; 0,20 g). Ensuite, le mélange réactionnel est agité à température ambiante pendant 24 h. Le brut réactionnel est filtré sur célite, lavé avec du CH_2Cl_2 tant que le support reste coloré en présence du rotor. L'évaporation sous pression réduite conduit à un composé solide rouge foncé avec une grande pureté (1,06 g ; 85%).

Deuxième voie de synthèse

Un mélange constitué de 7-(N,N-diéthylamino)-3-formylcoumarine (2 mmol ; 0,5 g) et d'acide cyanoacétique (4 mmol ; 0,4 g) dans 7 mL d'éthanol est traité avec 40 μL de pipéridine. Le mélange est porté à reflux pendant 1 h concentré à l'évaporateur rotatif et purifié sur colonne de silice (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{CH}_3\text{OH}$, 8/2, v/v) pour conduire au produit cristallisé rouge foncé attendu (1,6 mmol ; 0,5 g ; 80%). La première voie de synthèse est plus facile à mettre en œuvre car il n'est pas nécessaire d'effectuer une colonne chromatographique pour purifier le produit.



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 312 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4$

Point de fusion : 263°C

IR (KBr) : $\nu(\text{COOH}) = 1729\text{cm}^{-1}$
 $\nu(\text{COOH}) = 3431\text{cm}^{-1}$

RMN ^1H (Acétone D_6 , 200 MHz)

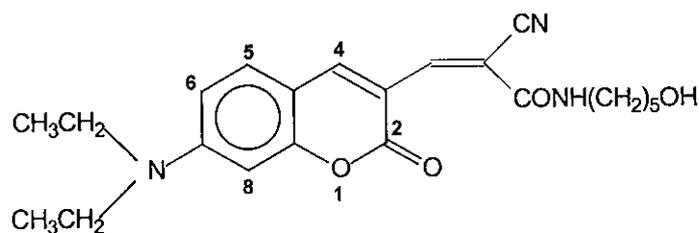
1,25 (6H, t, -N-(CH_2CH_3)₂)
 3,63 (4H, q, -N-(CH_2CH_3)₂)
 6,58 (1H, d, -H₈), J = 2,5 Hz

6,88(2H, dd, -H₆), J = 2,5 Hz et 9Hz
 7,62 (1H, d, -H₅), J = 9 Hz
 8,46 (1H, s, -H₄), J = 9 Hz
 8,85 (1H, s, -CH=)

Analyse élémentaire : Calc.% : C 65,38 ; N 8,97 ; H 5,16
 Tr. : C 65,29 ; N 8,42 ; H 5,49

III.2.4.2.1.9 Synthèse du 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-hydroxypentane]coumarine-3-cyanoacrylamide, rotor DECCNOH

Dans un tricol de 100 mL, l'acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique (1 mmol ; 0,312 g) est dissous dans 5 mL de CH₂Cl₂. A cette solution refroidie à 0°C, sous atmosphère inerte et sous agitation, sont ajoutés goutte à goutte successivement l'hydroxybenzotriazole (1,2 mmol ; 0,206 g) en solution dans 2 mL de DMF et le dicyclohexylcarbodiimide (1 mmol ; 0,162 g) en solution dans 4 mL de CH₂Cl₂. Après retour à température ambiante et agitation du milieu réactionnel pendant 30 min, l'aminopentanol (1 mmol ; 0,103 g) solubilisé dans 5 mL de CH₂Cl₂ est additionné goutte à goutte. Le milieu réactionnel est agité à température ambiante pendant deux jours puis filtré et lavé au CH₂Cl₂. Le solvant est évaporé sous pression réduite et le résidu est chromatographié sur gel de silice (éluant : AcOEt/CH₂Cl₂ de 25/75 à 100/0, v/v). Le produit cristallisé obtenu est rouge (0,86 mmol ; 0,34 g ; 80%).



Masse Molaire	Formule Brute
M = 397,2 g.mol ⁻¹	C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₄

Point de fusion : 139°C

IR (KBr) : $\nu(\text{CONH}) = 1711 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{OH}) = 3372 \text{ cm}^{-1}$

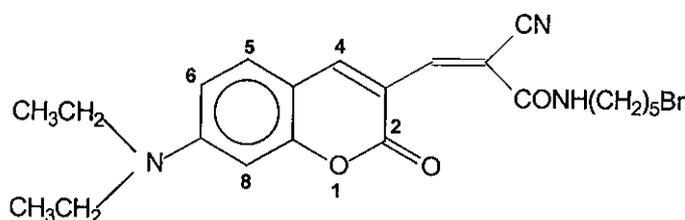
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,25 (6H, t, -N(CH ₂ CH ₃) ₂)	6,30 (1H, m, -CONH-)
1,44-1,67 (6H, m, -(CH ₂) ₃ -)	6,49 (1H, d, -H ₈), J = 2,5 Hz
3,45 (4H, q, -N(CH ₂ CH ₃) ₂)	6,63 (1H, dd, -H ₆), J = 2,5 Hz
3,65 (2H, m, -NHCH ₂ -)	7,42 (1H, d, -H ₅), J = 9 Hz
4,05 (3H, m, -CH ₂ OH)	8,26 (1H, s, -H ₄), J = 9 Hz
	8,85 (1H, s, -CH=)

Analyse élémentaire : Calc.% : C 66,49 ; N 10,58 ; H 6,80
 Tr. : C 66,89 ; N 10,58 ; H 6,85

III.2.4.2.1.10 Synthèse du 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-bromopentane]coumarine-3-cyanoacrylamide, rotor DECCNBr

Dans un ballon de 50 mL et sous atmosphère inerte, au 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-hydroxypentane]coumarine-3-cyanoacrylamide (2,5 mmol ; 1 g) dilué dans 7 mL de CH_2Cl_2 , est ajouté, sous atmosphère inerte, CBr_4 (1,4 éq. ; 1,17 g). Après 10 min d'agitation, la solution est refroidie par un bain de glace, puis Ph_3P (2,8 éq. ; 1,85 g) est additionné par fractions. Le milieu réactionnel est agité pendant 1 nuit, concentré sous pression réduite, puis chromatographié sur colonne de silice (éluant : $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, 9/1, v/v). Le produit cristallisé obtenu est de couleur rouge vif (2 mmol ; 0,915 g ; 80%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 459,2 \text{ g.mol}^{-1}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_3\text{Br}$

Point de fusion : 152°C

IR (KBr) : $\nu(\text{CONH}) = 1711 \text{ cm}^{-1}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

1,25 (6H, t, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$)	6,26 (1H, m, $-\text{CONH}-$)
1,63 (4H, m, $-(\text{CH}_2)_2$)	6,49 (1H, d, $-\text{H}_8$), $J = 2,5 \text{ Hz}$
1,91 (2H, q, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Br}$)	6,63 (1H, dd, $-\text{H}_6$), $J = 2,5 \text{ Hz}$ et 9 Hz
3,45 (6H, m, $-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2 + \text{NH}-\text{CH}_2 + -\text{CH}_2\text{Br}$)	7,42 (1H, d, $-\text{H}_5$), $J = 9 \text{ Hz}$
	8,26 (1H, s, $-\text{H}_4$)
	8,68 (1H, s, $-\text{CH}=\text{C}$)

Analyse élémentaire : Calc.% : C 57,39 ; N 9,13 ; H 5,65 ; Br 17,18
Tr. : C 57,96 ; N 8,39 ; H 5,45 ; Br 16,58

III.2.4.2.2 Protocoles de synthèse et caractéristiques physico-chimiques des polysaccharides

III.2.4.2.2.1 Carboxyméthylation : obtention du carboxyméthyl-dextrane (CMD)

Dans un tricol de 500 mL muni d'un réfrigérant, 10 g de dextrane T40 sont mis en suspension dans 215 mL d'isopropanol, puis 40 mL d'une solution de soude (9 M) sont ajoutés goutte à goutte. Le mélange réactionnel est agité durant 1h à température ambiante. Ensuite, l'acide monochloroacétique (154 mmol ; 14,6 g) est additionné par petites quantités à la spatule. Le mélange est alors chauffé à 60°C pendant 90 min. La solution biphasique, refroidie par un bain de glace, est neutralisée à pH 7 par de l'acide acétique glacial, puis précipitée deux fois dans une solution éthanolique (eau/éthanol = 1/10, v/v). Le CMD obtenu est séché dans une étuve à vide à 40°C (10,2 g ; 75 %).

III.2.4.2.2.2 Benzylamidification : obtention du carboxyméthylbenzylamide (CMDB)

Dans un tube en verre de 25 mL, 1,3 g de CMD sont dissous dans 5 mL d'eau. Après dissolution totale, le pH est réglé à 3,5 à l'aide d'une solution d'acide chlorhydrique 3 N ; d'autre part 13,6 g de N-éthoxycarbonyl-2-éthoxy-1,2-dihydroquinoléine (EEDQ) sont dissous dans 6 mL d'éthanol en chauffant légèrement afin d'en faciliter la dissolution. La solution d'EEDQ est ajoutée goutte à goutte à la solution aqueuse de CMD sous agitation et à 40°C, pendant 30 min. Le pH apparent du mélange est maintenu entre 4 et 5 pendant toute la durée de l'addition. Si nécessaire le pH est ajusté à l'aide d'une solution HCl 0,3 N. 596 µL de benzylamine sont ensuite additionnés rapidement au mélange réactionnel qui devient alors translucide. Le mélange est agité 2 h et transféré dans un ballon de 50 mL pour évaporer sous pression réduite l'éthanol. La phase aqueuse est ensuite extraite plusieurs fois à l'acétate d'éthyle (jusqu'à ce que la phase organique ne soit plus de couleur jaune). La phase aqueuse est ensuite précipitée deux fois dans l'éthanol. Le CMDB obtenu est séché dans une étuve à vide à 40°C (0,9 g ; 65%).

III.2.4.2.2.3 Greffage des amines primaires

Dans un ballon de 25 mL, 1 g de polysaccharide est dissous dans 5 mL d'eau. Le mélange est refroidi à 4°C pendant 20 min, puis le pH est ajusté à 11 avec une solution de soude 4 M afin d'activer les fonctions hydroxyle. L'hydrobromure de 3-bromopropylamine (BPA) est ajouté au milieu réactionnel en proportion variable selon le polysaccharide (Tableau A-6).

Après 4 h d'agitation à température ambiante, la réaction est arrêtée en ajoutant de l'acide acétique glacial jusqu'à l'obtention d'un pH de 6,5.

Polysaccharide	BPA	Rapport molaire BPA/unité glucose
CMD	0,85 g	1
CMDB	1 g	1
Héparine	1,4 g	2

Tableau A-6 : Proportions d'hydrobromure de 3-bromopropylamine (BPA) par g de polysaccharide (CMD, CMDB et héparine)

III.2.4.2.2.4 Protocole de couplage des polysaccharides aminés avec les rotors COOH et CNCOOH

Dans un ballon de 50 mL, l'acide COOH ou CNCOOH (de façon arbitraire, nous avons choisi un rapport molaire acide/unité glycosyle = 1) est mis en solution dans 2 mL de DMF avec du N-hydroxysuccinimide (1,2 éq.) et la DCCI (1 éq.). Le mélange est agité pendant 2 h à température ambiante, puis filtré et ajouté à une solution de polysaccharide (1 g/10 mL). Le mélange est agité pendant une nuit.

III.2.4.2.2.5 Purification des polysaccharides

Les méthodes utilisées pour purifier les polysaccharides sont la précipitation et la dialyse.

➤ Précipitation

Il est nécessaire de dissoudre le polysaccharide dans de l'eau, à raison de 200 mg par mL d'eau. la précipitation est réalisée à froid dans un volume d'éthanol environ dix fois supérieur au volume d'eau. La précipitation est réalisée 3 fois.

➤ Dialyse

Les polysaccharides sont dissous dans de l'eau. La solution est alors placée dans un boudin de dialyse spectra/Por avec un seuil de coupure de $6-8\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ et dialysée dans un volume d'eau bidistillée constant. Après 5 jours de dialyse, le contenu du boudin est transféré dans un ballon et congelé à -80°C pour être lyophilisé.

III.2.4.2.2.6 *Caractérisation des polysaccharides*

Les caractérisations des produits, notamment le dosage acidimétrique et le dosage par la fluorescamine des fonctions amine libres permettent de déterminer la proportion des différents motifs greffés sur la chaîne de dextrane. Ces caractérisations sont réalisées sur des produits parfaitement purs (contrôlés par CLHP).

➤ Dosage acidimétrique des fonctions carboxyliques

La teneur en fonctions carboxylique, exprimée en milliéquivalent par gramme de produit sec (még/g), à l'état de sel de sodium, est déterminée par dosage potentiométrique à l'aide d'une électrode de verre combinée (référence Ag/AgCl ; Tacussel).

Pour que le palier tampon soit observable, le dosage est effectué en milieu eau-acétone 50/50, afin d'élever le pKa depuis la valeur 3,5 jusqu'à la valeur apparente 4,9.

25 mg de produit pur et préalablement séché à l'étuve à 40°C, sont mis en solution dans un mélange eau/acétone, 50/50, v/v, afin d'obtenir une solution de concentration finale 0,25 mg/mL. Le pH apparent de la solution compris entre 7 et 8 est ramené à 2,8 à l'aide de quelques gouttes d'une solution d'acide nitrique à 10%. Le dosage est alors réalisé avec une solution de soude de titre connu, additionnée à l'aide d'une microburette de précision. Sur chaque produit, trois dosages ont été réalisés.

➤ Dosage des fonctions amine primaire par la fluorescamine

Dans une fiole jaugée de 10 mL, 10 mg de fluorescamine sont dissous dans 10 mL d'acétone (cette solution peut être conservée un mois au réfrigérateur). D'autre part, 1 mg de polysaccharide aminé est dissous dans 10 mL d'eau.

Le protocole de dosage est le suivant : dans une fiole jaugée de 10 mL, on ajoute successivement 5 mL de tampon borax à pH = 9, de 300 à 800 µL de solution de polymère, 400 µL de solution de fluorescamine, puis on complète à 10 mL avec de l'eau permutée. Le mélange est agité pendant 1 min puis la solution est analysée en spectroscopie de fluorescence et comparée à une courbe étalon obtenue avec de la bromopropylamine libre (protocole identique au précédent avec une solution mère de bromopropylamine à 10⁻⁵ M).

III.3 ETUDE PHOTOPHYSIQUE

III.3.1 Matériels et méthodes

III.3.1.1 Matériels

Solvants

Les solvants utilisés pour l'étude photophysique des composés sont, sauf indications complémentaires, de qualité Spectrosol :

- Acétate d'éthyle (SdS, réf. 00227)
- Acétone (SdS, réf. 00527)
- Chloroforme (SdS, réf. 024 27E)
- Dichlorométhane (SdS, réf. 029 27E)
- Diéthyléther (SdS, réf. 04427)
- Ethanol absolu (SdS, réf. 013 A27)
- Glycérol (Prolabo, réf. 24 388.295)
- Méthanol (SdS, réf. 09327)
- Toluène (SdS, réf. 07127)

Produits utilisés

Les produits utilisés pour cette étude sont issus des synthèses décrites précédemment.

- le 7-N,N-diéthylaminocoumarine-3-carboxylate d'éthyle : rotor COOEt
- l'acide 7-N,N-diéthylaminocoumarine-3-carboxylique : rotor COOH
- le 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-hydroxypentane]coumarine-3-carboxamide :
- rotor DECOH
- le 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-bromopentane]coumarine-3-carboxamide :
- rotor DECB_r
- la 7-(N,N-diéthylaminocoumarine)-3-cyanoacrylate d'éthyle : rotor CNCOOEt
- l'acide 7-(N,N-diéthylaminocoumarine)-3-cyanoacrylique : rotor CNCOOH
- la 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-hydroxypentane]coumarine-3-cyanoacrylamide :
- rotor DECCNOH
- la 7-(N,N-diéthylamino)-N-[5'-bromopentane]coumarine-3-cyanoacrylamide :
- rotor DECCNBr
- les différents polymères (dextranes modifiés et héparine) fluorescents synthétisés.

Les mesures d'intensité de fluorescence sont des mesures relatives puisqu'elles dépendent des fonctions de l'appareil (lampe, monochromateurs, fentes, photomultiplicateur, etc.). Pour s'affranchir de ces différents paramètres, il est nécessaire d'utiliser une référence et de rapporter les valeurs des intensités de fluorescence des différents rotors à cette référence. Nous avons choisi comme référence une solution aqueuse de fluorescéine (Fluka, réf. 46960) de concentration 5.10^{-6} M ($\lambda_{ex} = 490$ nm, $\lambda_f = 517$ nm). Pour toutes les mesures, la largeur des fentes a été fixée à 1,5 mm, ce qui correspond à une bande passante de 5,66 nm. Enfin, pour toutes les études de spectroscopie (UV-Visible, fluorescence) nous avons utilisé une cuve en quartz ayant un parcours optique de 1 cm.

III.3.1.2 Méthodes

III.3.1.2.1 Spectroscopie d'absorption UV-Visible

Les spectres d'absorption UV-Visible sont enregistrés sur un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 2. Cet appareil permet de mesurer l'absorbance ou densité optique d'une substance de concentration connue, pour les diverses longueurs d'onde d'absorption λ selon la loi de Beer-Lambert : $I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon \cdot C \cdot l}$

- I intensité lumineuse transmise
- I_0 intensité lumineuse incidente
- ε coefficient d'extinction molaire à la longueur d'onde λ ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$)
- C concentration ($mol \cdot L^{-1}$)
- l trajet optique (cm)

L'absorbance (ou densité optique, valeur sans unité) DO_λ à la longueur d'onde λ correspond à $DO_\lambda = \log_{10}(I_0/I) = \varepsilon \cdot C \cdot l$

Le tracé des spectres peut se faire soit en absorbance, soit en transmission, et dans ce cas I/I_0 est exprimé en % et l'absorbance est égale à $-\log_{10}T$.

Connaissant la concentration d'une substance et le parcours optique de la cellule, il est possible de déterminer la valeur du coefficient d'extinction molaire ε pour une longueur d'onde d'absorption considérée.

III.3.1.2.2 Spectroscopie de fluorescence en excitation continue

Les spectres de fluorescence en excitation continue sont enregistrés sur un spectrofluorimètre SPEX, Fluorolog-2, dont le principe est schématisé sur la Figure A-42, piloté et contrôlé par un ordinateur IBM PC/XT.

Le spectrofluorimètre est équipé d'une lampe Xénon (puissance 450 W) dont l'image est focalisée sur la fente d'entrée du monochromateur d'excitation : celui-ci permet de sélectionner la longueur d'onde d'excitation λ_{ex} de la lumière qui excite l'échantillon. La correction de la lampe est assurée par un système de référence interne à l'appareil : une solution de rhodamine B à 0,02 M dans l'éthylène glycol.

Les monochromateurs d'excitation et d'analyse sont de type 1681 (bande passante (nm) = largeur de fente (mm) x 3,77) ; ils permettent de choisir respectivement les longueurs d'onde d'excitation et d'analyse. Une fraction de la luminescence émise par l'échantillon est renvoyée vers la fente d'entrée du monochromateur d'émission (dit encore d'analyse). Ce dernier en transmet une étroite bande spectrale centrée sur la longueur d'onde d'émission λ_{em} .

Le système de détection est un photomultiplicateur de type Hamamatsu R928 utilisé en compteur de photons. Placé à la sortie du monochromateur, il détecte la quantité de lumière correspondant à λ_{em} et génère un signal qui, après amplification, peut être utilisé de diverses façons.

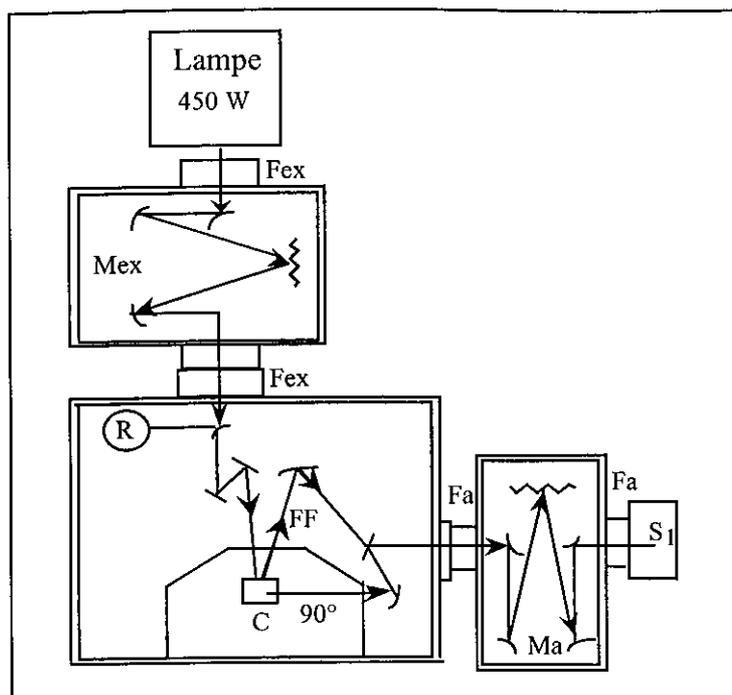


Figure A-42 : Schéma représentatif de la configuration du SPEX

Analyse possible selon deux modes : FF : "Front Face" et à angle droit (90°)

- | | |
|---------------------------------------|---|
| C : Compartiment cellule | Fex : Fente à l'excitation |
| Fa : Fente à l'analyse | Mex : Monochromateur à l'excitation |
| Ma : Monochromateur à l'analyse | R : Système de référence pour la correction de la lampe |
| S ₁ : Système de détection | |

La grande sensibilité de cet appareil permet des mesures de fluorescence pour de très faibles concentrations. Les mesures de fluorescence en excitation continue sont généralement réalisées à l'aide du montage classique (analyse à 90°). Les mesures quantitatives pour corrélérer l'intensité de fluorescence à la concentration du fluorophore ne peuvent se faire que pour de faibles absorbances ($\leq 0,2$) pour éviter les problèmes liés à l'effet de "peau" (réception non homogène de l'émission de fluorescence à l'entrée du monochromateur d'analyse due à une trop grande absorption de la solution à la surface d'entrée de la lumière incidente).

Pour cela, on utilise dans la plupart des cas des solutions en sonde fluorescente de concentration avoisinant $5 \cdot 10^{-6}$ M.

Dans le cas où l'étude nécessite des concentrations élevées en fluorophore (donc des absorbances $> 0,2$) un dispositif différent de l'analyse à 90° peut être utilisé, à savoir un dispositif où l'excitation et l'analyse sont frontales (dispositif "Front Face").

Cet appareil permet de réaliser soit des spectres d'excitation, soit des spectres d'émission. Le spectre d'excitation affiche la variation d'intensité de l'émission mesurée à longueur d'onde fixée, pendant que la longueur d'onde d'excitation parcourt le spectre d'absorption. Réciproquement, le spectre d'émission traduit la variation d'intensité de luminescence en fonction de la longueur d'onde d'observation, pour une excitation à une longueur d'onde fixe donnée. Cette longueur d'onde d'excitation correspond soit à $\lambda_{\text{absorption max.}}$, soit à une longueur d'onde d'absorption moyenne définie par les exigences liées aux déterminations des rendements quantiques de fluorescence.

Enfin, le logiciel de traitement, lié à cet appareil permet de sélectionner et d'agrandir une partie du spectre et également de superposer différentes courbes, d'effectuer un traitement mathématique sur les spectres (normalisation, soustraction de différents spectres) et également de calculer l'aire sous la courbe. Par ailleurs, il permet de réaliser des enregistrements de l'émission de fluorescence en fonction du temps.

III.3.1.2.3 Principe de détermination des rendements quantiques de fluorescence

Le rendement quantique d'émission de fluorescence Φ_f est le rapport du nombre de photons émis par unité de temps, au nombre de photons absorbés durant le même temps. Cela se traduit par la relation suivante :

$$\Phi_f = \frac{\text{Nombre de photons émis par fluorescence}}{\text{Nombre de photons absorbés}}$$

La détermination expérimentale des rendements quantiques de fluorescence est en général effectuée par comparaison des spectres d'émission des composés de référence dont le rendement quantique est connu. En effet, la mesure du rendement quantique est délicate pour des raisons techniques (difficultés de réaliser un flux photonique incident constant dans tout le domaine spectral d'absorption et nécessité d'introduire des corrections pour la variation du flux avec la longueur d'onde). Le principe de détermination du rendement quantique de fluorescence peut se décrire comme suit :

- les deux composés, composé X à analyser ($\Phi_{f,X}$ à déterminer) et le composé de référence ($\Phi_{f,Référence}$) sont excités à la même longueur d'onde (pour éviter les corrections relatives aux éléments de l'excitation : lampe, monochromateur d'excitation, etc.) pour des valeurs d'absorbance $< 0,2$ (pour être dans des conditions de non saturation en relation avec l'effet de peau),
- les spectres d'émission de l'échantillon et du témoin sont enregistrés, corrigés par rapport à une solution aqueuse de fluorescéine de concentration $5 \cdot 10^{-6}$ M, et les aires sous la courbe sont mesurées (calcul effectué par le logiciel d'exploitation),
- les valeurs d'absorbance du composé (DO_X) et de la référence ($DO_{Référence}$) sont lues sur les spectres d'absorption UV-Visible, à la longueur d'onde d'excitation choisie,
- enfin, les solutions à analyser étant prises dans différents solvants, une correction sur les valeurs des indices de réfraction du solvant considéré par rapport à celui du témoin, est effectuée.

La détermination de $\Phi_{f,X}$ repose finalement sur le calcul suivant :

$$\Phi_{f,X} = \Phi_{f,Référence} \left(\frac{Aire_X}{Aire_{Référence}} \right) \left(\frac{DO_{Référence}}{DO_X} \right) \left(\frac{n_X}{n_{Référence}} \right)^2$$

III.3.2 Etude des rotors moléculaires fluorescents

L'étude du comportement photophysique des différents rotors moléculaires a pour objectif de déterminer d'une part leurs propriétés d'absorption photonique (ce qui nous permettra de fixer le domaine de longueur d'onde d'excitation propre à chaque rotor) et d'autre part leurs propriétés d'émission de fluorescence en excitation continue.

La particularité la plus étudiée des rotors moléculaires fluorescents, est leur comportement photophysique très sensible à la polarité et à la viscosité de leur environnement. En effet, leurs propriétés d'absorption et d'émission de fluorescence (longueurs d'onde d'émission maximales : $\lambda_{f \max}$; rendements quantiques de fluorescence : ϕ_f) dépendent de la polarité, de la viscosité, ou de la température du milieu d'étude : ce sont ces propriétés qui seront mises en évidence dans la suite de ce travail.

III.3.2.1 Spectroscopie UV-Visible

Les propriétés d'absorption UV-Visible de huit rotors ont été étudiées dans des solvants qui possèdent tous des caractéristiques différentes en terme de polarité. A titre d'exemple, nous présentons les spectres du rotor COOEt (Figure A-43).

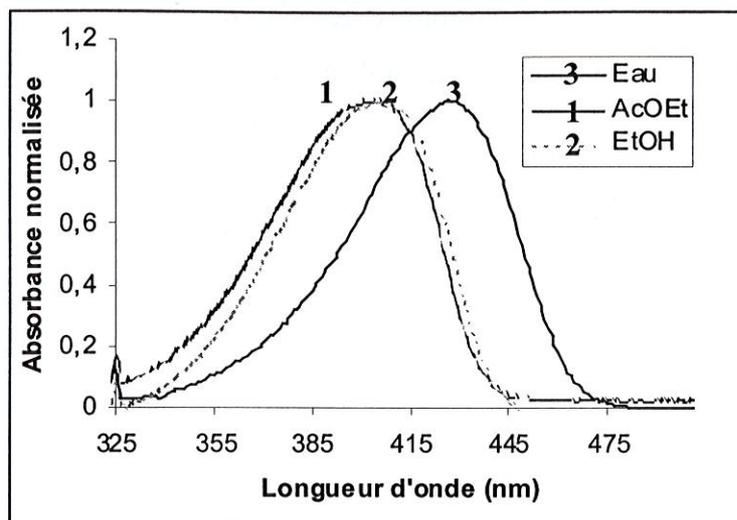


Figure A-43 : Spectres d'absorption du rotor COOEt dans trois solvants différents à 25°C

Tous les composés présentent le même type de spectre. Nous avons résumé dans le Tableau A-7 les caractéristiques d'absorption des différents rotors dans les 3 solvants considérés.

Rotor	Solvant $E_T(30)$	AcOEt 38,1	EtOH 51,9	Eau 63,1
COOEt*	$\lambda_{a \text{ max}}$	403	410	428
	ϵ	40860	44180	21300
COOH*	$\lambda_{a \text{ max}}$	424	396	410
	ϵ	43140	25380	30460
DECOH	$\lambda_{a \text{ max}}$	408	418	428
	ϵ	45600	41600	33520
DECBr	$\lambda_{a \text{ max}}$	410	419	429
	ϵ	64000	10600	10000
CNCOOEt*	$\lambda_{a \text{ max}}$	498	505	510
	ϵ	47020	30940	13640
CNCOOH*	$\lambda_{a \text{ max}}$	500	454	478
	ϵ	39320	38660	42300
DECCNOH	$\lambda_{a \text{ max}}$	469	476	487
	ϵ	52020	55200	40200
DECCNBr	$\lambda_{a \text{ max}}$	467	478	487
	ϵ	42000	50000	20000

* Composés décrits par Geoffroy-Chapotot, 1998

Tableau A-7 : Caractéristiques d'absorption UV-Visible des rotors pour des concentrations en composé de $5 \cdot 10^{-6}$ M ($\lambda_{a \text{ max}}$ en nm ; ϵ en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$; $E_T(30)$ en $kcal \cdot mol^{-1}$ à 25°C)

Les trois solvants sont classés par ordre de polarité croissante (le paramètre ET(30) de Reichardt est utilisé comme indicateur de polarité) pour mettre en évidence le déplacement bathochrome des longueurs d'onde d'absorption avec l'augmentation de polarité.

Nous pouvons remarquer une augmentation de la longueur d'onde d'absorption par ajout d'une double liaison (passage du rotor COOEt au rotor CNCOOEt), on note une évolution de 90 nm dans les longueurs d'onde d'absorption, et ce quel que soit le solvant. De plus, dans les solvants protiques, nous pouvons noter un déplacement des longueurs d'onde d'absorption lorsque l'on passe du dérivé ester à son homologue acide.

L'explication la plus probable, réside dans la possibilité d'un échange d'hydrogène entre le groupement acide et la fonction amino du groupement diéthylamino, conduisant à un ion ammonium de telle sorte que la molécule ne joue plus sa fonction de rotor et donc que l'influence du solvant n'intervient plus.

III.3.2.2 Spectroscopie d'émission de fluorescence

En conservant les mêmes solvants que pour l'étude en spectroscopie UV-Visible, nous avons effectué les spectres d'émission de fluorescence en excitation continue des différents rotors coumarine. Les spectres d'émission des différents solvants purs ont été soustraits des spectres obtenus pour les différentes coumarines. A titre d'exemple nous présentons les spectres en émission de fluorescence du rotor COOEt (Figure A-44).

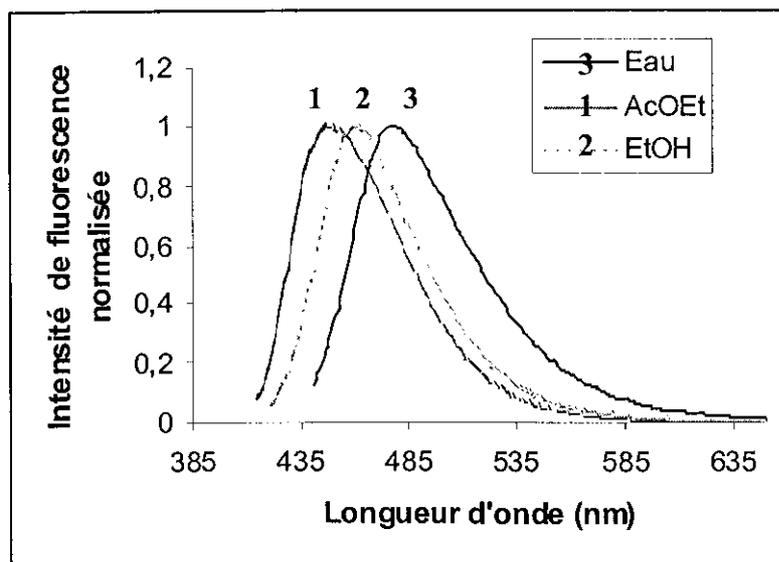


Figure A-44 : Spectres en émission de fluorescence du rotor COOEt dans 3 solvants différents ($\lambda_{exc} = 420 \text{ nm}$)

Les rendements quantiques de fluorescence des rotors dérivés de coumarine ont été calculés en utilisant comme références :

- une solution aqueuse de fluorescéine (pH 10 à 25°C) de rendement quantique de fluorescence $\Phi_f = 0,81$ dans les mêmes conditions [Viriot et André, 1989], dans le cas des rotors CNCOOEt, CNCOOH, DECCNOH et DECCNBr
- une solution de 4-(N,N-diméthylamino)benzylidène malonitrile dans le glycérol à 25°C de rendement quantique de fluorescence $\Phi_f = 0,021$ dans les mêmes conditions [Loutfy et al., 1982], dans le cas des rotors COOEt, COOH, DECCOH et DECCBr.

Les caractéristiques d'émission de fluorescence ($\lambda_{f \max}$ et ϕ_f) des huit rotors, dans les 3 solvants, sont regroupées dans le Tableau A-8.

Rotor	Solvant	AcOEt	EtOH	Eau
	$E_T(30)$	38,1	51,9	63,1
COOEt*	$\lambda_{f \max}$	448	462	477
	ϕ_f	0,651	0,100	0,013
COOH*	$\lambda_{f \max}$	461	449	474
	ϕ_f	0,157	0,409	0,022
DECOH	$\lambda_{f \max}$	448	467	480
	ϕ_f	0,250	0,402	0,051
DECCBr	$\lambda_{f \max}$	448	466	490
	ϕ_f	0,551	0,401	0,011
CNCOOEt*	$\lambda_{f \max}$	548	562	563
	ϕ_f	0,032	0,161	0,007
CNCOOH*	$\lambda_{f \max}$	534	528	555
	ϕ_f	0,032	0,083	0,042
DECCNOH	$\lambda_{f \max}$	540	557	569
	ϕ_f	0,352	0,156	0,065
DECCNBr	$\lambda_{f \max}$	541	558	570
	ϕ_f	0,052	0,352	0,013

* Composés décrits par Geoffroy-Chapotot, 1998

Tableau A-8 : Caractéristiques d'émission de fluorescence des rotors moléculaires dérivés de coumarine à 25°C dans 3 solvants différents
($\lambda_{f \max}$ en nm, $E_T(30)$ en kcal.mol⁻¹ à 25°C)

L'analyse du Tableau A-8 permet de constater que dans un environnement de très forte polarité, tel que l'eau, les différents dérivés aminocoumarine présentent un rendement quantique de fluorescence très réduit. Cette réponse, en terme de rendement quantique de fluorescence, dans les solvants polaires, est fonction des substituants de la coumarine.

Ceci peut être attribué à la désactivation non radiative de ces composés suite à la formation d'un état hautement polaire TICT depuis l'état excité singulet S_1 .

Plusieurs paramètres influencent fortement la fluorescence comme la température, le pH, la polarité du milieu ou encore la viscosité du milieu. Les rotors moléculaires ont la particularité d'être très sensibles, comme nous venons de le voir, à la polarité du milieu mais aussi à la viscosité du milieu.

Nous avons voulu mettre en évidence l'influence de la viscosité du milieu sur le comportement photophysique des rotors. Cependant, la variation de viscosité d'un milieu n'est pas aisée à réaliser sans changer d'autres paramètres qui pourraient eux-mêmes modifier les caractéristiques photophysiques. En effet, quel que soit le mode adopté pour faire varier la viscosité, il est accompagné d'une influence supplémentaire. A titre d'exemple :

- le changement de la viscosité peut être obtenu en combinant des mélanges isothermes de solvants. Dans ce cas on modifie, outre la viscosité, la nature du solvant en terme de polarité,
- le changement de viscosité d'un solvant peut également être obtenu par des modifications de pression, qui vont également entraîner des changements intrinsèques du fluorophore,
- il est possible aussi de travailler avec un même solvant à différentes températures, et dans ce cas les variations de température modifient également les propriétés du fluorophore.

C'est néanmoins ce dernier protocole que nous avons choisi d'exploiter.

Toute restriction dans la réorientation intramoléculaire résultant d'interactions entre le soluté et le solvant se traduit par une augmentation du rendement quantique de fluorescence.

Ainsi, les réorientations moléculaires qui affectent le déclin de fluorescence *via* une rotation, sont généralement des processus induits par des changements de température qui suivent une loi de type Arrhénius :

$$k_{nr} = A \exp\left(-\frac{E_a}{RT}\right)$$

Dans cette expression, E_a représente l'énergie d'activation apparente, c'est-à-dire la somme des barrières énergétiques visco- et thermodépendantes.

La constante k_{nr} des transitions non radiatives augmente donc avec la température, ce qui implique la diminution du rendement quantique de fluorescence avec l'augmentation de

température. La voie principale de relaxation non radiative dans un solvant donné étant l'isomérisation photochimique, la diminution de température augmente donc la possibilité des transitions radiatives aux dépens des transitions non radiatives.

Le rendement quantique de fluorescence peut être exprimé en fonction des constantes de déclin radiatif (k_r) et non radiatifs (k_{nr}) conduisant à l'expression :

$$\frac{1}{\phi_f} - 1 = \frac{A}{k_r} \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right)$$

Ainsi, un changement dans la viscosité du solvant, dû à une variation de température, peut se traduire par une droite de pente négative (E_a/R) lorsque l'on trace $\ln((1/\Phi_f) - 1)$ en fonction de $1/T$ [Lukac, 1984]. On a ainsi accès à l'énergie d'activation pour la rotation du rotor dans le glycérol (Figure A-45).

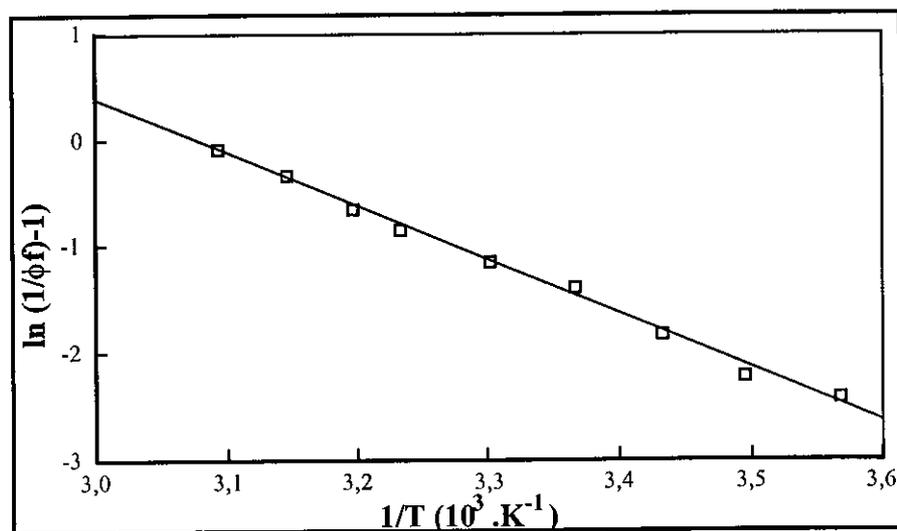


Figure A-45 : : Variation de l'intensité de fluorescence $\ln((1/\Phi_f) - 1)$ en fonction de $1/T$ pour le rotor CNCOOEt dans le glycérol

D'après ce graphe, nous obtenons $E_a = 12$ kcal/mol, cette valeur est très proche de celle obtenue avec le glycérol qui est de 11 kcal/mol.

Les rotors fluorescents dérivés de coumarine ayant montré des propriétés d'émission de fluorescence, dépendantes de leur environnement en terme de polarité et de viscosité, nous avons souhaité mettre à profit ces propriétés pour l'étude de polysaccharides d'intérêt en biologie.

III.3.3 Etude des biopolymères fluorescents

III.3.3.1 Etude en solution diluée

Les études photophysiques des polysaccharides fluorescents ont été réalisées dans de l'eau bidistillée. Les spectres d'absorption/émission observés sont similaires à ceux obtenus à partir des sondes libres (Figures A-46 et A-47).

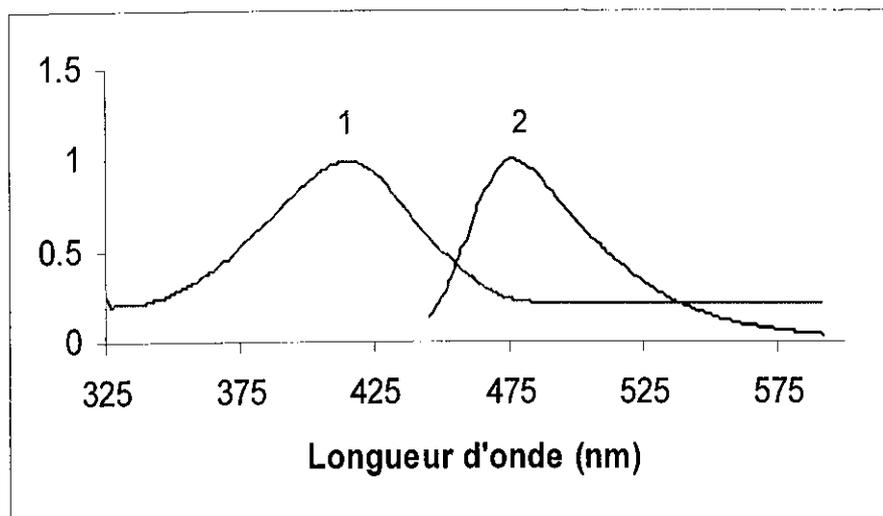


Figure A-46 : Spectres d'absorption (1) et d'émission (2) normalisés du CMDDB marqué avec le rotor COOH dans l'eau ($\lambda_{exc} = 420$ nm)

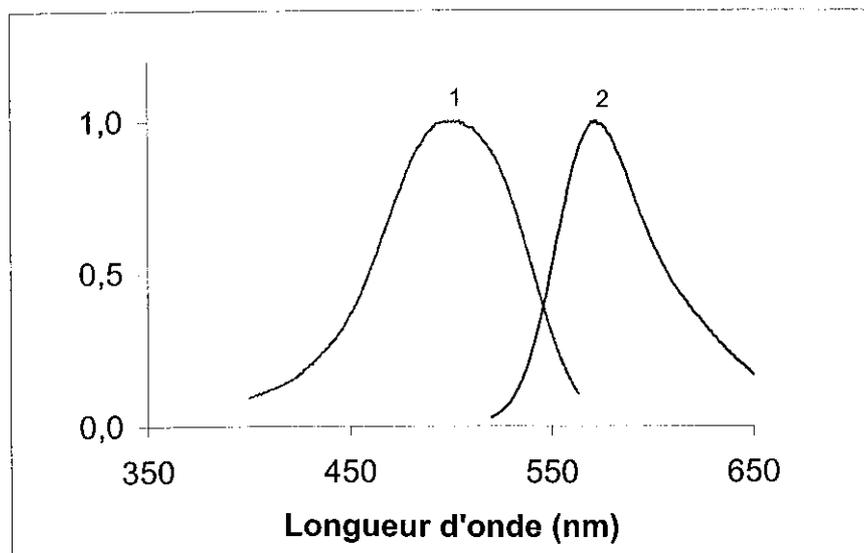


Figure A-47 : Spectres d'absorption (1) et d'émission (2) normalisés du CMDDB marqué avec le rotor CNCOOH dans l'eau ($\lambda_{exc} = 470$ nm)

Quel que soit le polymère étudié en milieu aqueux, nous retrouvons les spectres d'absorption et d'émission présentant les mêmes longueurs d'onde que les rotors COOEt et CNCOOEt.

Nous avons regroupé les résultats dans le Tableau récapitulatif A-9.

Polysaccharide	λ_a max	λ_f max
COOEt	428	477
CMDNCou	420	484
CMDBNCou	424	485
HepNCou	425	480
CNCOOEt	510	563
CMDNCouCN	490	574
CMDBNCouCN	495	575
HepNCouCN	492	575

Tableau A-9 : Caractéristiques spectroscopiques des rotors COOEt et CNCOOEt et des différents polysaccharides fluorescents

III.3.3.2 Etude des polysaccharides fluorescents en milieu visqueux

Les polysaccharides, n'étant solubles que dans les milieux aqueux, nous n'avons pas pu étudier l'influence de la polarité des différents solvants sur le polysaccharide fluorescent. Cependant, nous avons cherché à savoir comment la sonde répondait en terme de cohésion. Pour réaliser cette étude, nous avons pris comme exemple le CMDB marqué avec la sonde CNCOOH.

Deux tests ont été effectués. Dans un premier temps, le rotor libre CNCOOH a été ajouté à la même concentration (10^{-6} M) dans des solutions de CMDB à différentes concentrations et dans le glycérol qui est très visqueux. L'ajout de polysaccharide rend le milieu plus visqueux et nous pouvons donc constater que le rotor répond bien en terme de cohésion puisque nous observons une augmentation de l'intensité de fluorescence (Figure A-48).

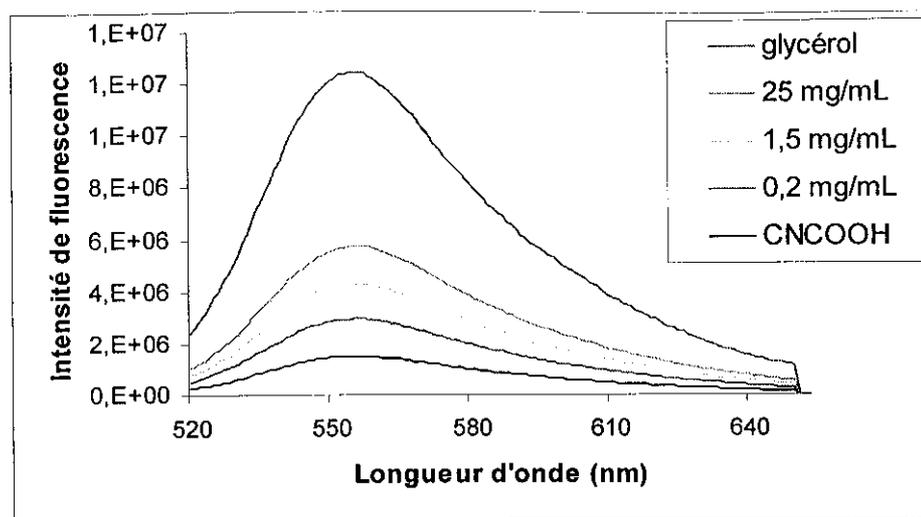


Figure A-48 : Spectres d'émission de fluorescence de la coumarine libre dans des solutions de CMDB, à différentes concentrations, et de glycérol

Pour affirmer ce résultat, nous avons étudié le comportement du CMDB fluorescent lors de l'ajout de polysaccharide non marqué à différentes concentrations, à volume constant (Figure A-49).

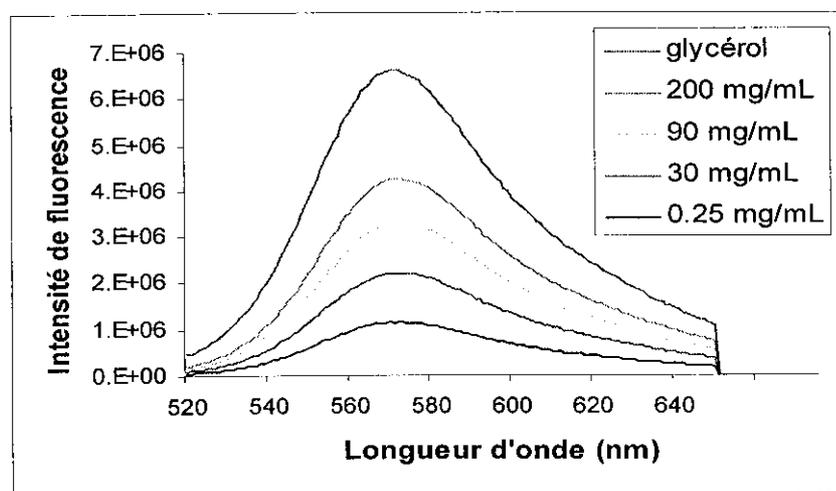


Figure A-49 : Spectres d'émission de fluorescence d'un CMDB marqué à 0,25 mg/mL dans des solutions de CMDB non marqué à différentes concentrations et dans le glycérol

Nous pouvons remarquer également une augmentation de l'intensité de fluorescence corrélée à l'ajout à la solution de CMDB fluorescente, de polysaccharide non marqué (conduisant à une viscosité augmentée).

III.3.4 Bilan de l'étude photophysique

L'étude photophysique réalisée avait pour but de déterminer les principales caractéristiques photophysiques des traceurs fluorescents synthétisés et vérifier si le marquage, effectué sur les polysaccharides, ne perturbait pas ces propriétés.

Nous avons déterminé les principales caractéristiques des rotors fluorescents synthétisés. Le simple ajout d'une double liaison à partir de la structure de base de la coumarine, permet de déplacer l'émission de fluorescence vers le rouge (passage du rotor COOH au rotor CNCOOH).

En ce qui concerne les effets de solvant, la variation de la longueur d'onde au maximum d'émission de fluorescence permet de mettre en évidence une modification de l'environnement en terme de polarité. Pour l'aspect cohésion, une augmentation de l'efficacité de fluorescence rend compte de l'accroissement de la rigidité du milieu.

Les grands déplacements de Stokes et les faibles rendements quantiques de fluorescence dans les solvants de forte polarité sont des éléments caractérisant l'existence d'un déclin de fluorescence non radiatif à partir d'un état "twisté" à transfert de charge intramoléculaire (TICT).

Par ailleurs, nous avons montré que les propriétés d'absorption et d'émission restent inchangées lorsque les rotors moléculaires sont greffés aux différents polymères. De plus, nous avons constaté que les rotors greffés restaient sensibles aux variations de viscosité du milieu environnant.

Dans le travail suivant, nous allons décrire, dans l'étude de milieux biologiques, l'utilisation des rotors moléculaires fluorescents, associés par un greffage covalent à des polysaccharides,.

IV ETUDES EN MILIEU
BIOLOGIQUE ET
VISUALISATION PAR
MICROSCOPIE DE
FLUORESCENCE 3D

IV.1 INTRODUCTION

Une part importante du travail a concerné la synthèse et l'étude photophysique de polysaccharides, de type dextrane ou héparine, associés à des rotors moléculaires fluorescents. Ces polysaccharides mis en contact avec les cellules telles que les cellules endothéliales ou les cellules musculaires lisses, peuvent affecter à la fois la prolifération cellulaire ou le métabolisme.

La suite de ce travail va consister à suivre la localisation des polymères dans des systèmes biologiques complexes, que ce soit les cellules endothéliales pour les dérivés du dextrane ou que ce soit les cellules musculaires lisses pour l'héparine.

Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses étudiées ont comme point commun le fait qu'elles constituent majoritairement la paroi des vaisseaux sanguins.

Au préalable nous montrerons que la modification chimique des polymères n'altère pas leurs propriétés biologiques en réalisant soit des tests de culture de cellules endothéliales *in vitro* en présence ou non de CMDB, soit des tests de coagulation avec l'héparine.

Dans le cadre des recherches se situant à l'interface Chimie-Physique-Biologie, nous étudierons les milieux biologiques par microscopie de fluorescence, en utilisant notamment une technique de microscopie 3D*, avec l'objectif de mieux cerner les propriétés biologiques.

* Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, LEMTA, UMR 7563 CNRS-INPL-UHP, Faculté de Médecine, Pr J.F. Stoltz

IV.2 DESCRIPTION DES CELLULES EUCARYOTES

Les cellules endothéliales (CE) et les cellules musculaires lisses (CML) entrent dans la classe des cellules eucaryotes. Elles sont caractérisées par des membranes internes qui entourent le noyau et les mitochondries (dans la cellule végétale, il s'agit des membranes des chloroplastes) (Figure A-50).

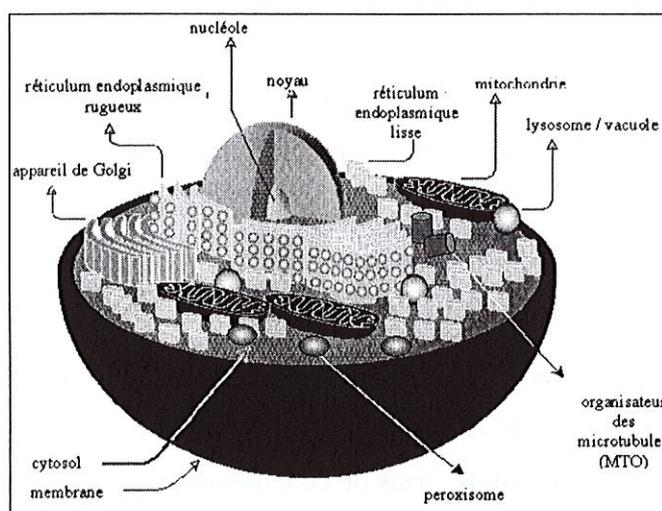


Figure A-50 : Schéma d'une cellule eucaryote

Elles forment un compartiment assez complexe appelé réticulum endoplasmique, où sont synthétisés aussi bien les lipides et les protéines des membranes cellulaires que le matériel destiné à être exporté hors de la cellule. Elles forment aussi des empilements de sacs aplatis constituant l'appareil de Golgi, qui est aussi impliqué dans le transport de diverses molécules organiques. Des membranes entourent les lysosomes qui contiennent des réserves d'enzymes destinées à la digestion intracellulaire (pH acide) et les empêchent ainsi d'attaquer les protéines et les acides nucléiques de la cellule elle-même. Toutes ces structures entourées d'une membrane correspondent à des compartiments internes distincts à l'intérieur du cytoplasme. Dans une cellule animale type, ces compartiments occupent près de la moitié du volume cellulaire total. Le compartiment restant du cytoplasme, qui inclut tout ce qui n'est pas organites entourés d'une membrane, constitue ce qui est habituellement appelé cytosol.

IV.2.1 Les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses dans la paroi artérielle

La paroi artérielle est constituée de trois couches bien distinctes généralement séparées par deux limitantes élastiques. De la lumière du vaisseau à sa périphérie, on y distingue l'intima, la média et l'adventice (Figure A-51 et Figure A-52) dont la taille et la composition varient selon le type d'artère.

- L'intima, la couche la plus interne, est formée d'une monocouche de cellules endothéliales directement en contact avec le flux sanguin (nommée endothélium), d'une lame basale et de sous-endothélium.
- La média, constituant la couche centrale de la paroi artérielle, est constituée de CML fusiformes disposées en hélices et arrangées en couches autour de la circonférence du vaisseau. Les CML sont associées à une matrice fibreuse extracellulaire de glycosaminoglycanes (GAG), de collagène et d'élastine.
- L'adventice, quant à elle, est constituée de tissu conjonctif lâche contenant des fibroblastes et des adipocytes.

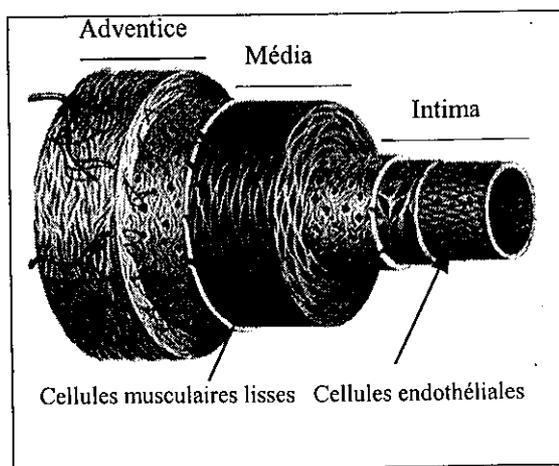


Figure A-51 : Structure d'un vaisseau sanguin

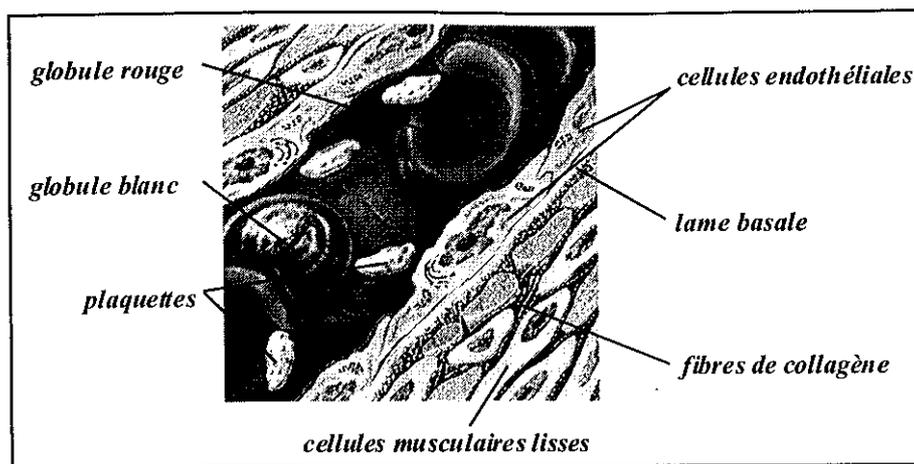


Figure A-52 : Représentation schématique d'un vaisseau sanguin

IV.2.2 Les cellules endothéliales (CE)

Les cellules endothéliales, qui tapissent les vaisseaux sanguins, ont une capacité remarquable à ajuster leur nombre et leur distribution aux exigences locales. Tous les tissus nécessitent un apport sanguin (pour la diffusion de l'oxygénation) lui-même dépendant des cellules endothéliales. Elles forment un système de support naturel et adaptable qui se ramifie dans toutes les régions de l'organisme. S'il n'y avait pas les cellules endothéliales pour développer et remodeler le réseau vasculaire, la réparation du tissu serait impossible. Les cellules endothéliales tapissent donc entièrement le système vasculaire, du cœur jusqu'au plus petit des capillaires, et elles contrôlent les échanges entre le sang et les tissus.

D'un bout à l'autre du système vasculaire adulte, les cellules endothéliales gardent la capacité de se diviser et de se déplacer. Si par exemple, une partie de la paroi de l'aorte est endommagée et dénudée de ses cellules endothéliales, de nouvelles cellules se forment dans l'endothélium qui entoure la zone mise à nu, et migrent pour couvrir la surface exposée. Dans les vaisseaux normaux, la proportion de cellules endothéliales est particulièrement élevée aux points de branchement des artères où la turbulence et l'usure des cellules endothéliales qui en résulte semblent stimuler le renouvellement cellulaire.

Les cellules endothéliales n'ont pas seulement un rôle de réparation de la paroi des vaisseaux sanguins existants, elles contribuent aussi à en créer de nouveaux. Elles doivent faire cela chez l'embryon pour aller de pair avec la croissance de l'organisme, dans des tissus adultes

normaux tels que l'os ou la paroi de l'utérus qui sont soumis à des cycles répétés de remodelage et de reconstruction ou dans la réparation de tissu endommagé.

Elles ont également un rôle déterminant dans le contrôle de l'hémodynamique à travers leurs activités métaboliques (contrôle de l'homéostasie, tonus vasculaire, fluidité et coagulabilité du sang, adhésion cellulaire...), et leurs propriétés peuvent être altérées ou modifiées dans de nombreuses pathologies (athérosclérose, hypertension, inflammation, maladies métaboliques...).

IV.2.3 Les cellules musculaires lisses (CML)

Les cellules musculaires lisses sont les éléments responsables, dans la paroi vasculaire, de la relaxation et de la contraction des artères. Ces cellules contractiles sont caractérisées par la présence de nombreux myofilaments, d'un cytoplasme pauvre en réticulum endoplasmique rugueux et en appareil de Golgi. Le cytoplasme des CML, pauvre en organites cellulaires, est occupé par des filaments épais de myosine et fins d'actine qui sont alignés le long du grand axe de la cellule. Ces cellules forment, grâce à ces filaments, un tissu multifonctionnel contractile (collagène, actine) qui assure les propriétés mécaniques de la paroi artérielle.

L'athérosclérose, cause majeure des infarctus du myocarde et des attaques cérébrales, est responsable d'un nombre considérable de décès ou d'invalidités. Les lésions résultent, dans un premier temps, d'interactions multiples entre deux leucocytes (monocytes et polynucléaires) et l'endothélium. Ces leucocytes traversent le mur artériel et relarguent de nombreuses molécules bioactives. Ces divers événements entraînent la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses qui élaborent un tissu conjonctif et provoquent un rétrécissement de la lumière du vaisseau sanguin, voire une occlusion.

Plusieurs stratégies ont été élaborées pour répondre à ce problème de santé publique, notamment l'élaboration d'agents thérapeutiques (dont l'héparine) inhibant la migration et la prolifération des CML.

IV.3 INFLUENCE DU MARQUAGE FLUORESCENT SUR L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DES POLYSACCHARIDES (DEXTRANE ET HEPARINE)

IV.3.1 Les dextrans fluorescents modifiés

Les CMDB possédant un degré de substitution (ds_B) en B d'environ 0,4, ont la particularité, entre autres, de stimuler la croissance des cellules endothéliales de l'ordre de 20% à la concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$. Nous avons vérifié, par des tests de prolifération cellulaire, si le polysaccharide conservait cette propriété après marquage fluorescent. Trois concentrations différentes ont été testées 0,1 ; 1 et 10 $\mu\text{g/mL}$ (Figure A-53). Les produits ont été incubés pendant trois jours dans du sérum de veau fœtal (SVF) à 2%.

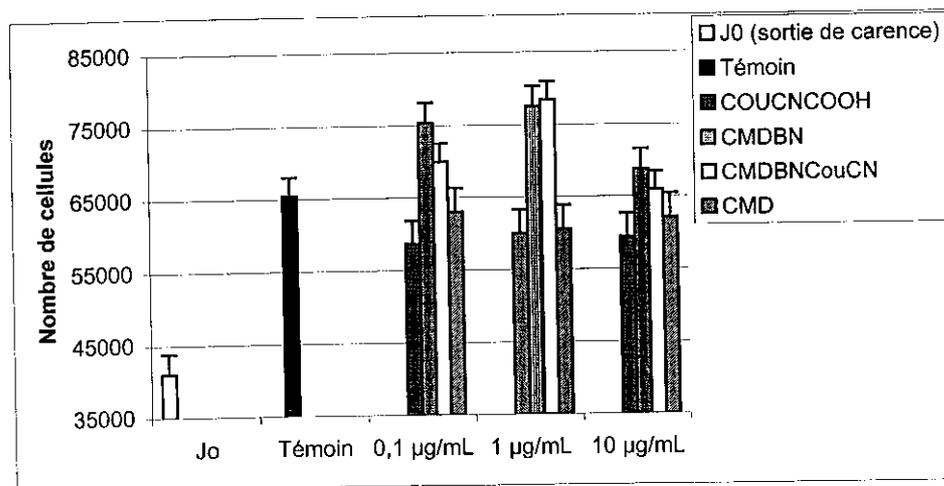


Figure A-53 : Etude de la prolifération des cellules endothéliales

Seul le CMDB avec un $ds_B = 0,4$ et le CMD précurseur marqués avec la sonde CNCOOH ont été testés. D'après les tests de prolifération cellulaire, les CMDB (CMDB aminé sans traceur et CMDB fluorescent) augmentent la prolifération cellulaire de 20%, ce qui correspond au taux précédemment obtenu avec le CMDB natif. Le CMD, marqué ou non, ne présente aucune activité proliférative. La coumarine CNCOOH seule ne présente aucune toxicité et n'interfère pas sur la prolifération cellulaire.

IV.3.2 L'héparine fluorescente

L'héparine possède une activité anticoagulante, quatre tests permettent de mesurer le temps de formation du caillot : temps de céphaline activée (TCA), temps de thrombine (TT), temps de Quick (TQ), temps de reptilase (TR).

Nous avons choisi le TCA qui est un test d'évaluation de l'activité anticoagulante sensible à tous les facteurs de la voie endogène (II, V, VII, IX, XI et XII). Le test consiste à mesurer le temps de céphaline activée [Maïga-Revel et al., 1997]. Ce test d'exploration mesure le temps de formation du caillot et explore tous les facteurs de la voie endogène de la coagulation.

L'activité anticoagulante des produits testés est déterminée par rapport à celle de l'héparine H108. Son activité anticoagulante, exprimée en unités internationales, est de 170 UI/mg. Une droite est tracée en portant le logarithme du temps de coagulation (en secondes) en fonction de la concentration de l'héparine étudiée. La pente de la droite permet de calculer l'activité anticoagulante spécifique du polysaccharide exprimée en UI/mg d'après l'équation :

$$A(\text{UI/mg}) = ([\text{pente de la droite héparine fluorescente}]/[\text{pente de la droite héparine}]) * 170$$

Les valeurs trouvées pour l'activité anticoagulante avec les 2 polysaccharides héparine marquée sont très proches de l'héparine non marquée : respectivement 168 et 169 pour hepNCou et hepNCouCN.

IV.3.3 Bilan des tests biologiques

Les différents tests biologiques effectués ont permis de mettre en évidence que le greffage de coumarine ne perturbait pas l'activité biologique, que ce soit l'action proliférative du CMDDB ou l'activité anticoagulante de l'héparine.

Par la suite, l'internalisation des différents polysaccharides dans les milieux biologiques a été étudiée par microscopie de fluorescence 3D en utilisant le système CELLscan™ [Dumas et al., 1999].

IV.4 VISUALISATIONS PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

IV.4.1 Visualisation des dérivés dextrane dans les cellules endothéliales

Des études antérieures, réalisées au LRM, ont montré que les CMDB possédaient une activité antiproliférative sur des lignées de cellules tumorales [Bittoun et al., 1999]. Des visualisations par microscopie confocale ont montré que seuls des fragments de bas poids moléculaire (marqués au DTAF), obtenus par dégradation du polymère natif se retrouvaient dans le noyau. Notre étude s'est portée sur l'étude de la prolifération des cellules endothéliales, *via* le CMDB $ds_B = 0,4$. Nous avons incubé le CMDB marqué avec le rotor CNCOOH pendant 3 h. La Figure A-54 montre une fluorescence répartie sur toute la cellule. Aucun site spécifique ne peut être localisé même après plusieurs heures d'incubation.

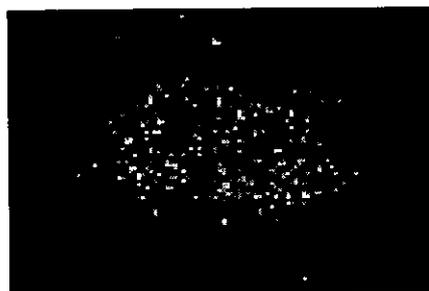


Figure A-54 : Image déflouée de cellule endothéliale incubée pendant 3 h à 37°C avec le CMDB marqué avec le rotor coumarine CNCOOH (10 µg/mL) (microscope à fluorescence x100, NA 1,25, exposition 0,5 s)

L'image obtenue avec la coumarine CNCOOH est différente (Figure A-55). Nous pouvons remarquer que le rotor CNCOOH semble être internalisé dans le noyau.

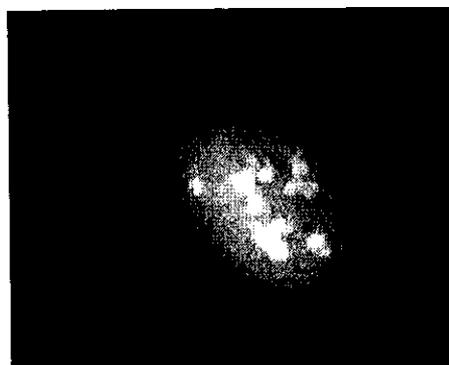


Figure A-55 : Image déflouée d'une cellule endothéliale incubée pendant 3 h à 37°C avec le rotor CNCOOH (10⁻⁶ M) (microscope à fluorescence x100, NA 1,25, exposition 0,5 s)

IV.4.2 Visualisation de l'héparine dans les CML

Outre sa capacité anticoagulante, l'héparine possède un effet antiprolifératif sur les cellules musculaires lisses. La prolifération des CML est un élément clé dans le développement de l'athérosclérose et de la resténose après intervention chirurgicale. Une hypothèse consiste à supposer que l'effet antiprolifératif de l'héparine sur les CML s'effectuerait grâce à la présence de sites cellulaires spécifiques. Des sites de haute affinité pour l'héparine (environ 100 000) ont été décrits sur les CML. La présence de sites de liaison de haute affinité et une internalisation rapide semblent caractériser une endocytose médiée par voie de récepteur [Castellot et al., 1985].

Grâce à la microscopie de fluorescence 3D et par notre marquage à l'aide de rotors moléculaires, nous avons visualisé sur les CML les sites d'affinité pour l'héparine après un temps d'incubation court de 15 min (Figure A-56).

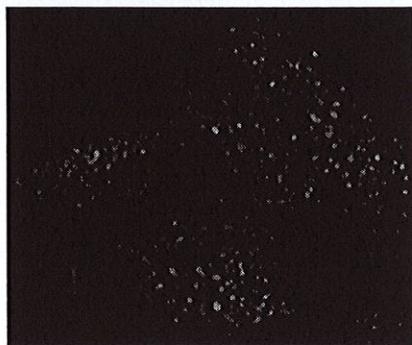


Figure A-56 : Image déflouée de cellules musculaires lisses incubées pendant 15 min à 37°C avec l'héparine marquée avec le rotor coumarine CNCOOH (1 µg/mL) (microscope à fluorescence x100, NA 1,25, exposition 0,5 s)

Après 3 h d'incubation nous pouvons constater sur la Figure A-57 que l'héparine a été internalisée et semble être localisée au niveau de la membrane nucléaire.



Figure A-57 : Image déflouée d'une cellule musculaire lisse incubée pendant 3 h à 37°C avec l'héparine marquée avec le rotor coumarine CNCOOH (1 µg/mL) (microscope à fluorescence x100, NA 1,25, exposition 0,5 s)

Pour témoin, nous avons également incubé la coumarine CNCOOH dans le milieu de culture de CML (Figure A-58). Nous obtenons une image complètement différente des précédentes. Ceci montre bien que la fluorescence, observée dans les images précédentes, provient de l'héparine fluorescente. Par ailleurs, des CML incubées par des CMDB fluorescents ne présentent pas de fluorescence (à part l'autofluorescence).

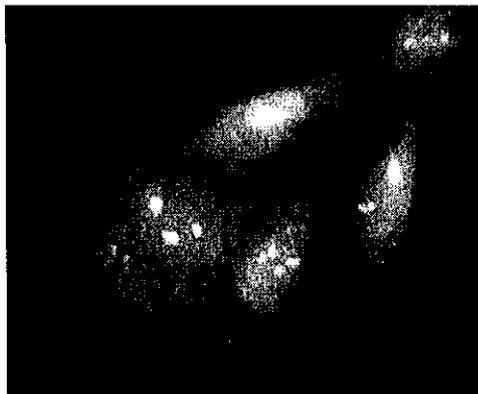


Figure A-58 : Image déflouée de cellules musculaires lisses incubées pendant 3 h à 37°C avec le rotor coumarine CNCOOH (10^{-6} M) (microscope à fluorescence x100, NA 1,25, exposition 0,5 s)

A ce jour, aucune méthode n'a pu isoler un récepteur à l'héparine sur les CML. Il serait intéressant, de pouvoir les visualiser notamment par microscopie en champ proche.

IV.5 MATERIEL ET METHODES

Les études des milieux biologiques ont été effectuées dans l'équipe de Monsieur Didier Letourneur, Villetaneuse.

Les études par microscopie de fluorescence 3D ont été effectuées dans l'équipe de Monsieur Jean-François Stoltz, Vandœuvre, en collaboration avec Monsieur Dominique Dumas.

IV.5.1 Cellules biologiques

Les cellules, pour leur mise en culture, sont manipulées dans une hotte à flux laminaire vertical Biocyt 120, classe 100 (ESI-Flufrance, Massy).

Les cellules prolifèrent soit dans des flacons de 25 ou 75 cm² (T25 ou T75 – Costar et Falcon Primaria) ou des puits (plaques de 6 ou 24 puits - Costar ou Falcon Primaria) contenant du

milieu de culture. Les cellules sont ensuite conservées dans un incubateur (Heraeus, Les Ulis), à 37°C, en atmosphère humide, dans un mélange d'air contenant 5% de gaz carbonique CO₂ (qualité Carbopharm, Carboxyque).

Dans le cadre de notre étude, nous avons utilisé deux types de cellules : des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales.

Des lignées de cellules musculaires lisses (BLC #5), sensibles à l'action de l'héparine, ont été fournies par le Pr J. Castellot (Boston, USA).

Les cellules endothéliales sont des cellules hybrides EA.hy 926 qui ont été fournies par le Dr C.-J. S. Edgell (Université de Caroline du Nord, Pathology Department 7525, Chapel Hill, USA).

Les milieux de culture sont respectivement du DMEM (Dubelcco's Modified Eagle Medium, Gibco-BRL) et du MEM (Minimum Eagle Medium, GibcoBRL) pour les CE et les CML. Les milieux sont enrichis en glucose à 4 500 mg/L (Gibco) et supplémentés en L-glutamine à 2 mM (Gibco) et en HAT (hypoxanthine, aminospéritine, thymidine) à 2% (Gibco).

En routine, les cellules sont observées grâce à un microscope inversé (Olympus, modèle CK). Le simple aspect morphologique permet de distinguer les CML des autres types cellulaires. A faible densité, les CML sont plus étalées que les cellules endothéliales. A confluence, les cellules endothéliales s'arrangent en une monocouche de cellules polyhédriques, prenant l'aspect d'un pavage régulier. Les CML ont la particularité de pouvoir pousser en multicouches.

IV.5.1.1 Décongélation des cellules

Les cellules conservées à -80°C doivent être décongelées de façon rapide (ce qui augmente la viabilité des cellules). Le cryotube contenant les cellules est réchauffé dans un bain-marie à 37°C (2 min maximum). Les cellules sont transférées dans un tube à centrifuger stérile, contenant 6 mL de milieu de culture à 10% de SVF (Sérum de Veau Fœtal, Eurobio). Les cellules sont centrifugées à 1 000 tours/min pendant 5 min afin d'éliminer l'agent cryoprotecteur (DMSO), puis suspendues dans 2 mL de milieu de culture à 10% de SVF. Les cellules sont ensuiteensemencées dans une boîte de 25 cm² contenant 5 mL de MEM à 10% de SVF. Le milieu est ensuite changé tous les 2 ou 3 jours.

IV.5.1.2 "Passage" des cellules

La confluence des cellules est atteinte en 4 ou 5 jours. Il est alors nécessaire, pour entretenir les cellules, de les trypsiner et de réensemencer les cellules dans d'autres boîtes de culture. Cette étape de trypsination est aussi appelée "passage".

Pour effectuer un passage il convient d'aspirer le milieu, rincer avec du PBS, puis ajouter la trypsine (environ 2 mL pour une boîte de 75 cm²). La boîte est ensuite placée 3 min dans l'incubateur à 37°C. On peut taper sur la boîte pour décoller toutes les cellules et pipeter avec précaution pour désolidariser les cellules. L'activité de la trypsine est ensuite inhibée en ajoutant du milieu contenant du sérum et on prélève une fraction de cette nouvelle suspension cellulaire (généralement 1/10) dans une nouvelle boîte de culture contenant déjà du milieu de culture à 10% de SVF.

IV.5.1.3 Congélation des cellules

Il est recommandé de congeler les cellules lorsqu'elles sont en phase exponentielle de croissance, afin qu'elles puissent proliférer correctement après la phase de décongélation. Lorsque les cellules sont en nombre suffisant, elles sont rincées avec du milieu de culture sans sérum ou du PBS, puis décollées par action de la trypsine (2 mL de trypsine pour une boîte de 25 cm²) pendant 3 min à 37°C. L'action de la trypsine est arrêtée par addition de milieu de culture contenant 10% SVF (environ 3 volumes de milieu à 10% de SVF pour un volume de trypsine). Les suspensions cellulaires obtenues à partir de différentes boîtes sont rassemblées puis comptées et centrifugées à 1 000 tours/min pendant 5 min. Le surnageant est éliminé et le culot est mis en suspension dans du SVF contenant 10% de DMSO (agent cryoprotecteur) à raison d'environ 4.10⁶ cellules/mL. Cette suspension cellulaire est aliquotée par 0,5 mL dans les cryotubes (2.10⁶ cellules/mL par cryotube) et ensuite congelée à -80°C.

IV.5.2 Tests de prolifération des cellules endothéliales EA.hy 926

Les tests de modulation de croissance sont toujours réalisés dans des plaques de 24 puits. Les cellules sont utilisées pour les tests de prolifération cellulaire au troisième passage. Les cellules en suspension dans le DMEM à 10% de SVF sont ensemencées à raison de 1 mL par puits dans des plaques de 24 puits à une densité de 20 000 cellules par puits. Elles sont laissées pendant 24 h à 37°C afin qu'elles puissent adhérer en fond de puits. Les cellules non adhérentes sont éliminées par rinçage avec du milieu de culture à 10% de SVF.

Les cellules sont ensuite mises en carence dans du DMEM à 0,4% de SVF pendant 3 jours. Au terme de cette carence, les cellules sont incubées dans un milieu à 2% de SVF avec les dextrans fluorescents à tester à des concentrations de 0,1 ; 1 et 10 µg/mL. Ces produits sont préalablement mis en solution dans du DMEM à 2% de SVF, puis les solutions sont filtrées sur filtre stérile 0,2 µm. Un témoin ne contenant aucun produit est réalisé pour permettre la comparaison de la croissance dans les mêmes conditions expérimentales. Après 3 jours de croissance, sans changement de milieu, les cellules de chaque puits sont rincées avec du milieu de culture sans SVF, détachées par trypsination puits par puits, transférées dans des cuvettes contenant de l'isoton puis comptées au Coulter-Counter. Chaque concentration de produit est testée en quadruplicate. Le pourcentage de prolifération (P%) pour chacune des concentrations du produit examiné est calculé selon la formule suivante :

$$P\% = \frac{\text{croissance nette avec polysaccharide}}{\text{croissance nette témoin}} - 1 \times 100$$

où la croissance nette représente la différence entre le nombre de cellules en fin de test et le nombre de cellules en sortie de carence.

IV.5.3 Activité anticoagulante de l'héparine

L'héparine utilisée pour les tests biologiques est l'héparine H108. Son activité anticoagulante, exprimée en unités internationales est de 170 UI/mg.

L'activité anticoagulante des produits finaux est évaluée par la mesure du temps de céphaline activée d'un plasma humain en prenant comme référence l'action de l'héparine H108. Ce test permet de déterminer l'activité anticoagulante globale en déclenchant l'activation de la coagulation par la voie intrinsèque.

Le test est réalisé selon le protocole suivant : on mélange dans un tube à hémolyse 0,1 mL de réactif APTT (Kit Organon Teknika Corporation), 0,1 mL d'héparine modifiée chimiquement diluée dans un tampon Owren Koller (TOK) aux différentes concentrations et 0,1 mL de plasma pauvre en plaquettes (PPP). La solution obtenue est laissée à incuber 3 min à 37°C, puis 0,1 mL d'une solution de chlorure de calcium (CaCl₂ à 25 mM) est ajouté et le temps de formation du caillot est mesuré. La pente de la droite (tracée en portant le logarithme du temps de coagulation (en secondes) en fonction de la concentration de l'héparine étudiée) permet de calculer l'activité anticoagulante spécifique du polysaccharide exprimé en UI/mg.

IV.5.4 Techniques de comptage des cellules

IV.5.4.1 Coulter-Counter

Le Coulter-Counter utilisé est le modèle ZM muni d'un tube à orifice de 100 μm (Coultronics, Margency). L'appareil doit être paramétré pour chaque type de cellules (diamètre, constante de l'appareil, seuil bas à partir duquel les particules sont comptées).

Pour effectuer les comptages, en général trois par échantillon, une suspension cellulaire est réalisée dans 10 mL de solution électrolyte appelée isoton (Coultronics, Margency) à une dilution connue. Le Coulter-Counter prélève automatiquement 500 μL de cette suspension et affiche le nombre de cellules contenues dans ces 500 μL . La suspension est agitée mécaniquement à l'aide d'une palette de verre pendant toute la durée des comptages pour éviter la sédimentation des cellules. Il est ainsi facile d'obtenir le nombre de cellules contenues dans 1 mL de suspension initiale ainsi que le nombre total contenu dans l'échantillon. L'utilisation du Coulter permet de compter les cellules de façon semi-automatique et, de ce fait, la technique est utilisée en routine au laboratoire.

IV.5.4.2 Cellule de Malassez

En ce qui concerne le comptage en utilisant la cellule de Malassez, il est nécessaire de trypsiner les cellules et d'homogénéiser la suspension cellulaire par plusieurs pipetages. Une goutte de la suspension est alors introduite dans chaque compartiment de la cellule de Malassez et les cellules sont comptées au microscope dans un nombre de carreaux suffisant pour dénombrer environ 100 cellules. Pour obtenir le titre de la suspension cellulaire (cellules/mL) il faut multiplier par 100 000 le nombre de cellules trouvées par carreau de la cellule de Malassez.

IV.5.5 Internalisation des polysaccharides fluorescents

Des lamelles de microscope en verre d'épaisseur 0,12 mm sont nettoyées à l'éthanol et stérilisées pendant 45 min à l'autoclave. Les cellules sontensemencées sur ces lamelles de microscope dans des plaques de 6 puits à une concentration de 15 000 cellules/mL, chaque puits contenant 3 mL de milieu. Les cellules sont laissées dans du milieu à 10% SVF pendant 24 h, ce qui favorise leur adhésion sur le verre. Elles sont ensuite mises en carence pendant 3 jours avec du milieu de culture à 0,4% de SVF. Après la carence, le polymère fluorescent

est ajouté dans chaque puits à une concentration de 10 µg/mL dans le milieu à 2% de SVF pour différents temps d'incubation.

IV.5.6 Montage des lames de microscope

Une fois les incubations terminées, les lamelles sont lavées 3 fois avec du PBS puis les cellules sont fixées pendant 15 min avec une solution de formaldéhyde à 3,7%. Après fixation les cellules sont lavées 2 fois avec du tampon de lavage, puis elles sont rincées avec de l'eau bidistillée. Les lamelles sont ensuite montées sur lame (Esco, Polylabo) avec du tampon de montage (80% Glycérol ; 20% PBS ; 0,1 M N-propylgalate). Les lamelles sont soit observées au microscope à fluorescence classique Olympus BH₂, soit avec un microscope de fluorescence 3D CELLscan permettant une visualisation en 3 dimensions des cellules.

IV.5.7 Imagerie par microscopie de fluorescence 3D

Pour toutes les analyses de microscopie de fluorescence 3D, les cellules sont observées à partir des lamelles préparées comme ci-dessus.

La microscopie optique à trois dimensions a été réalisée à partir d'un microscope photonique inversé à fluorescence IX-70 Olympus, équipé du système CELLscan™ fourni par Scanalytics (Boston, USA). Ce système permet l'acquisition et la restitution d'images numérisées en trois dimensions à partir d'une série de plans x et y, capturés avec une caméra CCD 512 x 512 pixels. Un module piézo-électrique adapté sur l'objectif ou un asservissement de la platine permet un déplacement sur l'axe z. Les coupes horizontales, pouvant être obtenues tous les 0,25 µm, servent à reconstituer une vue tridimensionnelle en réalité virtuelle (Figure A-59).

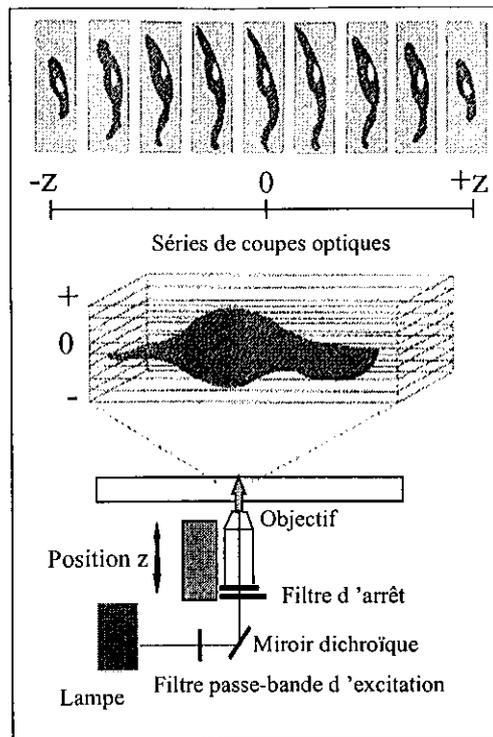


Figure A-59 : Représentation de l'acquisition des images 2D en x et y selon l'axe z (pas minimum de 0,25 μm)

CELLscan™ est un appareillage d'acquisition et de déflouement d'images spécialement développé pour observer des échantillons marqués avec des molécules fluorescentes à partir d'un microscope photonique droit ou inversé. La grande sensibilité des caméras CCD et l'élimination du flou par l'EPR permettent des observations avec des sondes fluorescentes très peu concentrées, pour un vaste éventail de longueurs d'onde ; les longueurs d'onde d'excitation (UV-Visible) et d'émission de fluorescence étant sélectionnées en fonction des sondes spécifiques des éléments cellulaires.

La très grande vitesse de calcul des processeurs d'images vectorielles permet d'utiliser des algorithmes complexes pour éliminer le flou des images créé par la lumière parasite provenant des plans défocalisés. Les images "déflouées" sont plus nettes et mieux contrastées.

Contrairement à la technique confocale qui restitue l'image d'un plan en sélectionnant la lumière émise par les points situés sur le plan focal, la technique de déflouage utilisée sur le CELLscan™ (EPR), permet de prendre en compte la totalité de la lumière provenant de tous les plans, en réassignant chaque photon sur son plan d'origine. L'algorithme de déflouage tient compte des propriétés physiques du microscope pour la modélisation du parcours de la lumière issue du point d'un plan à travers tous les plans. Les étapes nécessaires à l'obtention d'une image 3D déflouée sont décrites en Annexe A-1.

V CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons réalisé le greffage de rotors moléculaires fluorescents sur des macromolécules bioactives de type dextrane ou héparine. Les rotors moléculaires synthétisés et étudiés d'un point de vue photophysique, sont deux dérivés de type coumarine (acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-carboxylique et acide 7-(N,N-diéthylamino)coumarine-3-cyanoacrylique), possédant des caractéristiques spectrales différentes par addition de doubles liaisons. Par ailleurs, ces traceurs fluorescents, greffés ou non sur les polysaccharides, présentent des propriétés d'émission de fluorescence dépendantes de l'environnement moléculaire.

Le mode de greffage est maîtrisé et les polysaccharides fluorescents ont tous été caractérisés tant d'un point de vue physico-chimique que d'un point de vue photophysique. Cette technique de marquage, réalisée avec les rotors moléculaires fluorescents *via* un bras espaceur, présente l'intérêt d'être applicable à d'autres polysaccharides d'intérêt biologique et médical.

Nous avons également montré que la modification chimique des polysaccharides n'influçait pas leurs propriétés biologiques. Enfin, les études en microscopie 3D ont permis de visualiser les polysaccharides dans des cellules endothéliales, dans le cas des dextrans modifiés et dans les cellules musculaires lisses, dans le cas de l'héparine.

En ce qui concerne le CMDDB étudié en biologie, il serait intéressant de fragmenter le polymère et de réaliser, par la suite, une évaluation de l'activité biologique et une internalisation dans des cellules endothéliales pour mieux cerner les mécanismes cellulaires et pour déterminer si des fragments de bas poids moléculaire présentent également une activité biologique.

Quant au marquage fluorescent de l'héparine, il pourrait être mis à profit pour visualiser l'interaction héparine-récepteur cellulaire en utilisant la microscopie en champ proche.

DEUXIEME PARTIE :
PARTIE B
SYNTHESES ET ETUDES
DE NOUVEAUX
PHOTOSENSIBILISANTS
POUR LA THERAPIE
PHOTODYNAMIQUE

I INTRODUCTION

Le cancer (traduction de crabe en latin) est toujours aujourd'hui une maladie redoutable. Même si de nombreux traitements existent déjà, tous les cancers ne peuvent malheureusement pas être guéris. La mortalité dans le monde est, en chiffres ronds, de 50 millions chaque année. Un dixième de ces décès sont rattachés à un cancer. En comparaison, 17,5 millions de morts sont provoquées par des maladies infectieuses ou parasitaires, 12 millions par des maladies cardiovasculaires, 500 000 par des grossesses.

En France, les cancers sont la première cause de décès devant les maladies cardiovasculaires et les accidents. Cela représente près de 150 000 décès annuels par cancer dont 56 000 femmes. Cette maladie compte à elle seule pour 25% de la mortalité générale, toutes causes confondues : 30% chez les hommes, 20% chez les femmes. Si le nombre de cas de cancer progresse chaque année, la mortalité due à cette maladie n'augmente pas. Cela souligne les progrès de la médecine [Science et Vie, 2001].

Il n'existe pas de définition simple du mot cancer. Le cancer est le résultat d'une prolifération cellulaire anarchique. De façon schématique, on peut dire de la cellule cancéreuse qu'elle se divise sans respecter les signaux de contrôle de l'organisme porteur. Elle perd alors ses relations sociales avec les cellules voisines, envahit progressivement les tissus adjacents, provoque une vascularisation nouvelle et la création d'un tissu de soutien indispensables pour la survie de la masse tumorale. Finalement, elle migre à distance pour créer de nouvelles colonies ou métastases. En fait, chaque type de cancer a probablement des facteurs déclenchants, de promotion et de progression différents, qui peuvent être détaillés en étudiant chacun des cas. La Figure B-1 suivante schématise l'histoire naturelle d'un cancer.

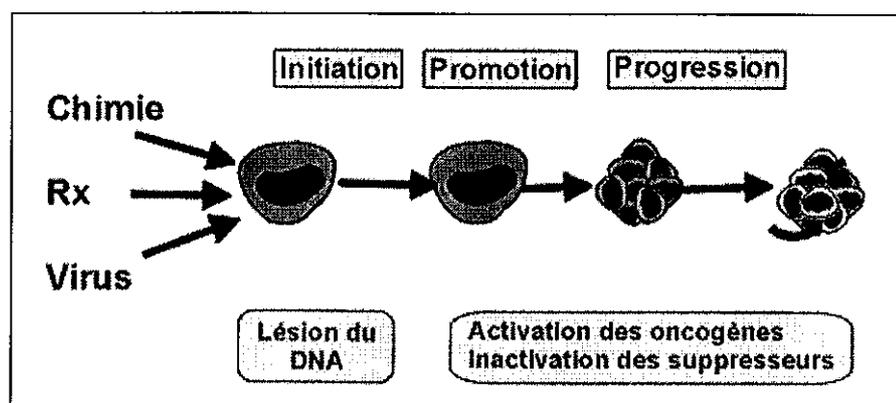


Figure B-1 : Schéma des premières étapes de la cancérisation

L'étude de l'incidence des cancers permet de définir des grandes causes responsables de cette maladie comme par exemple le tabac. A titre indicatif, le tabac est la cause de cancer la plus

importante à l'heure actuelle. Un lien a été établi, de façon indiscutable, avec les cancers suivants : poumons, larynx, cavité buccale, pharynx, œsophage, vessie, pancréas. Un nombre accru des tumeurs suivantes est également observé chez les fumeurs(ses) : rein, col utérin, rhinopharynx, estomac, leucémie. Le tabac, en particulier la cigarette, est responsable d'environ 40% des morts par cancer. C'est pourquoi, les recommandations préventives restent le point d'orgue actuel de la lutte anticancéreuse. L'accent est porté sur les campagnes de prévention des conduites à risque que ce soit le tabagisme, l'alcoolisme, le soleil.

Les traitements sont nombreux et en permanente évolution. Il existe des traitements locaux dont l'objectif est d'éliminer la masse tumorale : la chirurgie, qui consiste à enlever la tumeur, et la radiothérapie. Cette dernière détruit les tissus malades et entraîne une mort des cellules cancéreuses sensibles aux rayons (différentes sources de rayonnement : appareils à rayons X, source de cobalt, accélérateurs à particules, etc.). La toxicité de la radiothérapie résulte de la destruction concomitante des cellules tumorales et des cellules saines incluses dans le champ du rayonnement. La plus classique est une brûlure superficielle. Les autres complications varient en fonction de la dose, du tissu visé et du mode d'administration.

A la différence, la chimiothérapie, utilisée par voie injectable ou parfois orale, diffuse dans tout l'organisme. Son mode d'action se situe au niveau cellulaire au moment de la mitose (division cellulaire) en empêchant la cellule de se multiplier de manière anarchique. On classe les chimiothérapies en fonction de leur mode d'action et de leur cible, que ce soit l'ADN ou d'autres molécules intervenant dans la division cellulaire. Les principaux inconvénients de ces traitements pour le malade sont leur toxicité et leur mauvaise tolérance. En effet, la chimiothérapie agit sur les cellules cancéreuses mais aussi sur les cellules saines en développement rapide comme par exemple les cellules du système capillaire, d'où la perte des cheveux des sujets traités. D'autres traitements sont en cours de recherche, notamment l'immunothérapie, les vaccinations et l'amélioration des techniques connues.

En marge, une autre technique est en train de se développer : c'est la thérapie photodynamique (PDT) qui constitue une approche fondamentale nouvelle en ciblant de façon sélective le tissu tumoral avec des effets secondaires beaucoup moins pénibles, en comparaison avec la radiothérapie et/ou la chimiothérapie très agressives pour le patient. La PDT est basée sur la rétention d'un photosensibilisant par les cellules ou tissus tumoraux. Celui-ci est rendu toxique après absorption lumineuse à une longueur d'onde adaptée. Parallèlement à cette capacité photodestructrice, les photosensibilisants présentent un spectre de fluorescence et par

conséquent leurs propriétés photophysiques permettent leur utilisation comme sondes de localisation des tumeurs. L'avantage de ces molécules est donc double : le photodiagnostic et la phototoxicité.

Bien que jusqu'à ces dernières années, la PDT n'ait été qu'un traitement palliatif, la plupart des tumeurs traitées ont répondu positivement et des résultats incontestables ont été acquis.

A ce jour, très peu de molécules ont été mises sur le marché. Elles sont toutes dérivées des mêmes molécules de base : les porphyrines. En France, le seul réactif qui a reçu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et qui actuellement n'est plus utilisé en oncologie, est le Photofrin[®], un mélange de dérivés de l'hématoporphyrine fabriqué au Canada par la firme QLT. Sa composition, en termes moléculaires, n'est pas complètement définie et des variations d'efficacité surviennent d'un lot à un autre. Ce mélange possède une clairance très lente et les patients traités doivent être maintenus en lumière atténuée pendant plusieurs semaines pour prévenir des accidents de photosensibilisation générale.

Il est donc essentiel aujourd'hui d'avoir à disposition des molécules avec des caractéristiques bien précises. Des efforts considérables dans la recherche de nouveaux sensibilisants possédant une meilleure sélectivité pour les tissus cancéreux et une élimination plus rapide hors de l'organisme ont abouti au développement de nouveaux colorants tétrapyrroliques. Des progrès sont encore attendus par plusieurs voies de recherche, notamment en ce qui concerne les substances photosensibilisantes (vectorisation, purification, rendements, dosimétrie, etc.) mais aussi en ce qui concerne l'utilisation des lasers qui reste coûteuse.

L'objectif de notre travail a été de synthétiser des dérivés de porphyrine possédant des motifs glycosylés. En effet, la recherche bibliographique a démontré que l'introduction de sucres sur des molécules tétrapyrroliques peut conduire à l'obtention de puissants photosensibilisants.

Dans la suite du manuscrit, nous présenterons la thérapie photodynamique, son fonctionnement, les différents photosensibilisants, les différentes voies de synthèse des porphyrines et nous passerons en revue les caractéristiques nécessaires à un photosensibilisateur efficace. Finalement, après avoir explicité notre choix concernant le motif glycosylé, nous décrirons les différentes synthèses réalisées au laboratoire ainsi que les études photophysiques correspondantes.

II ETAT DE L'ART

II.1 DEFINITION DE LA PDT

La thérapie photodynamique ou PDT consiste à marquer un tissu néoplasique à l'aide d'une substance médicamenteuse photosensible exogène et ensuite à l'éclairer grâce à un faisceau laser (dont la longueur d'onde est en général située dans le visible) afin d'induire une réaction phototoxique qui provoquera la destruction du tissu. L'administration du photosensibilisant se fait le plus souvent par injection intraveineuse mais également par application topique ou par voie orale. Ces photosensibilisants ne sont pas toxiques aux doses utilisées. Cette thérapie s'adresse surtout à des tumeurs superficielles ou de petite taille.

II.2 HISTORIQUE DE LA PDT

Même si le terme de PDT est récent, l'utilisation de la double association lumière / photosensibilisant pour traiter certaines maladies remonte quant à elle très loin dans l'histoire de l'humanité : ainsi, il y a 4 000 ans, les populations de l'ancienne Egypte combinaient déjà l'ingestion de plantes (contenant des psoralènes photosensibles) et les rayons du soleil pour soigner le vitiligo [Sternberg et al., 1998]. Pour mémoire, le vitiligo est une maladie auto-immune, multifactorielle, se manifestant par l'apparition de zones de peau dépigmentée plus ou moins importantes, principalement sur le visage, les pieds, les mains, les articulations et les parties génitales.

Le véritable développement de la PDT date de 1900, année où Raab, un étudiant en médecine, réussit à tuer des paramécies en combinant à la fois la lumière et l'acridine [Tappeiner, 1900]. Par la suite, Tappeiner, Meyer, Betz, Policard, Lipson permirent par leurs travaux d'avancer dans la compréhension de la PDT [Sternberg et al., 1998] ; le 16 avril 1993, le bureau de la protection de la santé du Canada approuva la mise sur le marché du Photofrin[®], premier médicament utilisé dans la PDT [Dougherty, 1993]. Depuis, le Photofrin[®] a reçu une AMM aux Etats Unis, au Japon et en Europe. Parallèlement, dans le cadre de la PDT, de nombreuses molécules ont été synthétisées ; parmi celles-ci, certaines sont actuellement en phase d'essais cliniques telles que la MACE (*monoaspartyl chlorin e6*), le BPD-MA (*Benzoporphyrin Derivative Monoacid*), la Sn étiopurpurine, la *m*THPC (*m-Tetrahydroxyphenylchlorin*) [Sternberg et al., 1998]. Un historique détaillé est présenté en Annexe B-1.

II.3 LES PORPHYRINES

II.3.1 Description

Les porphyrines (du grec porphura signifiant pourpre) sont des dérivés de la porphine (Figure B-2) ; celle-ci est un macrocycle formé de quatre noyaux pyrrole liés les uns aux autres par des ponts méthényle (=CH-) établis entre les atomes de carbone α et α' [Stryer, 1997].

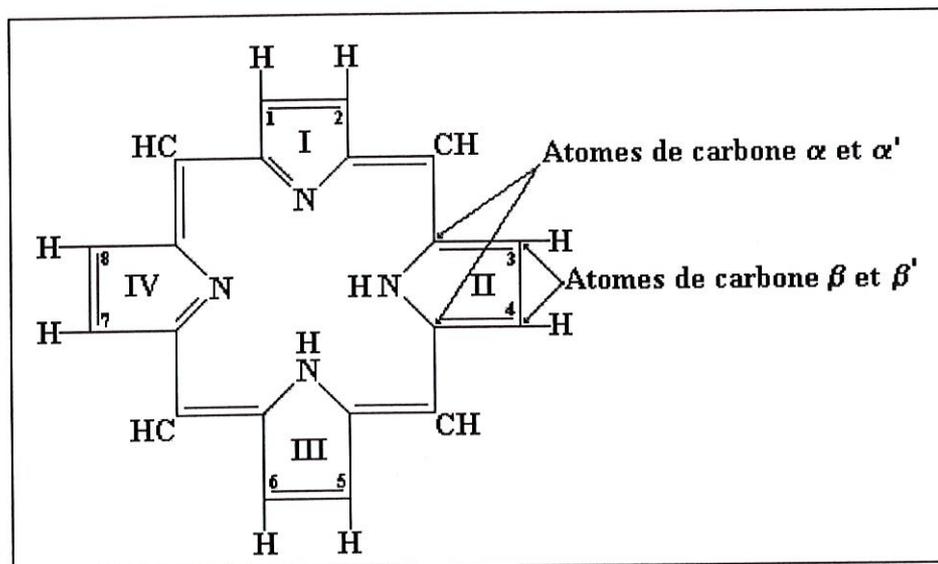


Figure B-2 : Structure de la porphine

Les porphyrines sont des pigments d'un très grand intérêt biologique. En effet, elles sont retrouvées dans tous les organismes vivants, animaux et végétaux. Elles sont localisées principalement dans les cellules et les organes responsables de la production d'énergie, du métabolisme et des transports. Ainsi, l'hème est constitué par une porphyrine conjuguée au fer ; c'est un constituant de base des hémoglobines et des myoglobines, qui sont les transporteurs d'oxygène. Les chlorophylles sont elles aussi des porphyrines naturelles ; le noyau porphyrinique est combiné avec le cation Mg^{2+} (Figure B-3).

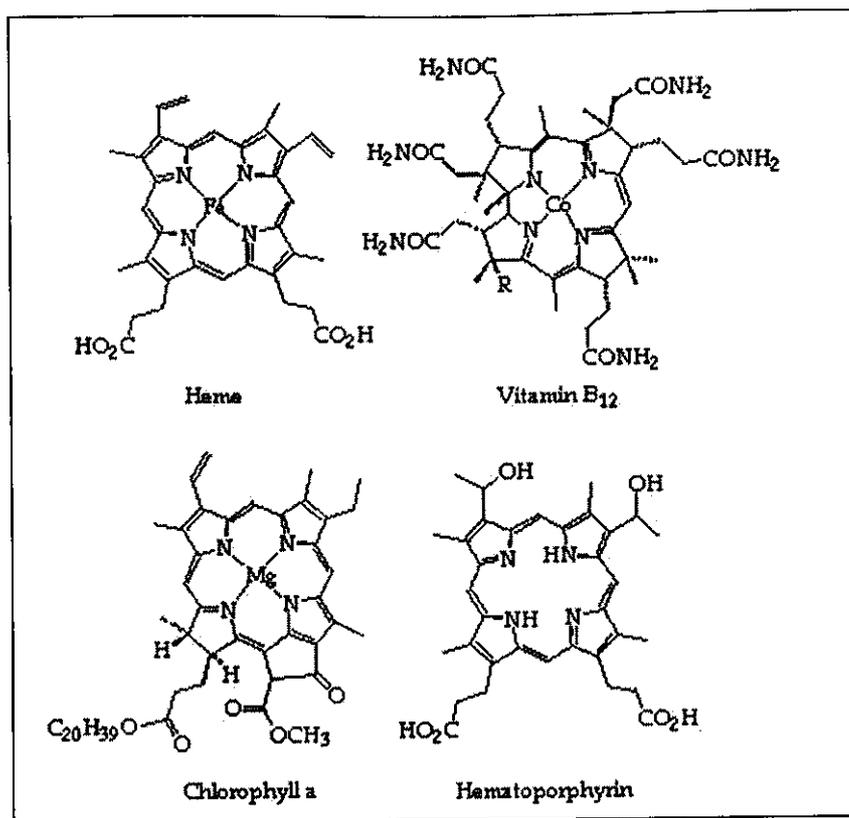


Figure B-3 : Exemples de porphyrines naturelles

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

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

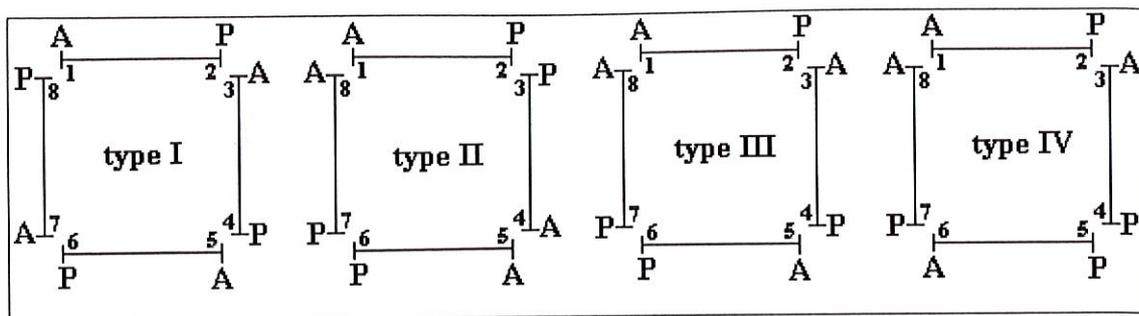


Figure B-4 : Représentation schématique des 4 types d'uroporphyrines

La protoporphyrine des hémoglobines, une des premières molécules utilisées en PDT est du type III et dérive de l'uroporphyrine III par décarboxylation des quatre radicaux acétiques en groupements méthyle et par décarboxylation puis déshydrogénation de deux des quatre radicaux propanoïques transformés en groupements vinyle. La protoporphyrine de type III est communément appelée protoporphyrine IX (Figure B-5) car elle correspond à l'isomère IX des isomères synthétiques ; en effet, les protoporphyrines comptant trois substituants différents, il y a quinze isomères possibles et non plus quatre.

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

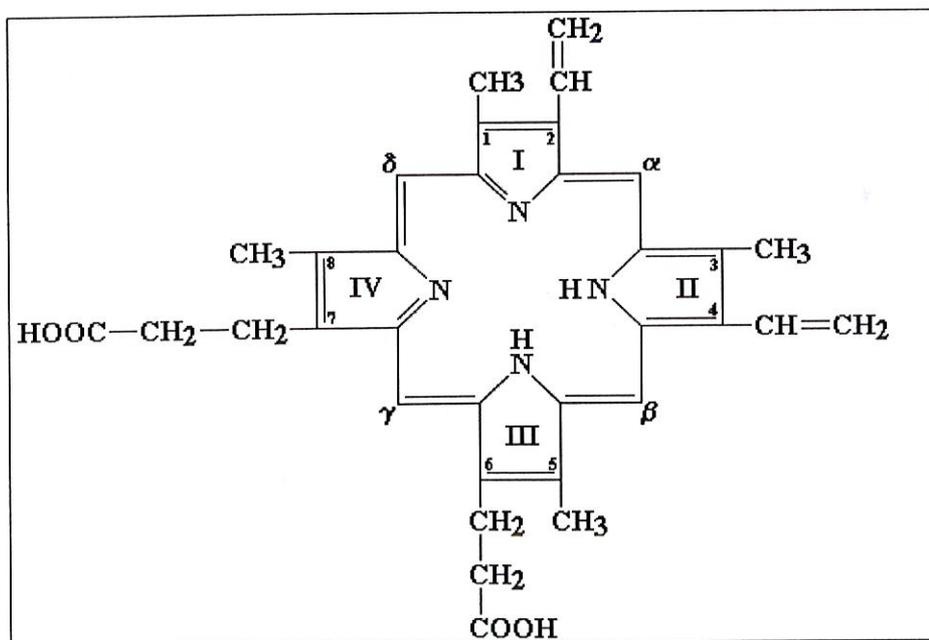


Figure B-5 : Structure de la protoporphyrine IX

II.3.2 Synthèse biologique des porphyrines

Les porphyrines de notre organisme proviennent toutes d'un précurseur de base : l'acide 5-amino-lévulinique (Figure B-6) ; la condensation de deux molécules de ce composé conduit au porphobilinogène. Quatre molécules de porphobilinogène vont alors s'associer pour former le noyau tétrapyrrolique, squelette de base des porphyrines.

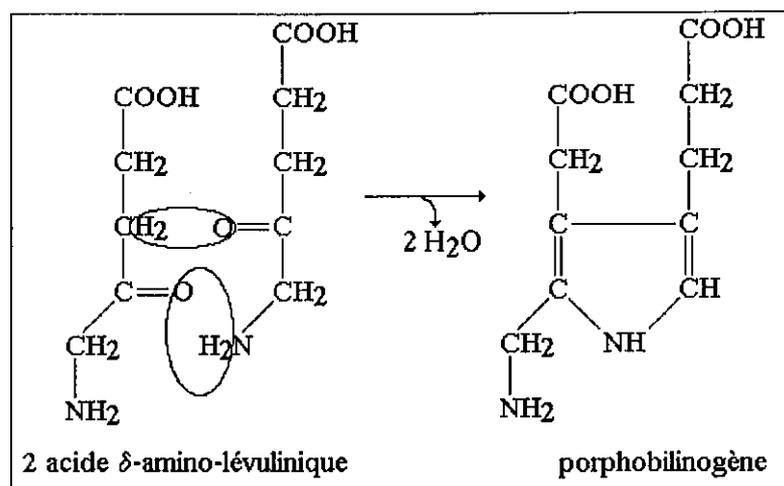


Figure B-6 : Formation du porphobilinogène

II.3.3 Synthèse chimique des porphyrines

Les porphyrines naturelles peuvent être éventuellement modifiées afin d'introduire des substituants pour aboutir à de nouvelles structures. Cependant, ces synthèses entraînent des limitations car certains substituants ne peuvent être modifiés facilement ou sont en nombre insuffisant. Pour palier ces problèmes, des méthodes de synthèse totale ont été mises au point. Au cours du temps plusieurs améliorations ont été apportées, mais les synthèses chimiques des porphyrines sont toutes réalisées à partir de pyrrole et d'aldéhydes. A l'heure actuelle principalement deux stratégies sont possibles : soit réaliser une synthèse "one pot", correspondant à une condensation tétrapyrrolique, soit réaliser un intermédiaire porphyrinogène de type dipyrrométhane substitué en position *méso* et/ou sur le noyau pyrrole.

II.3.3.1 Synthèse "one-pot"

Historiquement, les synthèses sont toutes réalisées à partir de pyrrole et de benzaldéhyde (Tableau B-1) pour aboutir à des tétraphénylporphyrines (TPP) (Figure B-7). Ces méthodes sont applicables à d'autres types d'aldéhydes et à des pyrroles fonctionnalisés.

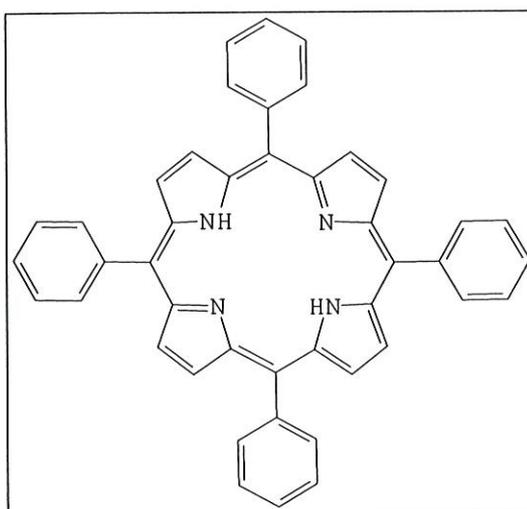


Figure B-7 : Structure de base des TPP

Méthode	Rothemund et Menotti	Adler et al.	Little et al.	Lindsey et al.
Année	1941	1967	1975	1987
Réactifs	Benzaldéhyde Pyrrole	Benzaldéhyde Pyrrole	Pyrrole Aldéhyde 1 Aldéhyde 2	Benzaldéhyde Pyrrole
Conditions	Pyridine Tube scellé N ₂ /150°C	Acide propionique Reflux/141°C/30 min	Acide propionique Reflux/141°C/3h	CH ₂ Cl ₂ BF ₃ -éthérate N ₂ /20°C/1h Oxydation par TCQ Reflux/39°C/1h
Rendement	5%	20%	8%	46%

Tableau B-1 : Historique de la synthèse des méso-porphyrines

D'après ces données, les meilleurs rendements sont obtenus en utilisant à la fin de réaction un agent d'oxydation de type 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone (DDQ) ou 2,3,5,6-tétrachlorobenzoquinone (TCQ) (Figure B-8).

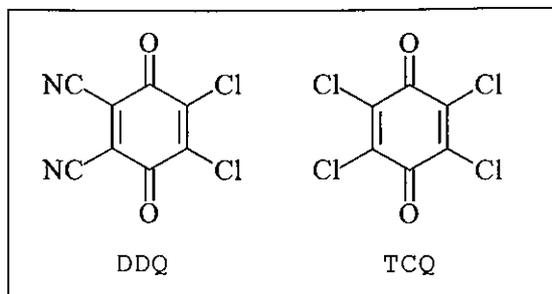


Figure B-8 : Structures de la DDQ et de la TCQ

Ces synthèses sont peu sélectives et donnent lieu à la formation de produits de polymérisation, de chlorines et d'un mélange de porphyrines, notamment lorsque deux aldéhydes différents sont mélangés.

II.3.3.2 Condensation dipyrrolique

De nombreux dérivés de porphyrine ont été synthétisés "one-pot". Cependant, pour des questions de faibles rendements, il est possible de réaliser une synthèse en 2 étapes. Cette voie a été initiée en 1960 par MacDonald en réalisant une condensation de deux dérivés 1,9-diformyldipyrrométhane substitués, représentant deux demi-porphyrines, en présence d'acide p-toluènesulfonique ou d'acide iodhydrique [Arsenault et al., 1960] (Figure B-9).

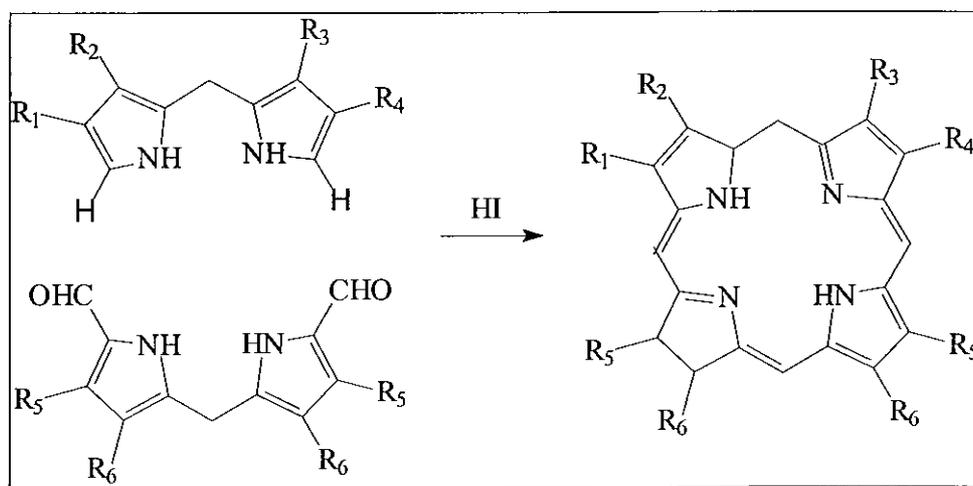


Figure B-9 : Synthèse 2+2 de MacDonald, 1960

Plus récemment, l'intermédiaire dipyrrolique est obtenu par la réaction d'un aldéhyde avec un excès de pyrrole (jouant aussi le rôle de solvant) en présence d'acide trifluoroacétique (TFA) ou d'éthérate de trifluorure de bore ($\text{BF}_3/\text{Et}_2\text{O}$) en quantité catalytique (Figure B-10). Le composé porphyrinogène obtenu est simplement purifié par recristallisation avec de bons rendements qui, toutefois, varient en fonction de la nature de l'aldéhyde. Les groupements R et R' peuvent être aliphatiques ou aromatiques [Lee et Lindsey, 1994]. Il suffit ensuite de faire réagir deux aldéhydes et deux dipyrrométhanes *méso*-substitués ou non. Il est possible aussi d'ajouter deux aldéhydes différents au lieu de deux équivalents du même aldéhyde. Le composé porphyrinogène obtenu est ensuite oxydé en présence de DDQ ou de TCQ.

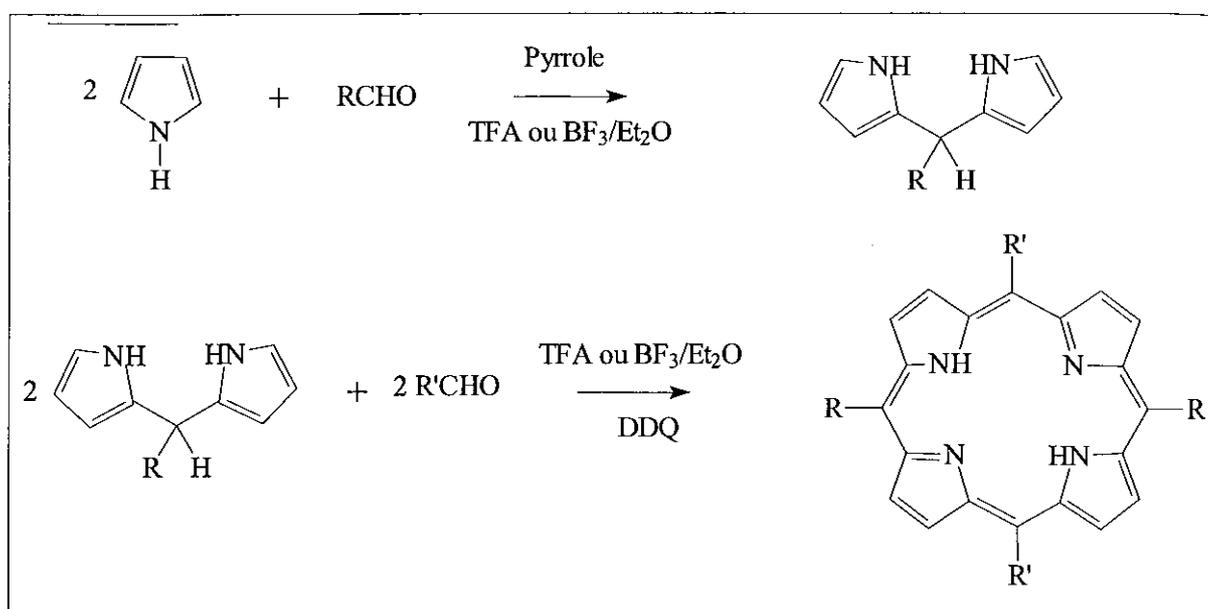


Figure B-10 : Description des synthèses de porphyrines en deux étapes

Cette méthode est plus longue à mettre en œuvre que la précédente, mais elle permet d'obtenir des porphyrines substituées en position *méso* et directement des composés trans si les aldéhydes sont différents.

La condensation de dérivés dipyrrométhane permet de mieux contrôler la pureté des produits en évitant les phénomènes de polymérisation.

II.3.4 Caractérisation spectrale des porphyrines

II.3.4.1 Spectre d'absorption

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

A côté de la bande de Soret, il existe quatre autres bandes d'intensité dix à vingt fois plus faible ; ce sont les bandes Q visualisées entre 480 et 700 nm, notées respectivement I, II, III et IV. Le nombre et l'intensité de ces bandes sont très variables et dépendent de plusieurs facteurs tels que le type et la nature de la substitution, l'absence ou la présence d'un métal, etc. En général, on rencontre quatre grands types de spectres : *étio*, *phyllo*, *rhodo* et *oxorhodo* (Figure B-11).

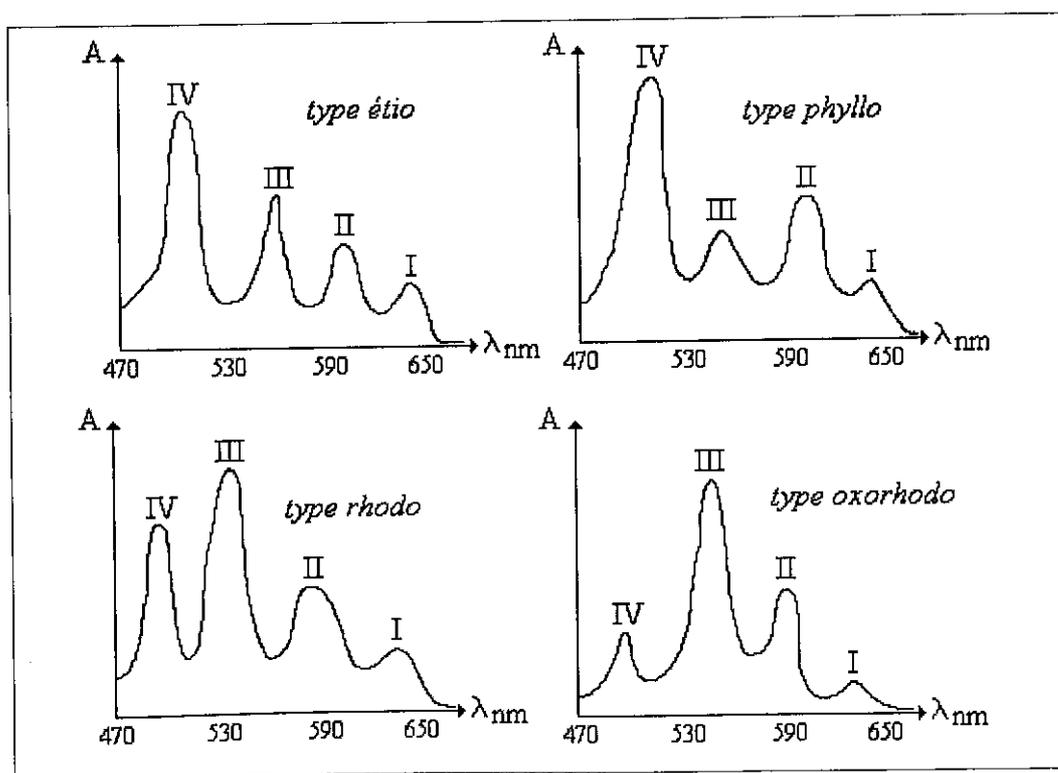


Figure B-11 : Bandes Q des quatre grands types de spectre des porphyrines bases libres

Rothemund et Menotti, 1941, ont ainsi montré que le composé $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tétraphénylporphine présente un spectre de type *étio*, alors que la γ -méthylphylloporphyrine se caractérise par un spectre de type *phyllo*.

II.3.4.2 Spectre de fluorescence

Outre la capacité d'absorber dans le visible, les porphyrines possèdent la capacité d'émettre à des longueurs d'onde supérieures à 600 nm. A titre d'exemple, nous avons représenté le spectre de fluorescence d'une porphyrine sur la Figure B-12 suivante.

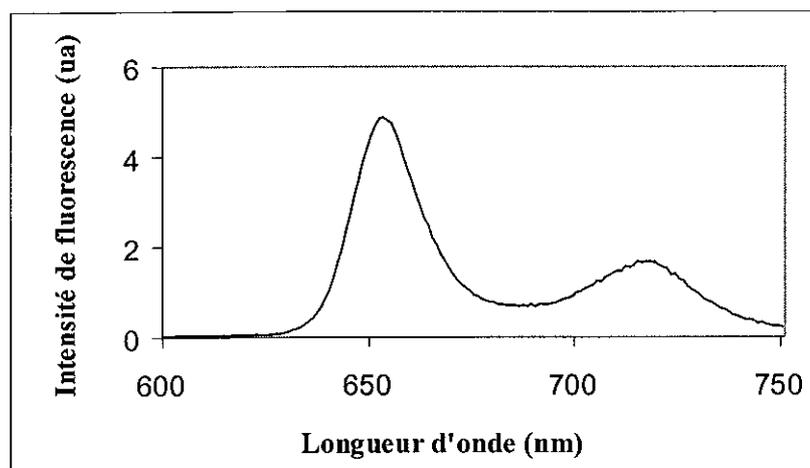


Figure B-12 : Exemple de spectre de fluorescence d'une porphyrine

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

II.4 LA PHOTOOXYDATION

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

En 1976, Weishaupt et al. ont postulé que l'oxygène singulet (1O_2) est l'agent cytotoxique responsable de la photoinactivation des cellules tumorales. Le mécanisme photochimique général de la PDT est représenté ci-dessous dans la Figure B-13.

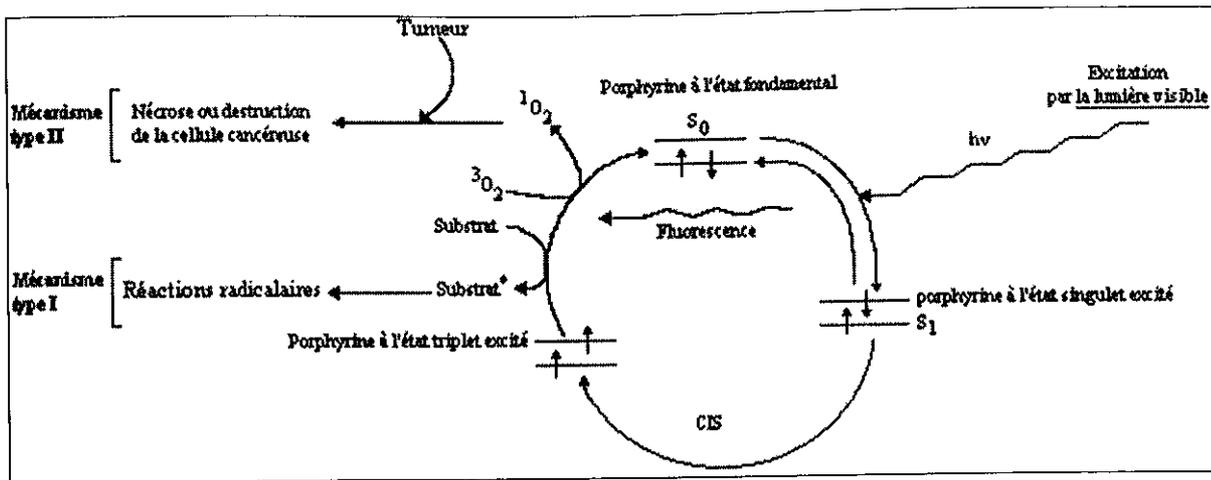
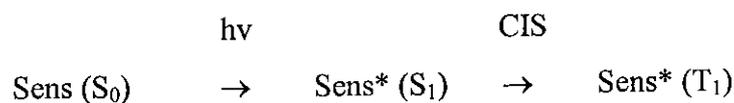


Figure B-13 : Mécanisme photochimique général de la thérapie photodynamique

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

II.4.1 Etape n°1 : Passage du photosensibilisateur de l'état fondamental S₀ à l'état excité triplet T₁ suite à l'absorption de lumière

La molécule photoréactive est initialement à l'état fondamental S₀ ; suite à l'absorption d'un photon, elle va se retrouver tout d'abord à un niveau énergétique supérieur de type singulet S₁. Une conversion intersystèmes (CIS) entre l'état singulet S₁ et l'état triplet T₁ est alors possible bien que cette transition non radiative soit interdite : le photosensibilisateur se trouve dans l'état triplet T₁ qui peut participer à la deuxième étape de la réaction de photooxydation.



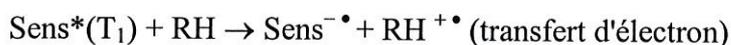
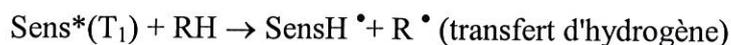
Il faut bien avoir en mémoire qu'au niveau de l'état singulet S₁, la conversion intersystèmes S₁ → T₁ n'est pas l'unique type de transition réalisée : on peut par exemple observer des phénomènes de fluorescence. Par conséquent, pour que l'effet photodynamique soit important, il sera nécessaire que l'efficacité de la conversion intersystèmes S₁ → T₁ du photosensibilisateur soit très supérieure à l'efficacité des autres processus de désactivation de S₁. Ainsi, le rendement quantique du croisement intersystèmes S₁ → T₁, noté φ_{isc} devra être élevé pour permettre de peupler efficacement l'état triplet : les autres processus de désactivation constitueront alors des phénomènes secondaires.

II.4.2 Etape n°2 : Photooxydations sensibilisées à partir du photosensibilisateur à l'état triplet T₁

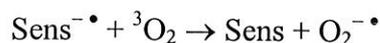
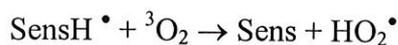
La molécule à l'état triplet T₁ constitue un agent très réactif, pouvant réagir non seulement avec les molécules du tissu où est concentré le photosensibilisateur mais aussi avec l'oxygène présent à cet endroit et apporté par le système vasculaire. Par conséquent, on distingue deux types de réaction pour cette étape : les réactions de type I et les réactions de type II [Foote, 1991].

II.4.2.1 Réaction de type I

Dans ce cas, le photosensibilisateur va réagir directement avec la molécule d'un substrat réducteur : la réaction de type I est donc un transfert d'atome d'hydrogène ou d'électron à partir de ces substrats réducteurs vers la molécule photosensibilisante à l'état triplet T₁ ; il en résulte que des radicaux ou des ions radicaux vont être produits. Le schéma ci-dessous illustre les deux types de réaction possibles avec le type I [Braun et al., 1986] :



Les radicaux SensH[•] et les formes semi-réduites Sens^{-•} peuvent alors réagir, soit avec d'autres molécules RH du substrat, soit avec des molécules d'oxygène à l'état triplet fondamental (³O₂). La réaction avec l'oxygène va non seulement produire des agents oxydants (anion superoxyde, hydroperoxyde) très puissants, mais aussi régénérer le photosensibilisateur dans son état fondamental S₀ :

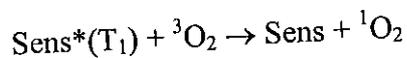


L'anion superoxyde O₂^{-•} va alors pouvoir oxyder des composés de la cellule. Cependant, bien qu'il possède le potentiel de réagir avec ces éléments, son réel danger repose dans sa capacité à générer des radicaux hydroxyle OH[•], qui sont souvent considérés comme les métabolites de l'oxygène les plus réactifs. Il a en effet été clairement établi que les radicaux hydroxyle OH[•] sont impliqués dans la destruction des membranes cellulaires en réagissant chimiquement avec

des acides gras polyinsaturés : il en résulte la formation de radicaux lipidiques (L^{\bullet}), de radicaux lipidiques alkoxy (LO^{\bullet}), de peroxydes lipidiques (LOO^{\bullet}) et d'hydroperoxydes lipidiques ($LOOH$) [Ochsner, 1997]. Ces produits réactionnels vont alors entraîner la déstabilisation des membranes de la cellule.

II.4.2.2 Réaction de type II

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



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

En conclusion, le photosensibilisateur et la lumière sont les agents initiateurs d'une suite de diverses réactions chimiques qui aboutissent à la destruction de la tumeur. Il est nécessaire que les cellules tumorales soient bien oxygénées. Cependant, du fait de la faible durée de vie de ces espèces réactives issues de l'oxygène, le rayon d'action du photosensibilisant est limité au sein des cellules (0,1 à 0,02 μm).

II.4.2.3 Les cibles biomoléculaires de la photooxydation

Les biomolécules pouvant subir une photooxydation possèdent toutes des sites riches en électrons, ce qui dénote le caractère électrophile du mécanisme photodynamique. Les acides gras insaturés et leurs esters sont transformés en peroxydes suivant la réaction de type II. Les acides aminés libres ou incorporés dans les chaînes polypeptidiques des protéines, peuvent également subir une photooxydation. Le Tableau B-2 suivant présente les principaux types de biomolécules susceptibles d'être facilement photooxydés, le site attaqué et les principaux produits finaux de la réaction.

Biomolécules	Sites attaqués	Principaux produits finaux
Lipides	Doubles liaisons C=C	Peroxydes
Stéroïdes	Cholestérol	Hydroperoxydes
Polysaccharides	Groupes hydroxyle par une réaction de type I	Cétones
Protéines	Tryptophane Histidine Tyrosine Méthionine Cystéine	Destruction du cycle imidazole Sulfoxyde de méthionine ; Méthional Acides cystéiques ; Cystines

Tableau B-2 : Biomolécules photooxydables

La photooxydation des biomolécules conduit à une modification des fonctions biologiques engendrant l'effet cytotoxique.

II.5 LES PHOTOSENSIBILISANTS

II.5.1 Introduction

Le choix du photosensibilisateur est d'une importance capitale pour permettre une photosensibilisation efficace. Par conséquent, il doit répondre à divers critères généraux :

- Le domaine d'absorption de la molécule photosensibilisante doit être situé dans le visible ou l'UV et impérativement dans une région spectrale où les composés cellulaires n'absorbent pas afin de s'affranchir des réactions secondaires indésirables.
- Le photosensibilisateur doit être inerte vis-à-vis de l'oxygène singulet et des composés à oxyder : il n'interviendra donc pas dans les réactions photochimiques.
- L'énergie de l'état triplet T_1 du photosensibilisateur doit être supérieure à celle de l'oxygène singulet (94 kJ/mol) afin que le transfert d'énergie soit efficace [Adams et al., 1992].
- La durée de vie de l'état triplet T_1 doit être assez longue afin de permettre une bonne interaction entre le photosensibilisateur et l'oxygène à l'état triplet.

- Le rendement quantique du CIS $S_1 \rightarrow T_1$ doit être le plus grand possible pour permettre un bon peuplement de l'état triplet T_1 ; les désactivations de tout autre type devront donc être des processus secondaires de faible importance [Braun et al., 1986].
- La pénétration de la lumière dans la zone tumorale doit être la plus importante possible. La Figure B-14 représente la relation entre la profondeur de pénétration de la lumière dans la tumeur et la longueur d'onde de la source lumineuse. Il est intéressant de remarquer que la profondeur de pénétration lumineuse double entre 550 et 700 nm. En revanche, au-delà de 700 nm, elle n'augmente que de 10%.

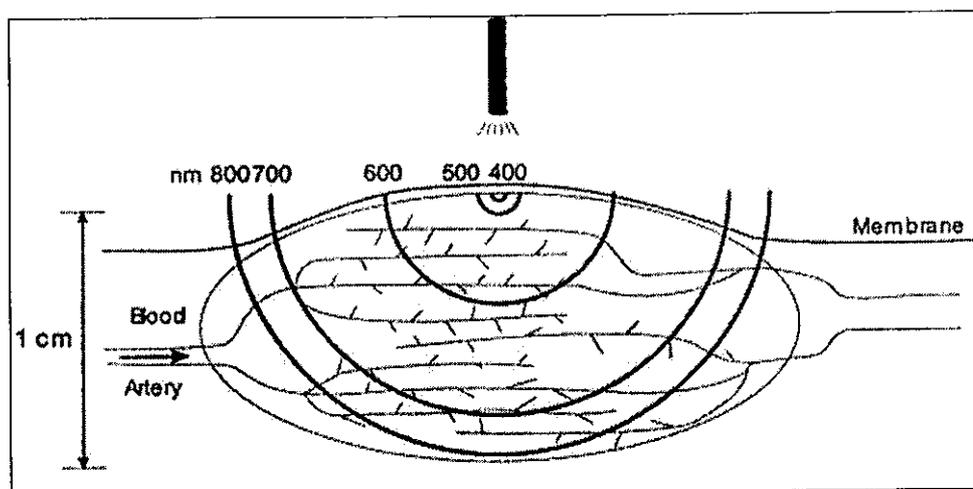


Figure B-14 : Relation entre la profondeur de pénétration de la lumière et la longueur d'onde de la source lumineuse

Ces conditions générales s'adressent à tout type de photosensibilisateur. En plus de ces critères, les produits utilisés en thérapie photodynamique devront posséder certaines propriétés plus spécifiques à la PDT avec le moins d'effets secondaires possibles, une non toxicité en absence de lumière, une absence de photosensibilité rémanente pour la peau.

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

II.5.2 Les photosensibilisants de première génération

II.5.2.1 HpD ("Hématoporphyrin derivative")

Dans les années 60, Schwartz [Sternberg et al., 1998] mit au point un mélange à base d'hématoporphyrine (Hp) et de dérivés de celle-ci obtenus par l'action d'acide sulfurique et d'acide acétique sur l'Hp, puis par l'action de soude. Cette préparation dont la composition était souvent variable fut appelée "Dérivé de l'hématoporphyrine" (HpD) (Figure B-15). Lipson utilisa l'HpD en combinaison avec d'autres porphyrines telles que la protoporphyrine (PpIX) et l'uroporphyrine. Il réussit avec ces produits et des irradiations lumineuses à traiter avec succès un cancer du sein; ceci marqua véritablement le début de la photochimiothérapie anticancéreuse qui est donc basée sur l'utilisation de porphyrines [Sternberg et al., 1998].

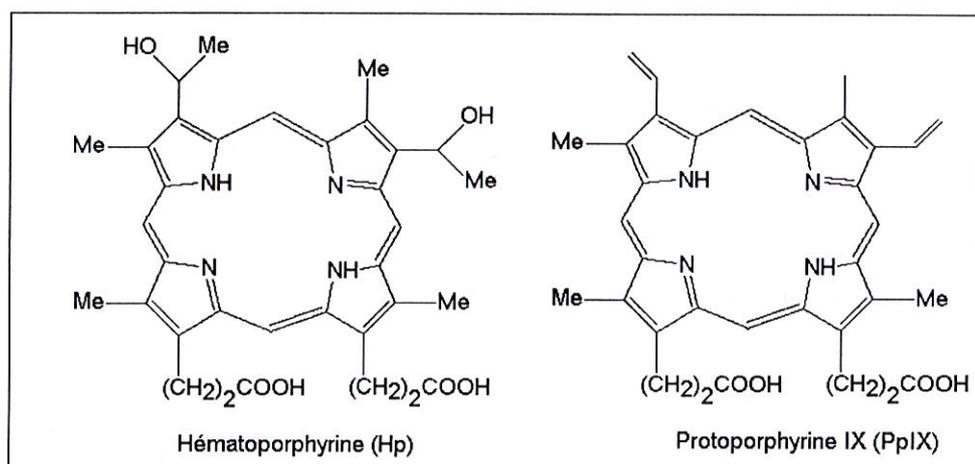


Figure B-15 : Représentations de l'hématoporphyrine et de la protoporphyrine IX

Ainsi, durant les années 70, différentes préparations d'HpD furent utilisées dans de nombreux essais cliniques. Plusieurs années après, Dougherty [Sternberg et al., 1998] a mis au point le Photofrin II[®], ultrafiltrat de l'HpD. Par la suite, les laboratoires canadiens QLT ont synthétisé le Photofrin[®], produit issu de nombreuses purifications et considéré comme le produit phare de la PDT (même si des limites existent, cf. paragraphe suivant).

II.5.2.2 Photofrin[®]

Le Photofrin[®] est un mélange d'oligomères formant des dimères, trimères, etc., reliés par des liaisons esters ou éthers. Déterminer quelle est la fraction active de ce produit n'a pas été

facile; de nombreuses études ont été réalisées dans ce but. Il semblerait que seuls les dimères et trimères avec des liaisons éthers présentent une activité photocytotoxique efficace [Pandey et al., 1988]. Par ailleurs, les dimères avec des liaisons esters sont instables dans des conditions physiologiques expliquant ainsi leur inactivité alors que ceux reliés par des ponts éthers résistent parfaitement aux conditions physiologiques. De plus, dans la mesure où les liaisons éthers sont détruites en milieu acide et que le pH des cellules tumorales est acide, il est probable que ces dimères avec des ponts éthers soient clivés en monomères lorsqu'ils pénètrent dans la cellule tumorale [Pandey et al., 1990].

Actuellement, le Photofrin[®] est indiqué dans le traitement des rechutes de certains cancers bronchiques ou du cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional antérieur.

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

- Son manque de pureté limite sa sélectivité envers les tissus néoplasiques et empêche la réalisation des tests de pharmacocinétique ou de toxicité fiables.
- Sa forte accumulation dans la peau provoque une importante photosensibilisation jusqu'à six semaines après le traitement.
- Sa longueur d'onde d'absorption maximale est de 630 nm ; or, à cette longueur d'onde, les chromophores endogènes des tissus, en particulier l'oxyhémoglobine vont également absorber la lumière créant des interférences et diminuant ainsi la photoactivation du Photofrin[®]. De plus, la dispersion de la lumière au sein du tissu va également limiter sa pénétration dans celui-ci [Miller, 1999].

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

II.5.3 Les photosensibilisants de seconde génération

Les photosensibilisateurs de première génération avec le Photofrin® en tête ont permis le développement de la PDT. Mais les limites de ces composés ont conduit à développer de nouveaux photosensibilisants de seconde génération. Idéalement, un système photosensibilisant pour être spécifique et efficace devrait posséder différents modules correspondant à (i) un ligand internalisable conférant une spécificité de délivrance du médicament dans la cellule cancéreuse (car les récepteurs membranaires sont différents d'une cellule normale), (ii) une séquence avec une activité endosomolytique qui permettrait à la molécule d'être libérée dans le cytoplasme, (iii) un signal du ciblage cellulaire et bien sûr la molécule photosensibilisante (Figure B-16). La réalisation d'un tel composé apparaît difficile techniquement. Toutefois, des modifications peuvent être apportées à la molécule photosensibilisante pour améliorer sa spécificité vis-à-vis des tissus tumoraux.

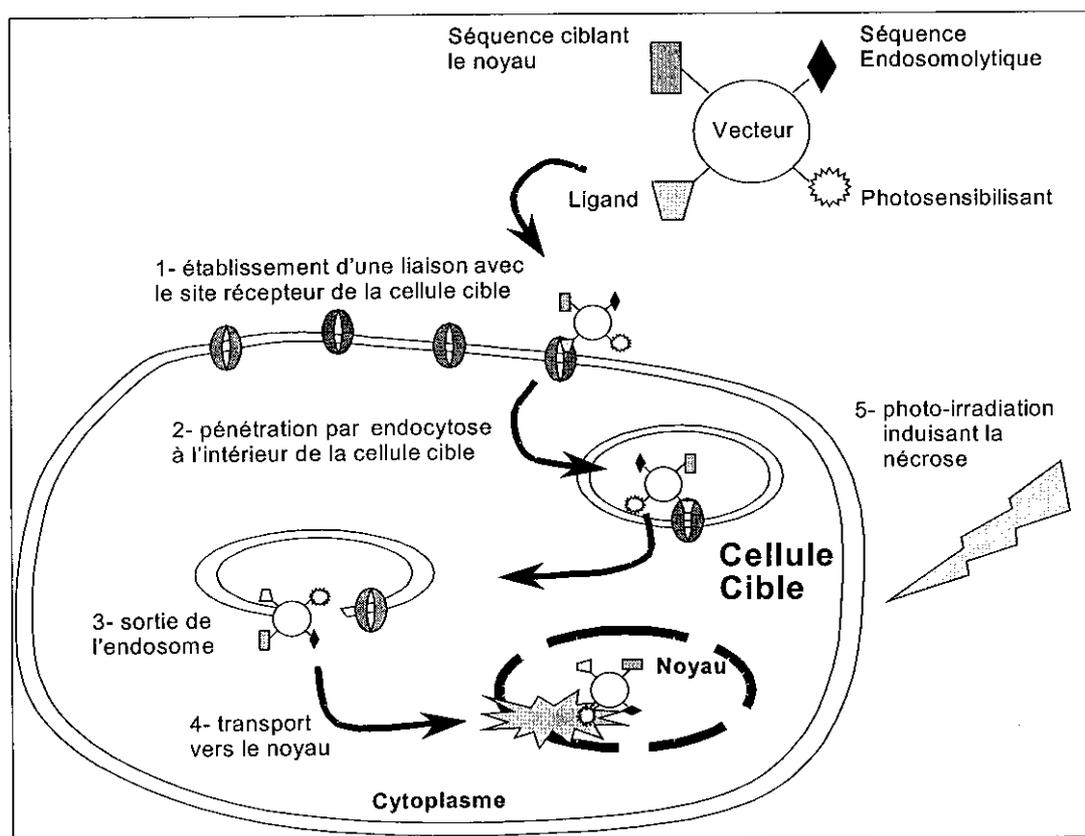


Figure B-16 : Devenir d'une molécule possédant différentes séquences permettant de vectoriser spécifiquement le photosensibilisant [Sobolev et al., 2000]

De nombreuses molécules photosensibilisantes, modifiées structurellement pour augmenter leur efficacité et donc leur action antitumorale, sont décrites.

➤ Posséder des groupements hydrophiles :

Le caractère hydrophile assure au dérivé une bonne solubilité dans l'eau ; il peut être obtenu par la fixation de groupements anioniques tels que le groupement sulfonate présent dans la "*tetraphenyl porphine trisulfonate*" (TPPS₃) ou le groupement carboxylate dans la "*tetracarboxyphenylporphine*" (TCPP) [Pasternack et al., 1972] ou de groupements cationiques de type pyridinium [Kaldapa et al., 2000].

➤ Posséder des groupements lipophiles :

La présence de groupements lipophiles tels que les résidus aryles, alkyles ou acétyles permet une bonne pénétration dans la membrane plasmique [Schell et Hombrecher, 1999].

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

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

➤ Greffer des vecteurs :

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

Les groupements glycosylés se révèlent très intéressants en tant que molécules vectrices. En effet, il existe au niveau de la membrane de la cellule des glycoprotéines, nommées lectines. Les lectines sont de véritables récepteurs membranaires qui vont en plus guider le ligand dans différents compartiments cellulaires tels que les lysosomes, les endosomes et l'appareil de Golgi. Or, certaines cellules cancéreuses possèdent un nombre de lectines anormalement élevé [Monsigny et al., 1994]. Des photosensibilisateurs possédant des groupements glycosylés ont ainsi été synthétisés dans l'espoir que ces molécules pourraient se fixer préférentiellement sur les lectines et faciliter leur intégration au sein de la cellule tumorale. Par ailleurs, les groupements glycosylés de par leur caractère hydrophile devraient assurer aux dérivés porphyriniques une bonne solubilité dans l'eau [Sol et al., 1999].

Considérant cette caractéristique, différents travaux ont été menés :

- Porphyrines ceinturées avec des groupements glycosylés donnant à la molécule une organisation tridimensionnelle qui lui confère une structure stéréosélective propice à des réactions de catalyse [Davoust et al., 1999].
- Porphyrines avec des cycles glycosylés acétylés ou non afin d'analyser le lien entre le caractère hydrophile de ces molécules et leur action photocytotoxique [Mikata et al., 1998].
- Porphyrines avec des cycles glycosylés en position *bêta* [Fülling et al., 1989 ; Ono et al., 1992], en position *méso* [Cornia et al., 1994], sur des groupements *méso*-aryles [Driaf et al., 1993, 1996 ; Oulmi et al., 1995], sur des groupements *méso*-porphyrinyles [Li et Czuchajowski, 1994].

Une bibliographie plus détaillée est présentée en Annexe B-3.

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

Outre les unités glucidiques, différents vecteurs ont été utilisés :

- Des petits peptides, tels que des séquences alanylle [Sol et al., 1997] ou séryle [Sol et al., 1999], associés à des structures porphyrine glycosylées sont reconnus spécifiquement par la cellule tumorale.
- Des dérivés de l'œstradiol : ils permettent de cibler l'action photocytotoxique au niveau des cellules possédant de nombreux récepteurs aux œstrogènes, ce qui augmente considérablement la capture des œstrogènes par ces cellules ; ce phénomène est observé par exemple dans les cas de cancer du sein et de l'ovaire [Montforts et al., 1992 ; James et al., 1999].
- Des groupements d'acridone : l'acridone est une molécule qui va s'insérer au niveau de l'ADN du noyau, entraînant ainsi sa destruction. L'acridone parvient à pénétrer le noyau des cellules contrairement aux porphyrines qui restent au niveau de la membrane nucléaire. Par conséquent, le dérivé porphyrine-acridone permettra d'accroître l'activité nucléasique [Mehta et al., 1993].

- Utiliser des dimères et trimères de porphyrines reliés par des ponts éthers :

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

- Utiliser des chlorines, des bactériochlorines, des phthalocyanines, des naphthalocyanines :

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

Des premières synthèses de photosensibilisateurs de deuxième génération à celles d'aujourd'hui, il a été possible de déterminer des caractéristiques générales pour ces composés :

- le caractère amphiphile apparaît comme un élément important pour faciliter la pénétration membranaire et la solubilité dans l'eau,
- l'augmentation de la longueur d'onde d'absorption dans la partie rouge du spectre visible,
- l'utilisation de vecteurs tels que des sucres ou des petits peptides pourrait améliorer la spécificité d'action des molécules photosensibilisantes.

Plusieurs équipes ont déjà combiné ces paramètres pour améliorer la photocytotoxicité de leurs dérivés.

Ces caractéristiques mises à part, d'autres éléments doivent être considérés : ainsi, le produit photosensibilisant ne devra pas ou devra peu s'agréger car l'agrégation diminue la photoactivité [Schell et Hombrecher, 1999]. L'aspect configurationnel est aussi à prendre en compte : certains produits seront plus actifs en configuration *trans* et d'autres en configuration *cis* [Davoust et al., 1999].

II.5.4 Le futur

II.5.4.1 Anticorps monoclonaux et 5-Aminolévulinique

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

Des photosensibilisateurs couplés à des anticorps monoclonaux ont été synthétisés. Ceci améliorerait non seulement l'affinité du composé pour la cellule tumorale ciblée mais aussi sa spécificité d'action, atténuant ainsi les effets indésirables. Ce nouveau type de dérivés a été testé sur des cellules humaines de cancer du colon [Del Governatore et al., 2000], sur des cellules murines de cancer de l'ovaire [Goff et al., 1991] ; les résultats observés sont encourageants.

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

II.5.4.2 Les texaphyrines

Les Texaphyrines sont des porphyrines expansées (Figure B-17), c'est-à-dire possédant un squelette à plus de 4 cycles pyrrole [Sessler et al., 1988].

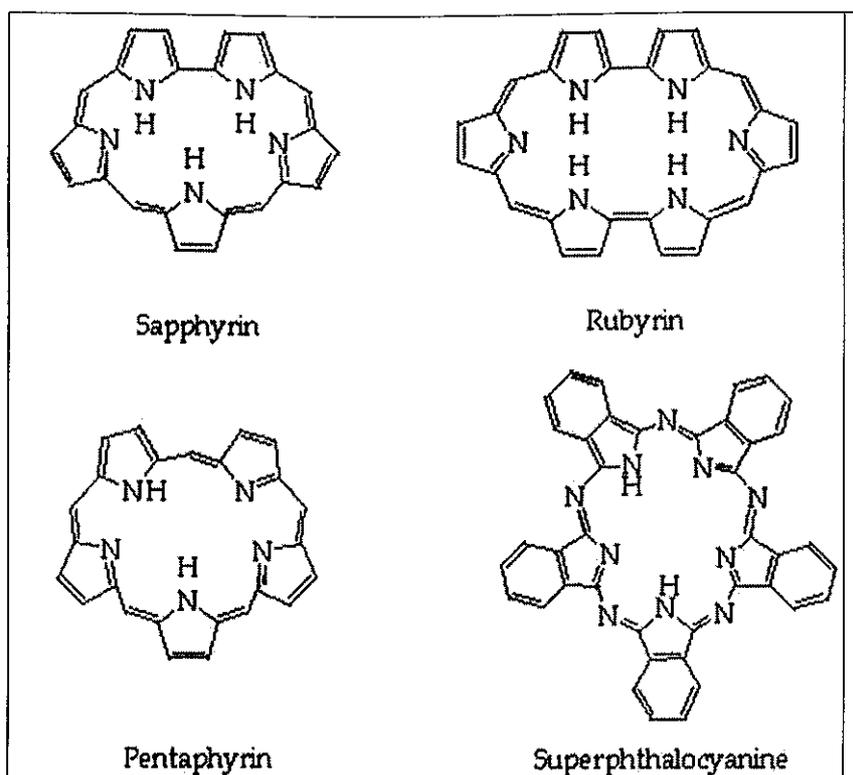


Figure B-17 : Exemples de porphyrines expansées

Les texaphyrines possèdent une cavité liante 20% plus large que les porphyrines naturelles ; de plus, elles comptent cinq atomes d'azote qui assurent des liaisons stables, non labiles avec des métaux. Les texaphyrines, complexées avec des métaux de la série des lanthanides tels que le gadolinium ou le lutétium, présentent un intérêt particulier ; en effet, ces complexes sont beaucoup plus stables que ceux réalisés avec des porphyrines classiques [Sessler et al., 1993]. Deux composés ont été élaborés : il s'agit de l'Antrin[®] et du Lutrin[®] (Figure B-18) qui sont des texaphyrines métallées avec l'ion lutétium (III). L'avantage de ces composés réside dans leur longueur d'onde d'excitation comprise entre 720 et 760 nm. Ceci permet d'envisager des applications de la PDT dans des tissus profonds ; de plus, ces valeurs de longueurs d'onde diminuent fortement les effets parasites provenant des chromophores endogènes des tissus. En février 2000, le Lutrin[®] était en phase II des essais cliniques pour les cancers du sein [Sessler et Miller, 2000].

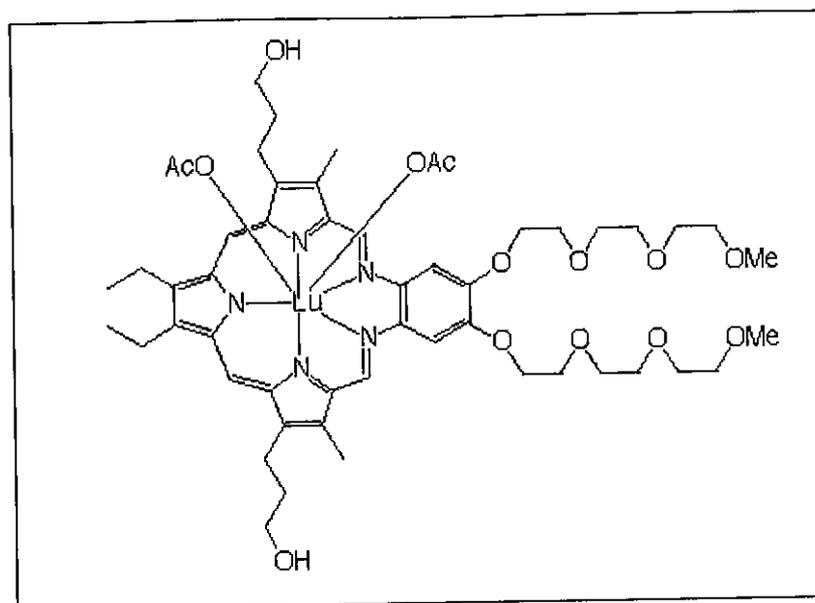


Figure B-18 : Structure moléculaire du Lutrin®

II.5.4.3 La BPD-MA

La benzoporphyrine monoacide ou BDP-MA (Figure B-19) est l'un de ces photosensibilisants de seconde génération qui présente une bonne alternative aux dérivés de l'hématoporphyrine. Il s'agit d'une molécule hydrophobe qui, incorporée dans des liposomes, est injectée par voie intraveineuse ; cette caractéristique lui permet de se localiser dans les structures lipidiques des cellules. Sa longueur d'onde d'excitation est située à 690 nm ce qui est très avantageux par rapport au Photofrin®. Après injection, l'activation par la lumière peut se faire après 1,5 à 6 heures. L'élimination par l'organisme, facilitée par un photoblanchiment très rapide, est totale après 2 à 3 jours. Le mécanisme photodynamique par lequel cette molécule agit n'est pas encore défini. Il semble que son action repose principalement sur la production d'oxygène singulet [Richter et al., 1996].

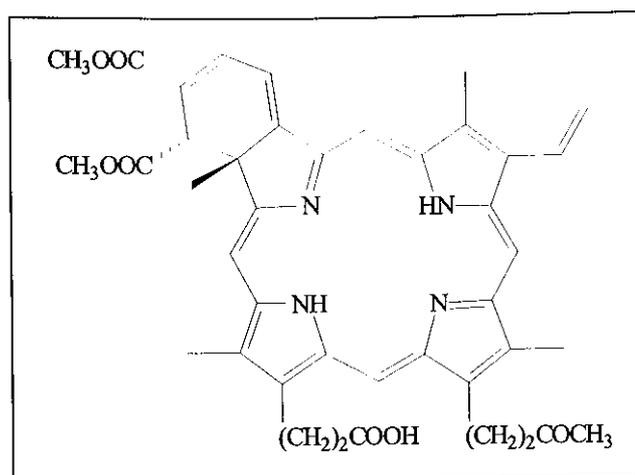


Figure B-19 : Structure de la BDP-MA

Ce composé se trouve en phases I et II des essais cliniques pour le traitement des cancers cutanés.

II.5.4.4 La *m*THPC

La méta-tétra(hydroxyphényl)chlorine ou *m*THPC (Figure B-20) est également un photosensibilisant de deuxième génération de type chlorine. Il est produit par la firme Scotia, Grande-Bretagne, sous le nom de Foscan[®]. Ce photosensibilisant est actuellement considéré comme l'un des photosensibilisants les plus actifs pour le traitement des cancers par thérapie photodynamique [Dougherty et al., 1998]. Tout comme la BDP-MA, la *m*THPC présente une longueur d'onde d'excitation supérieure à 630 nm (652 nm) permettant une meilleure pénétration dans les tissus tumoraux.

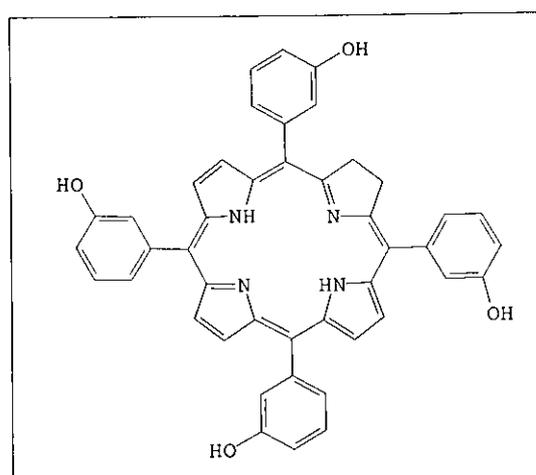


Figure B-20 : Structure de la *m*THPC

Par ailleurs, la *m*THPC présente un bon index thérapeutique (nécrose maximale des tumeurs sans effet majeur sur les tissus sains) et est peu ou pas toxique en absence de lumière. Par sa

sélectivité pour certains tissus, cette molécule va différer de la BDP-MA dans sa prescription clinique. Elle est en effet utilisée pour le traitement des cancers de l'œsophage ou de la langue. A l'heure actuelle de nombreux essais cliniques en différentes phases (Annexe B-2) et de nombreux modèles expérimentaux (dont certains au Centre Alexis Vautrin [Rezzoug et al., 1998 ; Melnikova et al., 1999 ; Bossu et al., 1999]) présentent des résultats encourageants.

D'autres photosensibilisants sont actuellement testés en phase préclinique ou en phase I d'essais cliniques.

II.5.5 Localisation des photosensibilisateurs

II.5.5.1 Paramètres d'influence

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

➤ Lipophilie et LDL :

Initialement, on pensait que l'albumine était la principale molécule sérique se liant aux photosensibilisateurs [Moan, 1986]. Il a même été montré que les photosensibilisateurs qui se fixent préférentiellement sur le site II de l'albumine développent une meilleure efficacité [Tsuchida et al., 1997]. Néanmoins, ces composés se lient également à d'autres protéines sanguines comme les lipoprotéines [Reyftmann et al., 1984] et particulièrement les LDL (Low Density Lipoproteins), ceci d'autant plus qu'ils seront hydrophobes [Jori et al., 1984].

La cellule tumorale a besoin de cholestérol pour élaborer sa membrane. Celui-ci est synthétisé dans le foie, puis acheminé vers les cellules grâce aux LDL. Celles-ci se fixent sur des récepteurs spécifiques aux LDL, ce qui permet leur entrée dans la cellule [Stryer, 1997]. Or, il a été constaté que les cellules tumorales présentaient au niveau de leur membrane plasmique un nombre de récepteurs aux LDL nettement supérieur à la normale. C'est pourquoi, les agents photosensibilisants liés aux LDL vont s'accumuler beaucoup plus dans des cellules tumorales que dans des cellules saines [Miller, 1999].

Par ailleurs, un autre constat a été fait : les lipoprotéines ont une grande spécificité vis-à-vis des cellules endothéliales de la néovascularisation. Par conséquent, la prise en charge du photosensibilisateur par les LDL, après injection dans l'organisme, peut aboutir après

irradiation à la destruction du tissu tumoral fortement vascularisé [Jori et al., 1984]. Cette dernière action est renforcée par la forte affinité de l'HpD pour les cellules de la vascularisation [Henderson et al., 1983].

➤ **Le pH :**

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

Ces résultats ont récemment été confirmés [Ma et al., 1999] : une injection de glucose baisse le pH et augmente l'accumulation de *m*THPC dans la tumeur. De plus, ils ont observé que l'effet anti-tumoral était accru quand la tumeur était refroidie à 5°C. Par conséquent, le refroidissement et une injection de glucose combinés augmentent l'efficacité de la PDT.

Par ailleurs, les tumeurs ont en général un pH plus bas que celui des cellules normales (de l'ordre de 0,5 unité) [Lagerberg et al., 2000] : ainsi, si la lipophilie du photosensibilisateur utilisé augmente avec une baisse de pH, il sera possible d'augmenter davantage la sélectivité de cette molécule vis-à-vis des cellules tumorales par rapport aux autres cellules [Moan et al., 1987].

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

II.5.5.2 Passage de la membrane plasmique

Les photosensibilisateurs peuvent entrer dans les cellules soit directement par passage à travers la membrane plasmique, soit par endocytose. Le passage à travers la membrane plasmique peut se faire par diffusion simple, par diffusion facilitée ou par des mécanismes de transport actifs [Berg et Moan, 1997]. Ces différents types de transport sont rappelés dans la Figure B-21.

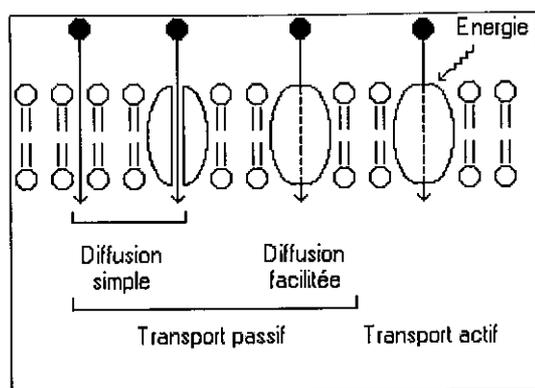


Figure B-21 : Les modes de transport membranaire des photosensibilisants

Ce passage transmembranaire est dépendant de plusieurs facteurs tels que les propriétés chimiques de la molécule, sa taille, sa charge, son hydrophobie et son caractère amphiphile [Woodburn et al., 1991]. Il faut également prendre en compte le fait que les photosensibilisateurs peuvent être sujets à l'agrégation. La structure agrégante va alors posséder des propriétés complètement différentes de celles observées pour une molécule seule. Ainsi, les gros agrégats dans la plupart des cas ne pourront pas entrer dans la cellule, alors que les plus petits agrégats entreront dans les cellules par endocytose [Berg et Moan, 1997].

On a longtemps pensé que les molécules photoréactives liées aux LDL entraient dans la cellule en suivant l'endocytose des LDL, ce qui était en contradiction avec différentes études où des photosensibilisants étaient localisés ailleurs que dans les endosomes et les lysosomes, entités où les LDL sont retrouvées. En fait, il semble que le complexe LDL-photosensibilisateur se fixe sur le récepteur LDL au niveau d'un puits recouvert de molécule de clathrine ; mais une fois la LDL liée à son récepteur, la molécule photosensibilisatrice quitterait la LDL pour diffuser à travers la membrane plasmique [Rodal et al., 1998] comme l'indique la Figure B-22.

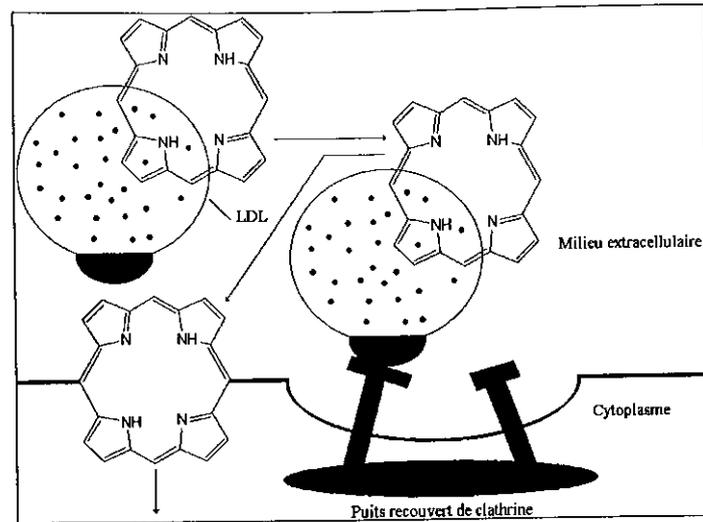


Figure B-22 : Capture des photosensibilisateurs fixés aux LDLs

La Figure B-23 retrace les différentes voies que peuvent emprunter les agents photosensibilisants afin de rentrer dans la cellule tumorale. Nous pouvons remarquer que la localisation du photosensibilisateur dans des endroits différents de la cellule est fonction du mode de pénétration à travers la membrane plasmique.

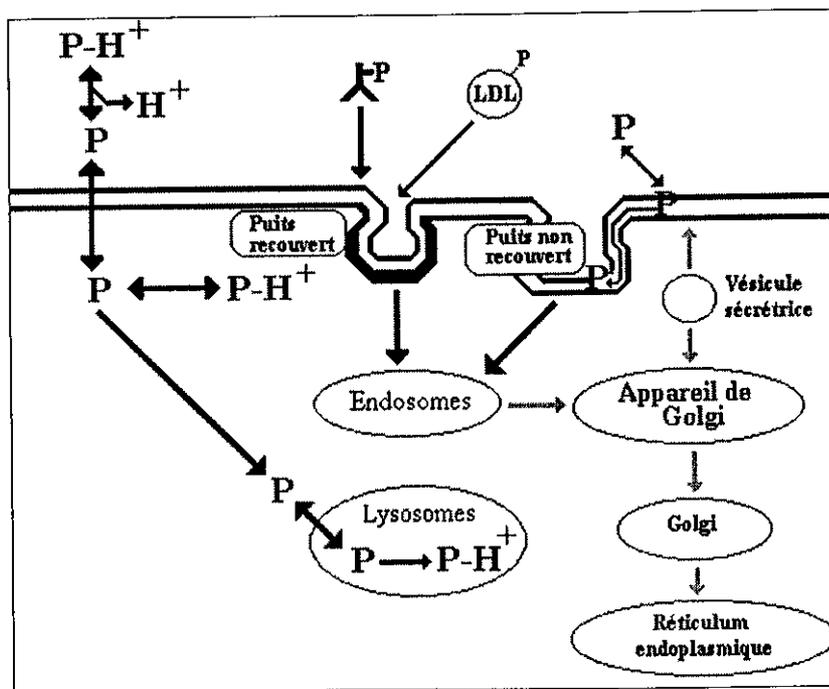


Figure B-23 : Mécanismes de capture liés à la localisation des photosensibilisateurs

II.5.5.3 Localisation dans la cellule

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

La plupart des molécules photosensibilisantes sont localisées dans les compartiments cellulaires suivants : membrane plasmique, mitochondrie, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, lysosomes, région périnucléaire [Ochsner, 1997] de façon plus ou moins importante. Par exemple, les images de fluorescence de la *m*THPC ont montré une localisation diffuse de ce composé dans différents compartiments du cytoplasme mais pas dans le noyau [Melnikova et al., 1999] ; les photosensibilisateurs hydrophiles sont pour la plupart capturés par endocytose et sont localisés préférentiellement dans les lysosomes ; les composés lipophiles sont souvent retrouvés dans les membranes cellulaires notamment les membranes des mitochondries et du réticulum endoplasmique [Sailer et al., 2000].

En conclusion, la phototoxicité d'un photosensibilisant semble dépendre en grande partie de sa localisation subcellulaire.

II.5.6 Apoptose et nécrose

La cascade réactionnelle suivant la photoactivation du photosensibilisateur conduit à la production de composés toxiques pour la cellule atteinte. Deux types de mort cellulaire peuvent être envisagés : la nécrose ou lyse de la cellule et l'apoptose correspondant à la mort programmée de la cellule.

II.5.6.1 Apoptose

L'apoptose est une forme morphologiquement reconnaissable de mort cellulaire qui est mise en œuvre par un mécanisme conservé à travers l'évolution de la vie [Vaux et Strasser, 1996] : l'apoptose coïncide avec la libération de cytochrome C des mitochondries [Kessel et Luo,

1998], l'activation de caspases, le clivage de protéines cellulaires, la condensation de la chromatine et la fragmentation caractéristique de l'ADN qui s'effectue selon des stades bien ordonnés [Agarwal et al., 1991]. De plus, l'apoptose n'est pas accompagnée de phénomènes inflammatoires [Carson et Ribeiro, 1993]. Des désordres ioniques sont constatés, à savoir, une forte réduction des concentrations de sodium et surtout de potassium et par conséquent une diminution du volume cellulaire [Bortner et Cidlowski, 1998].

II.5.6.2 Nécrose

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

II.5.6.3 Constataion

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

Ceci a été en partie confirmé lors d'une étude qui utilisait deux photosensibilisateurs différents : d'une part, le SnOPA (*Tin octaethylpurpurin amidine*), composé ciblant préférentiellement les lysosomes, les mitochondries et les membranes cellulaires ; d'autre part, le SnET (*Tin etiopurpurin*) retrouvé dans les lysosomes et les mitochondries mais pas dans les membranes cellulaires. Au cours de ces travaux, une réponse apoptotique est observée lors de l'utilisation de SnET et une nécrose lors de l'utilisation de SnOPA. Il semblerait donc que les photosensibilisateurs localisés dans la membrane plasmique et entraînant sa destruction conduisent plus à une nécrose qu'à l'apoptose [Kessel et al., 1997]. En fait, l'apoptose serait un phénomène apparaissant suite aux réactions de photooxydation ; l'atteinte ultérieure des

membranes cellulaires stopperait l'apoptose qui laisserait place à la nécrose [Dellinger, 1996]. Ce serait donc plus l'action destructrice sur la membrane que la localisation du photosensibilisateur au niveau de celle-ci qui semble primordiale.

II.6 NOUVELLES APPLICATIONS DE LA PDT

La thérapie photodynamique trouve sa principale application dans le traitement de différents types de tumeurs ; ainsi, de nombreuses études et essais cliniques ont été réalisés dans ce domaine : traitement des cancers du poumon, de l'estomac, de la vessie, de l'œsophage [Dougherty, 1993]. Pour le cancer du poumon, certains préconisent une approche multimodale pour augmenter l'efficacité de la thérapie : PDT, radiothérapie et chimiothérapie [Ost, 2000]. D'autres ont constaté dans le cas de cancers récurrents du nasopharynx qu'une action combinée de la PDT et de la chimiothérapie semblait prolonger la survie de ces patients [Kulapaditharom et Boonkitticharoen, 1999]. La PDT s'est également avérée efficace dans le traitement de tumeurs bénignes de la peau ainsi que de cancers cutanés [Kalka et al., 2000]. Parallèlement à ces applications directes en oncologie, d'autres utilisations de la PDT ont vu le jour ; récemment la PDT a été utilisée pour atténuer et soulager les dysphagies dues à un cancer de l'œsophage inopérable [Moghissi et al., 2000].

Les applications de la PDT en dehors de la cancérologie se classent en deux types : les ablations de tissu et la modulation du comportement cellulaire [Levy et Obochi, 1996]. Concernant l'ablation de tissu, la PDT a été employée après une angioplastie transluminale pour prévenir la resténose [Overhaus et al., 2000] ou pour traiter l'athérosclérose [Fan et Miller, 1999]. La thérapie photodynamique est aussi aujourd'hui appliquée au traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) : la DMLA est la principale cause de cécité rencontrée chez les personnes de plus de 50 ans. Celle-ci apparaît suite à la formation de néovaisseaux autour de la rétine qui vont libérer du plasma et des hématies. La faible clairance de ces éléments au niveau de l'œil ainsi que le tissu cicatriciel formé et la fibrose développée autour de la rétine entraînent une diminution progressive de la vision [Lévy, 1999]. Pour ce traitement, un médicament, la Visudyne® (correspondant à la BPD-MA, Figure B-24) qui vient d'être récemment approuvé par la FDA, est injectée par voie intraveineuse au patient. L'activation par un laser entraîne l'altération des néovaisseaux sanguins et aboutit à leur thrombose.

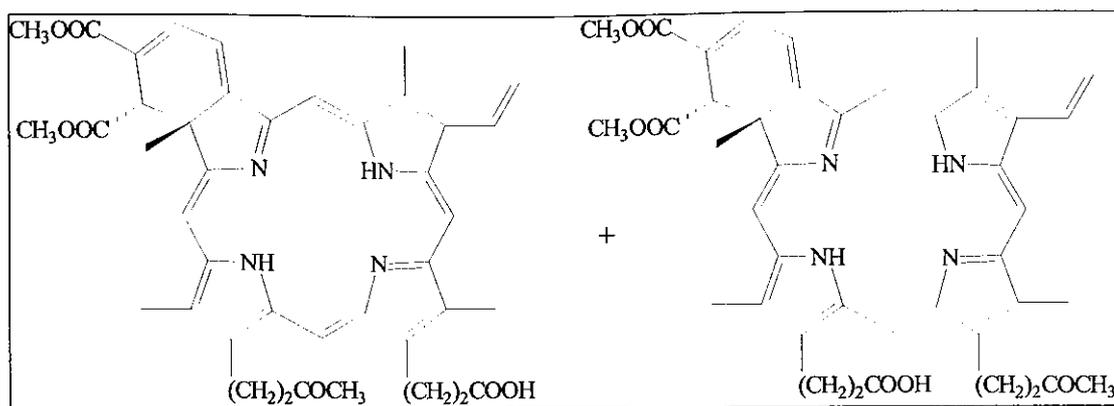


Figure B-24 : Structure de la Visudyne®

Toujours dans le domaine de l'ablation de tissu, la PDT est utilisée dans le cas des saignements dysfonctionnels utérins : l'ablation de l'endomètre par la PDT permet d'éviter l'hystérectomie [Levy et Obochi, 1996].

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

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

II.7 BILAN SUR LA PDT

La thérapie photodynamique anti-cancéreuse a pris un essor considérable depuis une dizaine d'années. Contrairement à la radiothérapie et à la chimiothérapie, les tumeurs traitées par PDT ne développent pas de résistance à cette thérapie. Les connaissances accumulées sur les mécanismes de transport et les mécanismes d'action du photosensibilisateur permettent d'orienter les recherches vers la synthèse de sensibilisateurs les plus efficaces possibles en atténuant le seul effet secondaire du traitement actuel avec le photofrin® : une photosensibilité rémanente extrêmement longue de la peau des patients.

Etant donné le nombre important de cancers différents, il ne peut pas exister de photosensibilisateur universel, aussi une recherche multidisciplinaire à l'interface Chimie-

Physique-Biologie est-elle indispensable pour la mise à jour de nouvelles molécules plus efficaces.

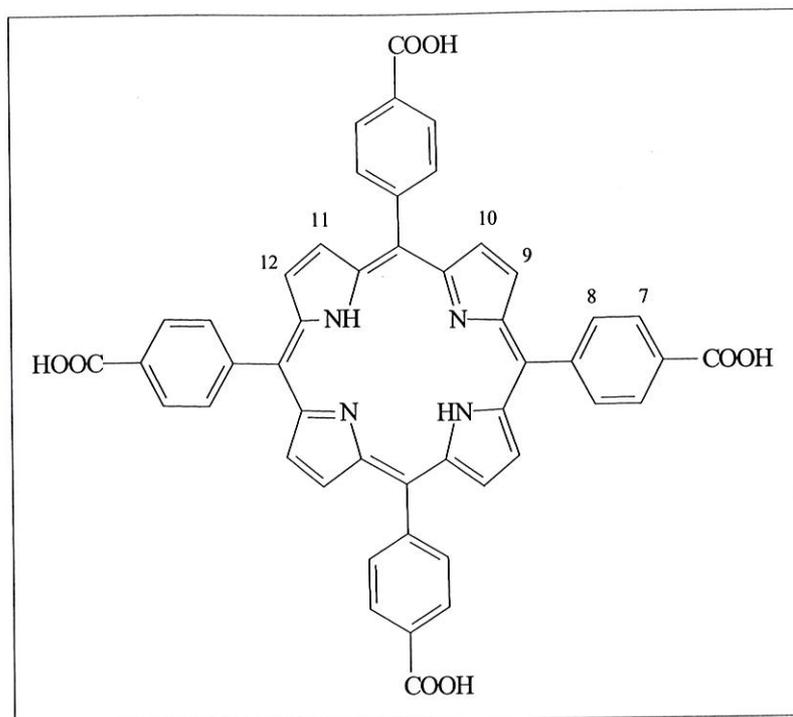
Au terme de cette présentation bibliographique, nous allons aborder le travail de synthèse réalisé au sein du DCPR-GRAPP ainsi que les premières études photophysiques, en concertation avec le Centre Alexis Vautrin.

plus

ynthèse

s, en

III SYNTHÈSE DES PORPHYRINES



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 790 \text{ g.mol}^{-1}$	$\text{C}_{48}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8$

RMN ^1H (DMSO, 200 MHz)

-2,94 (2H, m, -NH)

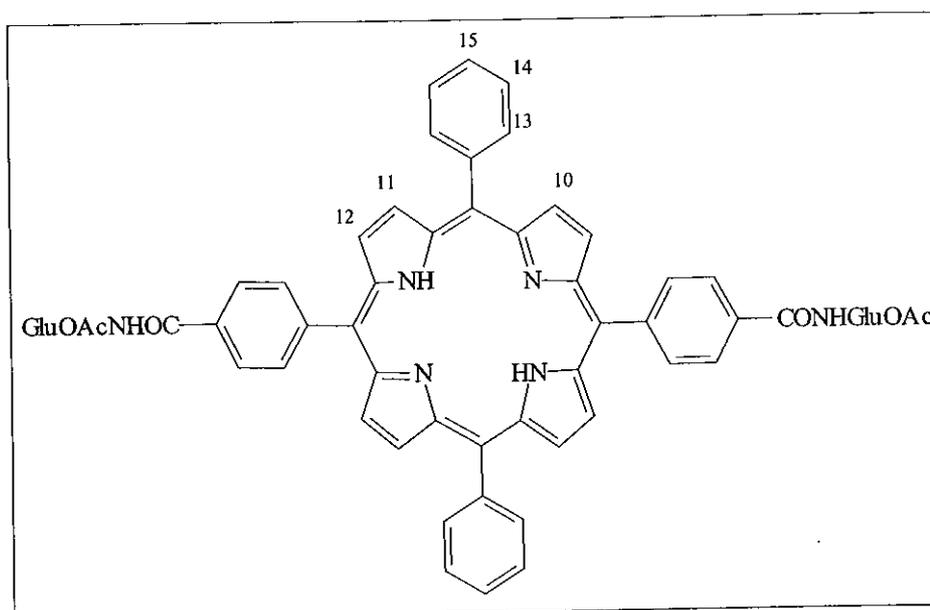
8,15-8,45 (16 H, - H_7 , - H_8)

8,87 (8H, s, - H_9 , - H_{10} , - H_{11} , - H_{12})

Les protons acide ne se voient pas

III.3.2.7 Synthèse de P2GluOAc

Dans un ballon de 250 mL, le dérivé dipyrrométhane glycosylé (2 mmol ; 1,192 g) et le benzaldéhyde (2 mmol ; 0,212 g) sont mis en solution dans 180 mL de CH_2Cl_2 . Le mélange est dégazé pendant 15 min puis le TFA est ajouté (0,2 mmol ; 50 μL). Après 4 h d'agitation à température ambiante, le DDQ (2 mmol ; 0,454 g) est ajouté à la solution, qui est maintenue sous agitation toute la nuit. La solution est alors concentrée et purifiée par colonne chromatographique (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ de 100/0 à 50/50, v/v) (0,136 g ; 0,1 mmol ; 10%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 1360 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{C}_{74}\text{H}_{68}\text{N}_6\text{O}_{20}$

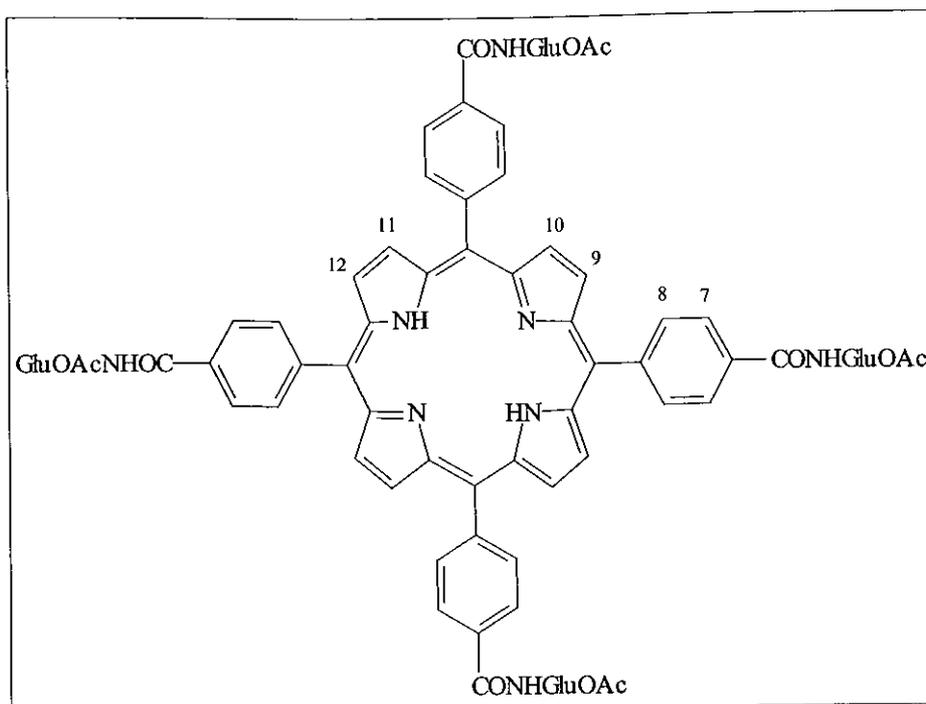
III.3.2.8 Synthèse de la P4GluOAc

III.3.2.8.1 Première méthode

Dans un ballon de 250 mL, le dérivé dipyrrométhane glycosylé (1 mmol ; 0,595 g) et le 4-(2-déoxy-2-carboxyamido-D-glucosamine-tétra-O-acétyl)benzaldéhyde (1 mmol ; 0,479 g) sont mis en solution dans 90 mL de CH_2Cl_2 . Le mélange est dégazé pendant 15 min puis le TFA est ajouté (0,1 mmol ; 50 μL). Après 4 h d'agitation à température ambiante, le DDQ (2 mmol ; 0,454 g) est ajouté à la solution, qui est maintenue sous agitation toute la nuit. La solution est alors concentrée et purifiée par colonne chromatographique (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ de 100/0 à 50/50, v/v) pour obtenir un produit cristallisé violet très foncé (0,210 g ; 0,1 mmol ; 10%).

III.3.2.8.2 Deuxième méthode

Dans un ballon de 50 mL, l'aldéhyde glycosylé (1 mmol ; 0,5 g), du pyrrole (1 mmol ; 100 μL) et 6 mL d'acide propionique sont chauffés à reflux pendant 3 h. La solution est alors évaporée, lavée avec Na_2CO_3 puis NaHCO_3 10%, et de l'eau. Pour retirer les polymères formés, la solution est alors mélangée pendant 30 min avec de la silice. Après filtration et plusieurs lavages de la silice avec du chloroforme, la solution restante est concentrée et séchée pour obtenir un produit cristallisé violet très foncé (0,63 g ; 0,3 mmol ; 30%).



Masse Molaire	Formule Brute
M= 2106 g.mol ⁻¹	C ₁₀₄ H ₁₀₆ N ₈ O ₄₀

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

Les protons des motifs glucosamine acétylée présentent les mêmes déplacements chimiques que ceux appartenant au dipyrrole glycosylé.

- 2,7 (2H, m, -NH)
- 7,32 (8H, d, -H₈) J = 8,1 Hz
- 7,85 (8H, d, -H₇) J = 8,1 Hz
- 8-9 (8H, m, -H₉, -H₁₀, -H₁₁, -H₁₂)

III.1 INTRODUCTION

III.1.1 Contexte de l'étude et stratégies de synthèse

Nous avons vu que la vectorisation du photosensibilisant était primordiale et notamment le réglage de la balance hydrophile/hydrophobe. En effet, le photosensibilisant doit être facile à administrer au patient (*via*, par exemple, une injection dans la circulation sanguine). Le sang étant un système aqueux, nous pourrions nous attendre à ce que les composés hydrophiles soient les plus adéquats. Toutefois, pour être efficace, le photosensibilisant doit pouvoir pénétrer préférentiellement dans les cellules cancéreuses et donc franchir la membrane lipidique, par conséquent, il doit être également hydrophobe. La question qui se pose alors est : comment produire une molécule qui soit à la fois hydrophile et hydrophobe ? L'évidence est bien entendu de construire une molécule qui soit amphiphile en introduisant des résidus polaires (acides aminés, sucres, nucléosides, etc.) et de régler alors judicieusement la balance hydrophile/hydrophobe.

L'étude des porphyrines glycosylées a pris une importance sans cesse croissante depuis quelques années en raison de son impact en PDT. Plusieurs travaux effectués ont montré que les porphyrines solubles dans l'eau tendent à se concentrer davantage dans les tumeurs que dans les tissus sains. Dans un premier temps, la recherche bibliographique nous a amené à synthétiser des composés glycosylés ayant le squelette de la protoporphyrine IX [Furhop et al., 1992] sur lequel seraient greffés des cycles glucosamine acétylée ou non. Très peu de publications relatent l'introduction de motifs sucre sur la protoporphyrine IX. L'intérêt réside dans le fait que la protoporphyrine IX est commerciale, possède deux groupements acides qui peuvent être fonctionnalisables par la glucosamine, en nous épargnant ainsi la synthèse totale de la porphyrine. Toutefois, les synthèses s'étant révélées infructueuses (en particulier les étapes de purification), nous avons décidé d'adopter une nouvelle stratégie en construisant totalement la porphyrine à partir de différents précurseurs. Nous allons présenter par la suite les différentes stratégies de synthèse adoptées.

III.1.2 Choix de la glucosamine

Dans notre étude, nous nous proposons de synthétiser des porphyrines portant un ou plusieurs motifs glucosamine. Comme nous l'avons déjà souligné dans la revue bibliographique, l'introduction de motifs sucre à caractère hydrophile entraîne plusieurs conséquences en faveur de l'efficacité de la PDT :

- Modification de la balance hydrophile-hydrophobe des composés qui influe sur le transport dans les cellules, les modes d'agrégation, les interactions membranaires, la solubilité dans l'eau, ... [Adams et al., 1992 ; Ono et al., 1992 ; Oulmi et al., 1995].
- Affinités de certains sucres pour les cellules malignes (récepteurs cellulaires spécifiques, ...) [Gaud et al., 1996].
- Modulation de la durée de vie plasmatique [Sylvain et al., 1999].

Par ailleurs, le DCPR-GRAPP, comme nous l'avons déjà mentionné dans la première partie de ce manuscrit, a depuis plusieurs années étudié des rotors moléculaires fluorescents possédant une fonction carboxylique permettant de les fonctionnaliser par l'intermédiaire d'une fonction ester ou mieux une fonction amide (les fonctions esters peuvent être clivées par les estérases des milieux biologiques). Ainsi, avec l'idée de localiser des traceurs au niveau membranaire, voire dans différents constituants de la cellule (sites de récepteurs, microdomaines, ...), des cycles fortement hydrophiles (glucosamine, inositol) ont été greffés sur différents rotors *via* cette fonction carboxylique [Carré et al., 1998 ; Viriot et al., 1998]]. La Figure B-25 indique à titre d'exemples, différentes structures de traceurs fluorescents comportant un motif sucre qui ont été synthétisés au laboratoire.

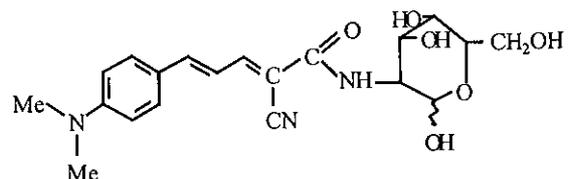
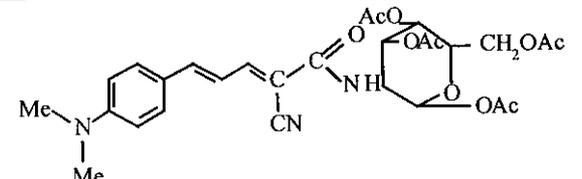
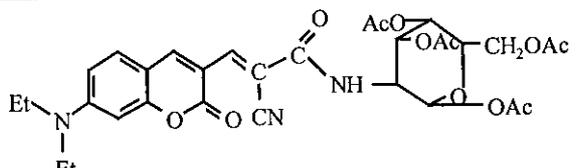
	<p>Rotor glucidique cinnamylidène (2)-CONHGluOH</p>
	<p>Rotor glucidique cinnamylidène acétylé (2)-CONHGluOAc</p>
	<p>Rotor glucidique coumarine acétylé CNCONHGluOAc</p>

Figure B-25 : Différents fluorophores glycosylés synthétisés au DCPR-GRAPP

Des études par microscopie de fluorescence ont montré que le traceur de type coumarine, portant un cycle glucosamine tétra O-acétylée (GluOAc) et incorporé dans des cellules endothéliales, se localisait dans le cytoplasme. Ceci n'est plus valable lorsque la glucosamine se trouve sous sa forme hydroxylée (GluOH), sûrement en raison d'une trop forte polarité qui ne lui permet pas de franchir la barrière lipidique de la membrane cellulaire [Geoffroy-Chapotot, 1998].

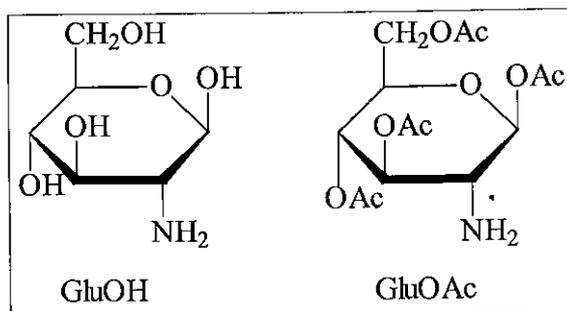


Figure B-26 : Structures de la glucosamine (GluOH) et de la glucosamine tétra O-acétylée (GluOAc)

III.2 ELABORATION DES PHOTOSENSIBILISANTS

III.2.1 Essais à partir de la protoporphyrine IX

Des synthèses de glycosylation de la protoporphyrine IX ont été réalisées par l'intermédiaire de liaisons éthers [Mikata et al., 1998], mais aussi *via* des liaisons amides qui sont plus stables en milieu biologique (Figure B-27). Très peu de publications relatent le greffage de motifs sucre sur la protoporphyrine IX. Dans un premier temps, il nous semblait judicieux de débiter des synthèses sur un produit déjà décrit dans la littérature [Furhop et al., 1992]. En effet, nous espérons ainsi "nous faire la main" et obtenir rapidement un produit qui de plus n'avait jamais été testé que ce soit d'un point de vue de sa photoactivité, de sa phototoxicité et de ses propriétés photophysiques (durée de vie de fluorescence, transfert d'énergie à l'oxygène singulet, longueurs d'onde d'absorption et d'émission).

Par la suite, nous pensons étudier l'influence d'un bras espaceur et envisager le couplage de cette molécule avec d'autres sucres comme par exemple le galactose.

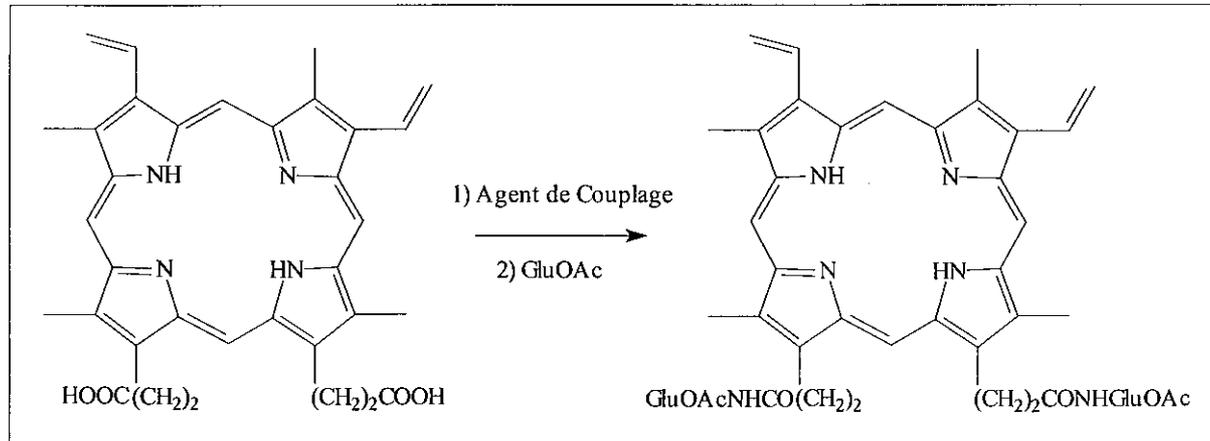


Figure B-27 : Schéma proposé pour le couplage de la glucosamine tétra O-acétylée (GluOAc) sur la protoporphyrine IX

Toutefois nos essais se sont révélés infructueux du fait, entre autres, des difficultés rencontrées pour purifier les produits. Nous avons tenté plusieurs méthodes de couplage qui sont réunies dans le Tableau B-4.

Méthodes de couplage	Sucre	Solvant	Résultats
<i>Anhydrides mixtes</i>			
Chloroformiate d'éthyle [Furhop et al., 1992]	GluOH	THF, H ₂ O, EtOH	Multitude de produits
Chloroformiate d'isobutyle	GluOH GluOAc	THF THF	Multitude de produits Séparation de la glucosamine ?
<i>Agents de couplage</i>			
EDCI	GluOH	H ₂ O	Pas de couplage
DCCI, HOBt	GluOAc	DMF	Multitude de produits
DCCI, HONSu	GluOAc	DMF	Multitude de produits

Tableau B-3 : Différentes voies de synthèse tentées pour atteindre la protoporphyrine IX glycosylée

La méthode de Furhop consiste à greffer la glucosamine sur la protoporphyrine IX, activée par le chloroformiate d'éthyle, puis de réaliser une réaction d'acétylation des fonctions hydroxyle de la glucosamine. Or, la glucosamine n'est soluble que dans l'eau, d'où les problèmes rencontrés. Nous avons obtenu un meilleur résultat en utilisant le chloroformiate d'isobutyle et la glucosamine déjà acétylée. Toutefois, les spectres ¹H RMN montrent qu'il reste encore beaucoup de glucosamine acétylée libre. En procédant à des analyses CCM dans différents mélanges de solvants, nous avons pu constater que la glucosamine acétylée migrerait toujours avec le photosensibilisant désiré et ce, quelle que soit la polarité de l'éluant. Par ailleurs, des études en CLHP, en phase inverse se sont révélées infructueuses. En effet, le produit commercial, correspondant à la protoporphyrine IX, présente déjà 4 pics. Il est donc difficile dans ces conditions d'attribuer l'un de ces pics au produit désiré. De plus, il nous est apparu impossible de séparer les produits même en réalisant des extractions en milieu acide. Ce phénomène s'explique certainement par le fait que la glucosamine est complètement intercalée "en sandwich" entre plusieurs molécules de protoporphyrine IX.

En ce qui concerne les autres méthodes de couplage classiques pour obtenir une liaison peptidique, nous n'avons pas réussi à isoler correctement un produit qui pourrait correspondre au composé attendu.

Au regard des difficultés rencontrées avec la protoporphyrine IX, nous avons choisi d'adopter une autre stratégie en réalisant une synthèse totale de porphyrines, que nous allons présenter dans le paragraphe suivant.

III.2.2 Synthèse totale des porphyrines

Dans un deuxième temps, nous avons choisi de réaliser une synthèse totale à partir d'un aldéhyde sur lequel il est possible de greffer facilement la glucosamine acétylée. Notre choix s'est porté sur le 4-carboxybenzaldéhyde commercial (Figure B-28) pour différentes raisons :

- la présence de la fonction acide carboxylique permet le greffage par liaison amide de la glucosamine acétylée,
- les groupements phényle permettent d'augmenter la lipophilie de la porphyrine,
- les groupements phényle et carboxylique permettent d'augmenter la conjugaison,
- le benzaldéhyde présente une bonne réactivité vis-à-vis du pyrrole.

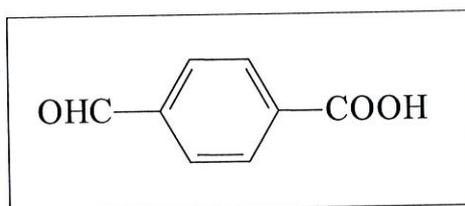


Figure B-28 : Structure du 4-carboxybenzaldéhyde

Nous avons synthétisé des molécules différentes possédant soit des fonctions acides (P4COOH et P2COOH) soit des cycles glycosylés (P2GluOAc et P4GluOAc).

III.2.2.1 Synthèse des porphyrines acides

Afin de comparer l'influence des groupements glycosylés, nous avons synthétisé dans un premier temps la *para*-5,10,15,20-(4-carboxyphényl)porphyrine (P4COOH) et la *para*-5,15-(4-carboxyphényl)-10,20-phénylporphyrine (P2COOH) qui serviront de témoin dans les tests biologiques. Ces produits ont été préparés en deux étapes selon le protocole de Lindsey [Lee et Lindsey, 1994]. La première étape consiste à réaliser la synthèse d'un dérivé dipyrrométhane obtenu par réaction du 4-carboxybenzaldéhyde sur le pyrrole en excès en utilisant de l'acide trifluoroacétique comme catalyseur. Les dérivés dipyrrométhane présentent l'avantage d'être stables et peuvent être conservés sans difficulté à froid et à l'abri de la lumière. La seconde étape conduit à la porphyrine désirée en mettant en présence deux équivalents de

5-(4-carboxyphényl)dipyrrométhane avec deux équivalents de benzaldéhyde ou deux équivalents de 4-carboxybenzaldéhyde selon le produit désiré (Figure B-29). Les deux composés P2COOH et P4COOH sont obtenus avec des rendements de 10%.

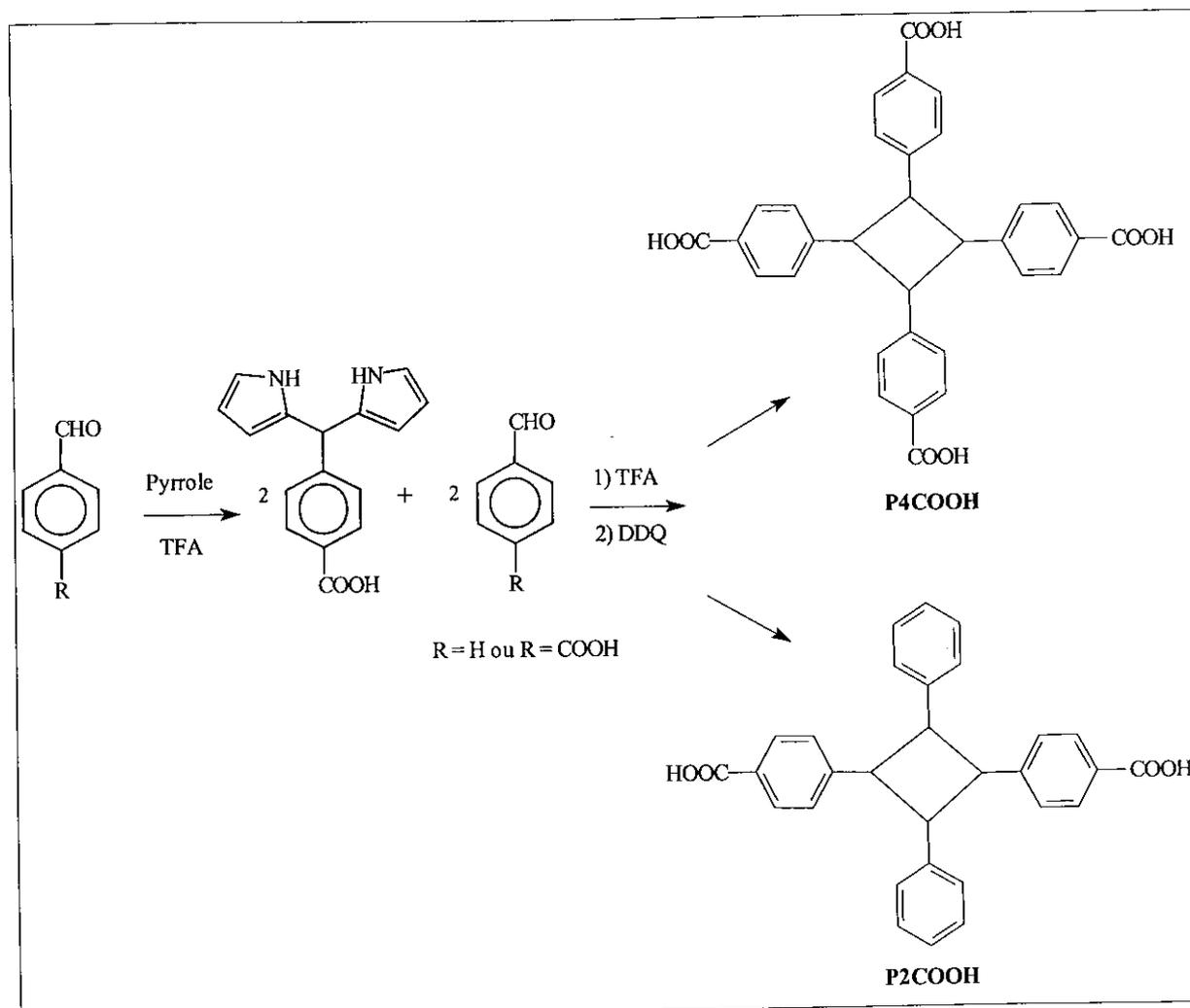


Figure B-29 : Synthèse des porphyrines acides P2COOH et P4COOH
(le cycle tétrapyrrolique est représenté par un carré)

En ce qui concerne la P4COOH, nous avons aussi testé un autre protocole de synthèse à partir de la méthode de Little [Little et al., 1975] qui consiste à mélanger un aldéhyde et du pyrrole à reflux dans de l'acide propionique (Figure B-30). Ce protocole de synthèse est plus facile à mettre en œuvre que la synthèse en deux étapes qui est décrite comme intéressante pour synthétiser des porphyrines comportant des motifs trans. Nous avons obtenu un rendement de l'ordre de 30% après plusieurs purifications.

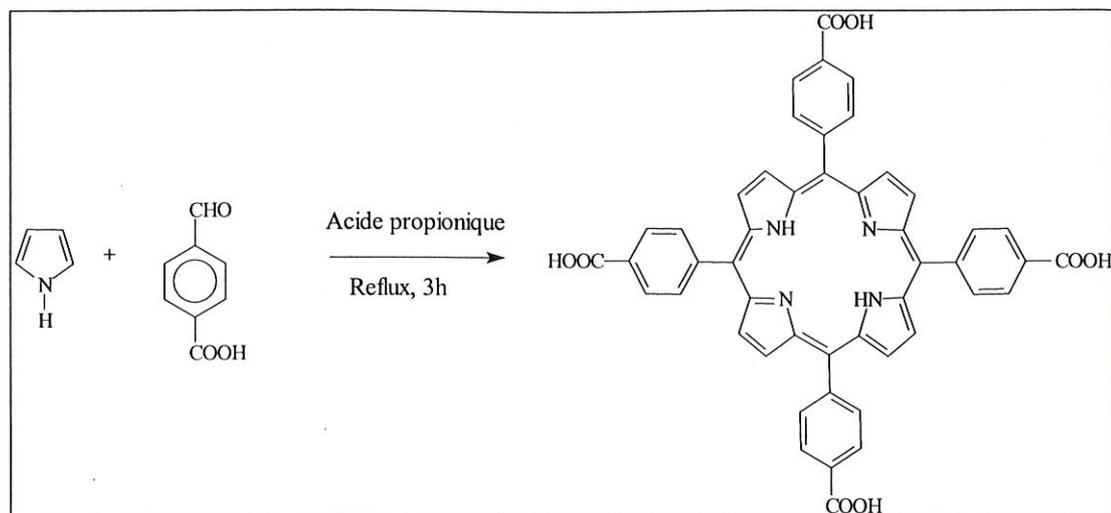


Figure B-30 : Synthèse de la porphyrine P4COOH par la méthode de Little [Little et al., 1975]

III.2.2.2 Synthèse des porphyrines glycosylées

III.2.2.2.1 Synthèse de la D-glucosamine tétra O-acétylée

La synthèse des porphyrines glycosylées est réalisée à partir de la D-glucosamine tétra O-acétylée. Il est nécessaire d'acétyle les fonctions hydroxyle de la D-glucosamine qui est trop polaire pour être utilisée directement (Figure B-31). Cette synthèse nécessite des étapes de protection et de déprotection de la fonction amine [Dardoize et al., 1989].

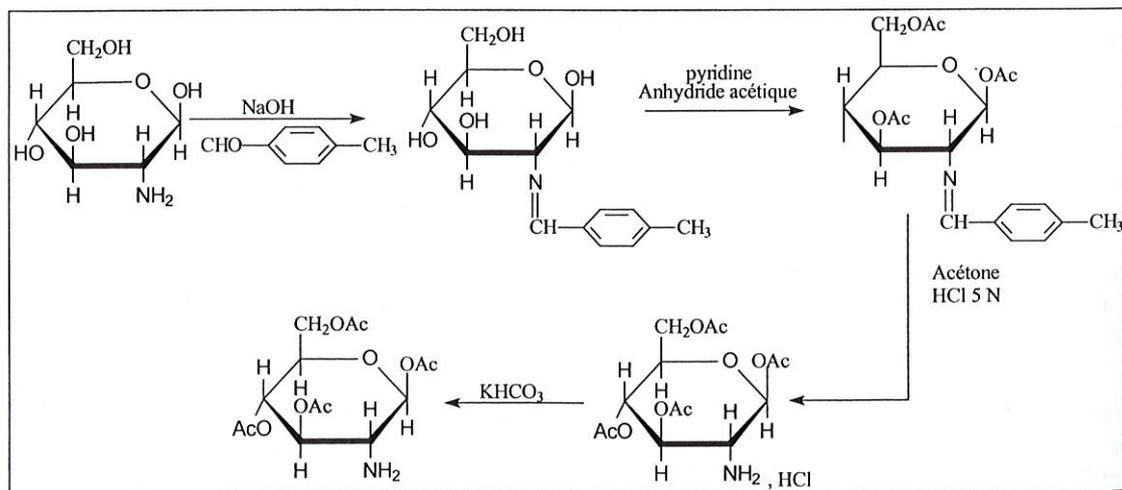


Figure B-31 : Synthèse de la D-glucosamine tétra O-acétylée

III.2.2.2.2 Condensation de la D-glucosamine tétra O-acétylée

Dans un premier temps, nous avons couplé la glucosamine acétylée sur la porphyrine P4COOH à l'aide d'agents de couplage (EDCI ou N-hydroxysuccinimide). Cette méthode conduit à un rendement en P4GluOAc de 5%. Le milieu réactionnel est un mélange de porphyrines mono, bi, tri et tétra fonctionnalisées avec en plus différents isomères, ce qui rend l'étape de purification très difficile. De la même manière que pour les porphyrines P4COOH et P2COOH, nous avons alors opté pour la méthode en deux étapes.

III.2.2.2.3 Synthèse du dérivé dipyrrole glycolysé

Comme précédemment, le dérivé dipyrrole (Figure B-32) est obtenu en condensant l'aldéhyde avec du pyrrole.

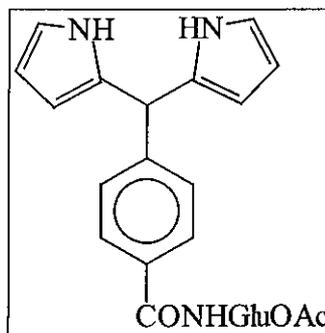


Figure B-32 : Dérivé dipyrrole glycosylé

Pour obtenir la demi-porphyrine attendue possédant le motif sucre, deux stratégies ont été envisagées (Figure B-33) :

- soit la glucosamine est d'abord greffée sur le 4-carboxybenzaldéhyde, qui réagit ensuite avec le pyrrole,
- soit la glucosamine est greffée sur le dipyrrole déjà formé à partir de 4-carboxybenzaldéhyde et de pyrrole.

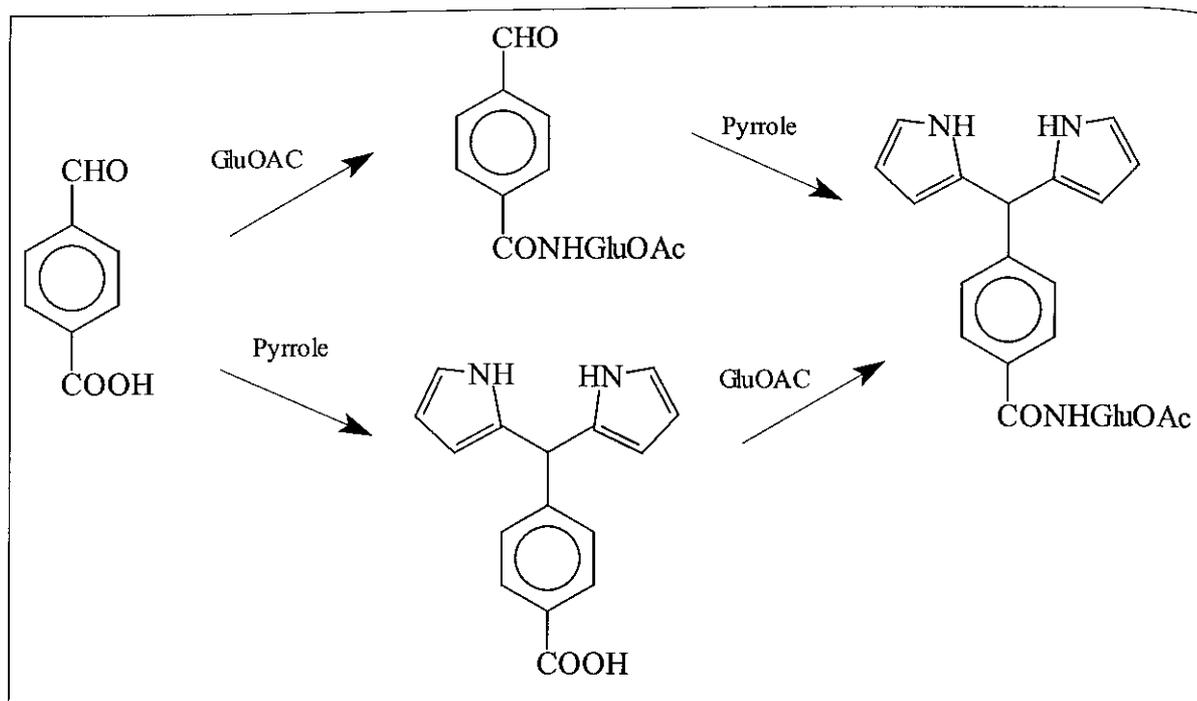


Figure B-33 : Deux voies de synthèse possibles pour obtenir le dérivé dipyrrole glycolysé

Nous avons réalisé les deux voies de synthèse décrites ci-dessus. Il est apparu plus efficace de condenser la glucosamine à l'aide d'agents de couplage (HOBt/DCCI) sur le 4-carboxybenzaldéhyde (le rendement est de 80% par rapport à l'aldéhyde) que sur le 5-(4-carboxyphényl)dipyrrométhane (dans ce cas le rendement de couplage est très médiocre : environ 5%). Il faut noter que la fonction aldéhyde réagit aussi avec l'amine pour former une imine. Nous avons donc utilisé deux équivalents de glucosamine acétylée conduisant au composé peracétylé ; la fonction aldéhyde est ensuite facilement restaurée par traitement à l'acide chlorhydrique dans l'acétone.

III.2.2.2.4 Synthèse des porphyrines P4GluOAc et P2GluOAc

De la même manière que pour les porphyrines P2COOH et P4COOH, nous avons réalisé leurs analogues glycosylés en réalisant une synthèse en deux étapes (Figure B-34). Les composés P2GluOAc et P4GluOAc ont été obtenus avec un rendement de l'ordre de 10%.

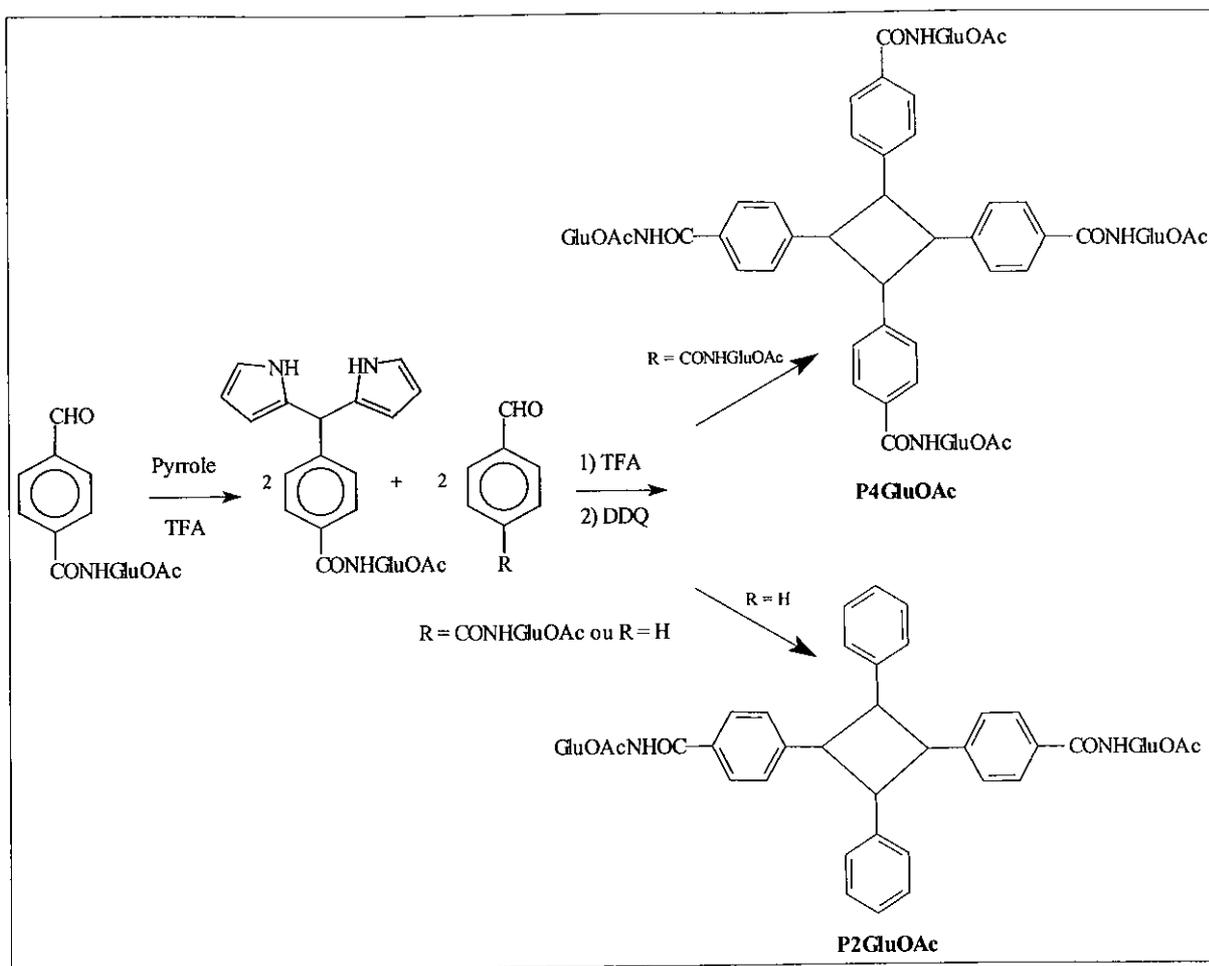


Figure B-34 : Synthèse des porphyrines P2GluOAc et P4GluOAc

Par ailleurs, de la même manière que pour la porphyrine P2COOH, nous avons réalisé une synthèse totale de la P4GluOAc selon les conditions de Little, en prenant l'aldéhyde comportant déjà le motif glucosamine acétylée, afin de pouvoir comparer les deux types de stratégies de synthèse. Nous avons obtenu un rendement de 30%.

III.2.3 Bilan des synthèses des porphyrines

Les résultats montrent que pour réaliser une porphyrine totalement symétrique, il est plus facile de réaliser une synthèse "one pot". En revanche, pour obtenir des porphyrines de configuration trans, la voie consistant à réaliser d'abord un dérivé dipyrrométhane est plus appropriée pour des raisons de purification. En ce qui concerne la porphyrine P4GluOAc, il est préférable de greffer la glucosamine acétylée sur le 4-carboxybenzaldéhyde précurseur.

En terme de conclusion, nous avons regroupé sur un schéma simplifié les différentes voies de synthèse réalisées pour aboutir aux composés ciblés (Figure B-35).

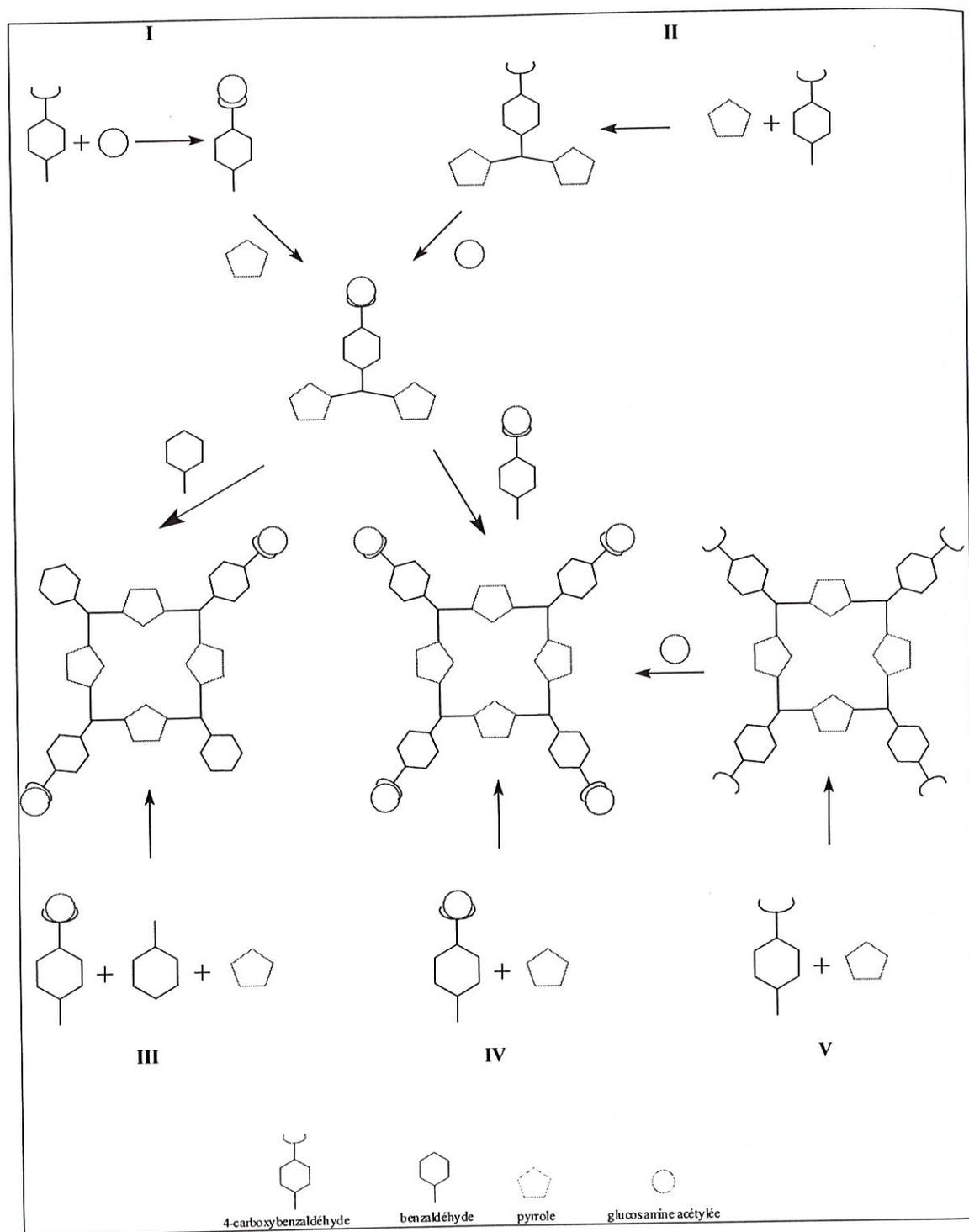


Figure B-35 : Schéma récapitulatif des différentes synthèses réalisées au DCPR-GRAPP

Pour obtenir, la porphyrine P4GluOAc, la voie IV est la plus appropriée (synthèse "one-pot"). Par contre, pour synthétiser la porphyrine P2GluOAc, la voie I, consistant à obtenir en premier un dérivé dipyrrolique glycosylé, est plus intéressante pour les raisons que nous venons d'évoquer.

III.3 PARTIE EXPERIMENTALE

III.3.1 Matériel et méthodes

Les méthodes sont similaires à celles décrites dans la première partie

Produits chimiques

Acide chlorhydrique	(Fluka, réf. 84 419)	$M = 36,50 \text{ g.mol}^{-1}$
Acide trifluoroacétique	(Sigma, réf. T-6508)	$M = 114 \text{ g.mol}^{-1}$
Anhydride acétique	(Aldrich, réf. 11,004-3)	$M = 102,09 \text{ g.mol}^{-1}$
Benzaldéhyde	(Aldrich, réf. 41,809-9)	$M = 106,12 \text{ g.mol}^{-1}$
4-Carboxybenzaldéhyde	(Fluka, réf. 21873)	$M = 150,14 \text{ g.mol}^{-1}$
Chlorhydrate de D-Glucosamine	(Aldrich, réf. 23046)	$M = 215,84 \text{ g.mol}^{-1}$
Hydrogénocarbonate de sodium	(Lancaster, réf. 13292)	$M = 84,01 \text{ g.mol}^{-1}$
1-Hydroxybenzotriazole	(Aldrich, réf. 9,775-4)	$M = 135,13 \text{ g.mol}^{-1}$
Pyrrole	(Aldrich, réf. 13,170-9)	$M = 67,09 \text{ g.mol}^{-1}$
Pyridine	(Aldrich, réf. 27,040-7)	$M = 84,14 \text{ g.mol}^{-1}$
<i>p</i> -Tolualdéhyde	(Aldrich, réf. T3, 560-2)	$M = 120,15 \text{ g.mol}^{-1}$

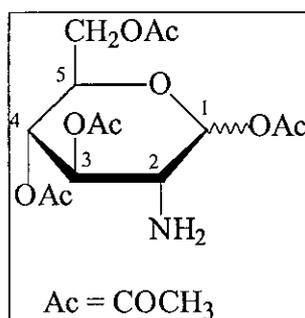
III.3.2 Description des synthèses

III.3.2.1 Synthèse de la glucosamine tétra O-acétylée

Au chlorhydrate de D-glucosamine (10,03 g ; 46,4 mmol) dissous dans une solution de NaOH 1 N (50 mL) et maintenu sous agitation à 20°C, est ajouté le *p*-tolualdéhyde (5,57 g ; 46,4 mmol ; 5,5 mL). Après 1 h d'agitation, le précipité obtenu est filtré, lavé successivement avec de l'eau froide, de l'éthanol, puis mis à sécher au dessiccateur sous vide pour conduire à l'imine N-(*p*-méthylbenzylidène)-D-glucosamine ($M = 281 \text{ g.mol}^{-1}$; 11,3 g ; 40,2 mmol ; 87%).

L'anhydride acétique en excès (9 éq. ; 310 mmol ; 29 mL) est ajouté goutte à goutte à la N-(*p*-méthylbenzylidène)-D-glucosamine (9,7 g ; 34,5 mmol) dissoute dans la pyridine (47 mL) maintenue sous agitation à 0°C et sous atmosphère d'azote. La réaction se poursuit sous agitation à 20°C pendant 24 h. Le milieu réactionnel est jeté sur de l'eau glacée, le précipité obtenu est filtré, lavé à l'eau et à l'éthanol, puis laissé une nuit au dessiccateur sous vide pour conduire à la N-(*p*-méthylbenzylidène)-tétra-O-acétyl-D-glucosamine ($M = 5,3 \text{ g}$; 11,8 mmol ; 34%).

De l'acide chlorhydrique 5 N (1 éq. ; 2,4 mL) est ajouté à une solution de N-(*p*-méthylbenzylidène)-tétra-O-acétyl-D-glucosamine (5,3 g ; 11,9 mmol) dans l'acétone (70 mL). Un précipité blanc rapidement formé est dissous dans l'eau. Après évaporation de l'acétone, l'aldéhyde indésirable est extrait au chlorure de méthylène. La phase aqueuse est ensuite neutralisée par du bicarbonate de sodium et extraite au chlorure de méthylène. La phase organique séchée sur sulfate de magnésium, filtrée et évaporée conduit à la tétra-O-acétyl-D-glucosamine (3,29 g ; 9,48 mmol ; 79%).



Masse Molaire	Formule Brute
M = 347 g.mol ⁻¹	C ₁₄ H ₂₁ NO ₉

Point de fusion : 138°C

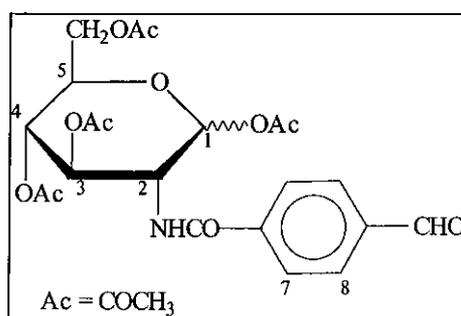
IR (KBr) : $\nu(\text{COCH}_3) = 1720 \text{ cm}^{-1}$

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,55 (2H, m, -NH ₂)	4,08 ; 4,33 (2H, m, -CH ₂ OAc)
2,05 ; 2,10 ; 2,13 ; 2,23 (12H, 4s, 4 -OCOCH ₃)	5,05 (2H, m, -H ₃ , -H ₄)
3,03 (1H, t, -H ₂), J = 9 Hz	5,46 (1H, d, -H ₁), J = 8,5 Hz
3,80 (1H, m, -H ₅)	

III.3.2.2 Synthèse du 4-carboxyamido-(2-déoxy-2-D-glucosamine-tétra-O-acétyl)benzaldéhyde

Dans un tricol de 100 mL, l'acide 4-carboxybenzaldéhyde (1 mmol ; 0,150 g) est dissous dans 10 mL de CH_2Cl_2 . A cette solution maintenue à 0°C sont ajoutés, *via* une ampoule à brome et sous atmosphère d'azote, successivement l'HOBt (1,2 mmol ; 0,162 g) en solution dans 4 mL de DMF, la DCCI (1,2 mmol ; 0,247 g) en solution dans 5 mL de CH_2Cl_2 . Le mélange est agité 2 h à température ambiante. La D-glucosamine tétra O-acétylée (2 mmol ; 0,694 g) dissoute dans 5 mL de CH_2Cl_2 est ajoutée au milieu réactionnel. Le mélange est agité pendant une nuit, filtré et évaporé sous pression réduite. Le résidu est mis en suspension dans 30 mL d'acétone puis de l'acide chlorhydrique 5 N (3 mL) est ajouté afin de débloquent l'imine. Le mélange est agité pendant 2 min, puis l'acétone est évaporée sous pression réduite. Le résidu obtenu est dissous dans 50 mL de CH_2Cl_2 , la phase organique est extraite 3 fois à l'acide chlorhydrique 1 N puis séchée sur MgSO_4 . Après filtration le solvant est évaporé sous pression réduite pour obtenir un produit cristallisé blanc (0,371 g ; 0,77 mmol ; 77%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 479 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{NO}_{11}$

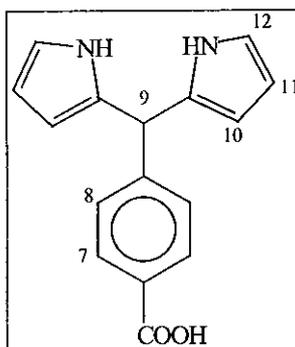
Point de fusion : 157°C

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

1,81-2,10 (12H, 4s, 4 - OCOCH_3)	5,84 (1H, d, - H_1), $J = 8,8 \text{ Hz}$
3,50 (1H, t, - H_2), $J = 8,8 \text{ Hz}$	6,35 (1H, s, - NHCO -)
3,86 (1H, m, - H_5)	7,86 (2H, d, - H_8), $J = 8,1 \text{ Hz}$
4,21-4,30 (2H, m, - CH_2OAc)	7,97 (2H, d, - H_7), $J = 8,1 \text{ Hz}$
5,28 (2H, m, - H_3 , - H_4)	10,1 (1 H, s, - CHO)

III.3.2.3 Synthèse du 5-(4-carboxyphényl)dipyrrométhane

Dans un ballon de 50 mL, le 4-carboxybenzaldéhyde (5 mmol ; 0,75 g) est mis en solution dans 15 mL de pyrrole fraîchement distillé. La solution est dégazée pendant 15 min, puis le TFA est ajouté (0,5 mmol ; 0,038 mL). Après 15 min d'agitation à température ambiante, la solution est diluée dans 10 mL de CH_2Cl_2 . Elle est ensuite lavée avec NaOH 0,1 N, concentrée par évaporation sous vide partiel, puis le pyrrole est distillé sous vide. La cristallisation dans AcOEt/éther de pétrole, 50/50, v/v conduit à un solide blanc (0,931 g ; 3,5 mmol ; 70 %).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 266 \text{ g.mol}^{-1}$	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$

Point de fusion : 250°C

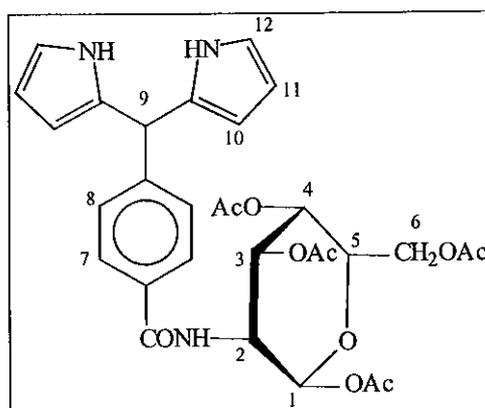
IR (KBr) : $\nu(\text{COOH}) = 1735 \text{ cm}^{-1}$
 $\nu(\text{COOH}) = 3460 \text{ cm}^{-1}$

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz)

5,57 (1H, s, - H_9)	7,35 (2H, d, - H_8), $J = 8,1 \text{ Hz}$
5,93 (2H, m, - H_{11})	8,00 (2H, bande large, -NH)
6,19 (2H, m, - H_{10})	8,06 (2H, d, - H_7), $J = 8,5 \text{ Hz}$
6,74 (2H, m, - H_{12})	

III.3.2.4 Synthèse du *méso*-(4-glucosamide tétra-O-acétyl-phényl)dipyrrométhane

Dans un ballon de 50 mL, le benzaldéhyde glycosylé (2 mmol ; 0,93 g) est mis en solution dans 15 mL de pyrrole fraîchement distillé. La solution est dégazée pendant 15 min, puis le TFA est ajouté (0,2 mmol ; 0,015 mL). Après 15 min d'agitation à température ambiante, la solution est diluée dans 10 mL de CH₂Cl₂. Elle est ensuite lavée avec NaOH 0,1 N, concentrée, puis le pyrrole est distillé sous vide. La cristallisation dans AcOEt/éther de pétrole, 50/50, v/v conduit à un solide blanc (0,834 g ; 1,4 mmol ; 70%).



Masse Molaire	Formule Brute
M= 595 g.mol ⁻¹	C ₃₀ H ₃₃ N ₃ O ₁₀

Point de fusion : 250°C

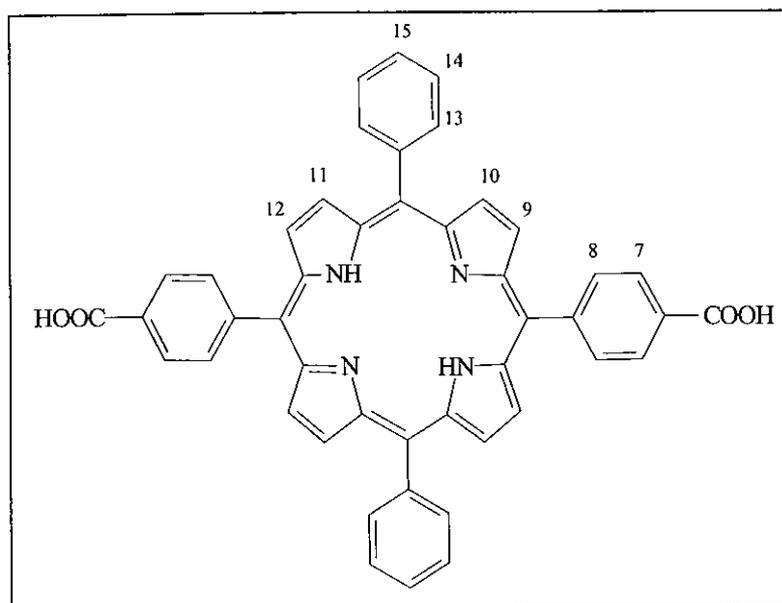
RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz)

1,81-2,00 (12H, 4s, 4 -OCOCH ₃)	5,60 1H, d, -H ₁), J = 8,5 Hz
3,27 (1H, t, -H ₂), J = 9 Hz	5,71 (2H, m, -H ₁₁)
3,65 (1H, m, -H ₅)	5,98 (2H, m, -H ₁₀)
4,00-4,09 (2H, m, -CH ₂ OAc)	7,10 (2H, d, -H ₈), J = 8,1 Hz
5,06 (2H, m, -H ₃ , -H ₄)	7,80 (2H, m, -NH)
5,33 (1H, s, -H ₉)	7,43 (2H, d, -H ₇), J = 8,5 Hz

NB : La numérotation est arbitraire (différente de celle de l'IUPAC) pour faciliter la description des spectres ¹H RMN.

III.3.2.5 Synthèse de la porphyrine P2COOH

Dans un ballon de 250 mL, le 5-(4-carboxyphényl)dipyrrométhane (2 mmol ; 0,532 g) et le benzaldéhyde (2 mmol ; 0,212 g) sont mis en solution dans 180 mL de CH_2Cl_2 . Le mélange est dégazé pendant 15 min puis le TFA est ajouté (0,2 mmol ; 50 μL). Après 4 h d'agitation à température ambiante, le DDQ (2 mmol ; 0,454 g) est ajouté à la solution, qui est maintenue sous agitation toute la nuit. La solution est alors concentrée et purifiée par colonne chromatographique (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ de 90/10 à 0/80, v/v) (0,14 g ; 0,1 mmol ; 10%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 702 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$	$\text{C}_{46}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4$

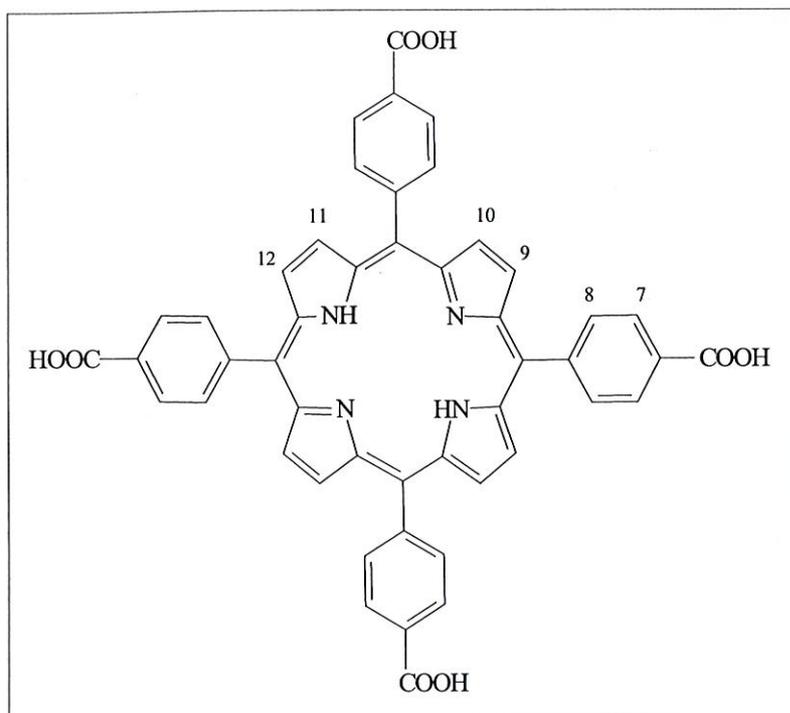
III.3.2.6 Synthèse de la porphyrine P4COOH

III.3.2.6.1 Première voie de synthèse

Dans un ballon de 250 mL, le dérivé 5-(4-carboxyphényl)dipyrrométhane (2 mmol ; 0,53 g) et le 4-carboxyphénylbenzaldéhyde (2 mmol ; 0,30 g) sont mis en solution dans 180 mL de CH_2Cl_2 . Le mélange est dégazé pendant 15 min puis le TFA est ajouté (0,02 mmol ; 50 μL). Après 4 h d'agitation à température ambiante, le DDQ (2 mmol ; 0,454 g) est ajouté à la solution, qui est maintenue sous agitation toute la nuit. La solution est alors concentrée et purifiée par colonne chromatographique (éluant $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ de 90/10 à 0/100, v/v) pour conduire à un composé cristallisé de couleur violet foncé (0,2 mmol ; 0,158 g ; 10%).

III.3.2.6.2 Deuxième voie de synthèse

Dans un ballon de 50 mL, le 4-carboxybenzaldéhyde (1 mmol ; 0,15 g), le pyrrole (1 mmol ; 100 μL) et 6 mL d'acide propionique sont chauffés à reflux pendant 3 h. La solution est alors évaporée, lavée avec Na_2CO_3 puis NaHCO_3 10%, et de l'eau. Pour éliminer les polymères formés, la solution est alors mélangée pendant 30 min avec de la silice. Après filtration et plusieurs lavages de la silice avec du chloroforme, la solution restante est concentrée et séchée pour conduire à un produit cristallisé rouge très foncé (0,277 g ; 0,35 mmol ; 35%).



Masse Molaire	Formule Brute
$M = 790 \text{ g.mol}^{-1}$	$\text{C}_{48}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_8$

RMN ^1H (DMSO, 200 MHz)

-2,94 (2H, m, -NH)

8,15-8,45 (16 H, - H_7 , - H_8)

8,87 (8H, s, - H_9 , - H_{10} , - H_{11} , - H_{12})

Les protons acide ne se voient pas

IV.1 OBJECTIF DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE

L'étude du comportement photophysique des photosensibilisants, synthétisés au cours de ce travail, a pour objectif de déterminer d'une part leurs propriétés d'absorption photonique et d'autre part leurs propriétés d'émission de fluorescence. Ces propriétés sont importantes à connaître en PDT puisque l'excitation des porphyrines, accumulées dans les cellules tumorales, est déterminée à partir de leur spectre d'absorption (qui s'étend dans le cas des porphyrines jusqu'à 650 nm) et l'émission de fluorescence permet, par microscopie de fluorescence, de diagnostiquer les tissus malades.

Dans cette étude photophysique, nous avons mis l'accent sur les deux porphyrines P4GluOAc et P4COOH (témoin permettant de rendre compte de l'influence des motifs glycosylés) qui vont être testées en priorité dans les milieux biologiques. L'étude comparative a été réalisée dans de l'éthanol et dans le milieu utilisé lors des tests biologiques sur les cellules, à savoir une solution aqueuse RPMI de sérum de veau fœtal (SVF) à 10%, contenant tous les éléments du sang sans les hématies, les globules blancs et les plaquettes. De plus, l'agrégation de ces composés en fonction de leur concentration a également fait l'objet d'une étude. Cette notion d'agrégation est importante puisqu'elle modifie les propriétés photophysiques des porphyrines [Furhop et al., 1992 ; Gaud et al., 1996]. Par ailleurs, des études ont montré que la formation d'agrégats entraîne une diminution du rendement quantique de formation de l'oxygène singulet [Zenkevich et al., 1996] et par conséquent une perte d'efficacité au regard de la toxicité.

IV.2 MATERIEL ET METHODES

IV.2.1 Matériel

Les produits utilisés sont les porphyrines P4GluOAc et P4COOH issues des synthèses décrites dans le chapitre précédent. Les concentrations sont données en $\mu\text{g/mL}$ qui est l'unité couramment utilisée pour les tests biologiques.

Les solvants utilisés pour l'étude photophysique sont :

- l'éthanol absolu (SDS, réf. 013A27) de qualité spectrosol,

- la solution RPMI, 10% SVF, fourni gracieusement par le Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre.

IV.2.2 Méthodes

Les méthodes sont celles décrites dans la première partie.

IV.3 SPECTROSCOPIE UV-VISIBLE

Les spectres obtenus pour les composés P4GluOAc et P4COOH sont caractéristiques des porphyrines puisque nous retrouvons une bande de Soret intense vers 400 nm et les quatre bandes Q de longueur d'onde comprise entre 480 et 700 nm d'intensité plus faible (Figures B-36 et B-37 respectivement). Les deux porphyrines (P4GluOAc et P4COOH) sont de type *étio* (l'intensité des quatre bandes Q diminue lorsque la longueur d'onde augmente). Nous pouvons constater que les spectres des deux composés sont peu différents pour un même solvant et donc que les longueurs d'absorption maximales ne sont pas modifiées par les cycles glucosamine couplés aux fonctions acides.

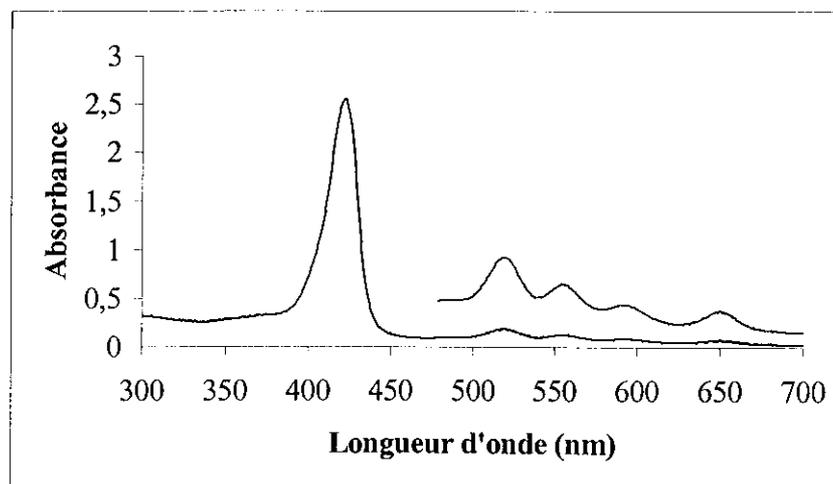


Figure B-36 : Spectre d'absorption à 25°C de la P4GluOAc dans l'éthanol à 10 µg/mL

(La zone située entre 480 et 700 nm a été agrandie 5 fois)

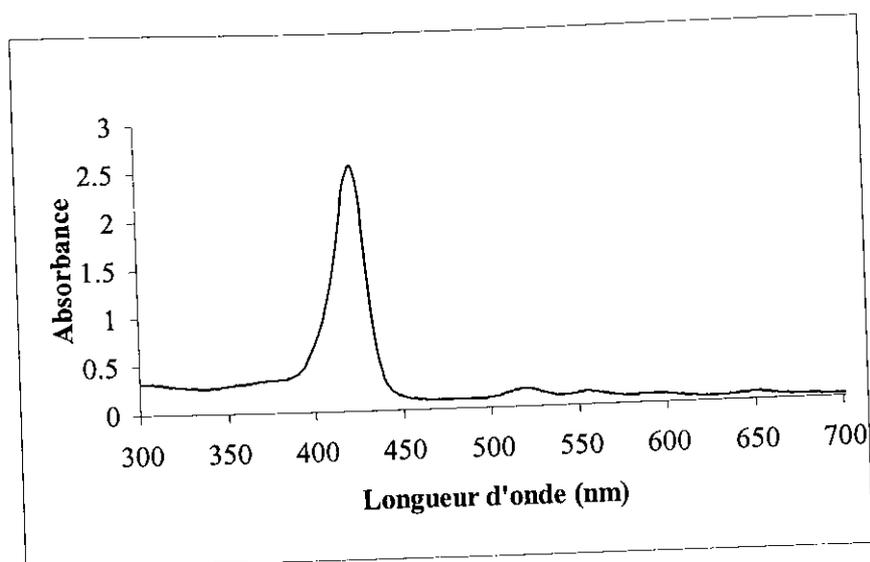


Figure B-37 : Spectre d'absorption à 25°C de la P4COOH dans l'éthanol à 10 µg/mL

Les maxima d'absorption des bandes de Soret et de la bande Q1, correspondant à la bande située à la plus grande longueur d'onde, ainsi que les coefficients d'extinction molaire correspondants sont résumés dans le Tableau B-4 ci-dessous.

Composé	Solvant	Bande de Soret		Bande Q1	
		λ_s (nm)	ϵ ($\times 10^5$) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)	λ_{Q1} (nm)	ϵ ($\times 10^3$) (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
P4GluOAc	Ethanol	417	2,73	647	8,33
	SVF	422	2,18	650	2,94
P4COOH	Ethanol	417	2,63	647	6,66
	SVF	422	2,27	650	2,94
P4GluOH [Csik et al., 1998]	Méthanol	415,5	4,07	648	6,91
	Tampon phosphate	416	1,27	649	2,80

Tableau B-4 : Propriétés d'absorption des porphyrines P4GluOAc, P4COOH et P4GluOH

D'après ces données, nous pouvons remarquer que les coefficients d'extinction molaire dans l'éthanol sont affectés par la nature des substituants glycosylés, en effet, la P4GluOAc présente

des valeurs de coefficient d'extinction molaire légèrement plus élevées que celles de la P4COOH, notamment en ce qui concerne la bande Q1.

En milieu aqueux et pour chaque composé, les coefficients d'extinction molaire diminuent et la position des maxima est légèrement décalée vers le rouge. Ceci est en accord avec les données de la littérature [Zenkevich et al., 1996]. Par comparaison, nous avons indiqué les valeurs obtenues avec une *para*-tétraphénylporphyrine glycosylée et non acétylée (P4GluOH) [Csik et al., 1998]. De plus, les liaisons reliant les motifs glucosamine aux cycles benzéniques sont de type éther, alors que dans notre cas elles sont de type amide. Cette différence est très importante dans le sens où les liaisons amide sont en général plus résistantes aux hydrolyses enzymatiques et des liaisons hydrogène peuvent se former entre un proton amide et le groupe acyle d'une autre molécule.

IV.4 SPECTROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Les composés P4GluOAc et P4COOH présentent des spectres de fluorescence qui s'étendent dans le rouge de 630 à 750 nm, ce qui était prévisible pour ce type de structure. Les spectres présentent deux maxima à 650 et 720 nm, obtenus quelle que soit la longueur d'onde d'excitation. Dans notre étude, les composés ont tous été excités à 440 nm (Figures B-38 et B-39) (absorbance < 0,2).

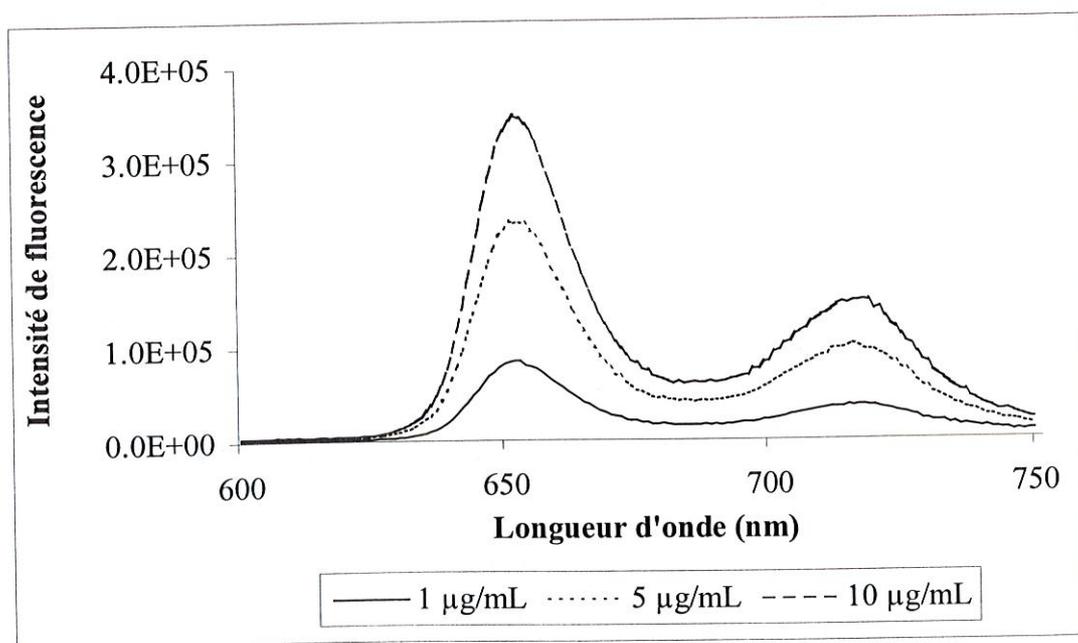


Figure B-38 : Spectres d'émission de fluorescence de la P4GluOAc dans l'éthanol à des concentrations différentes ($\lambda_{exc} = 440$ nm)

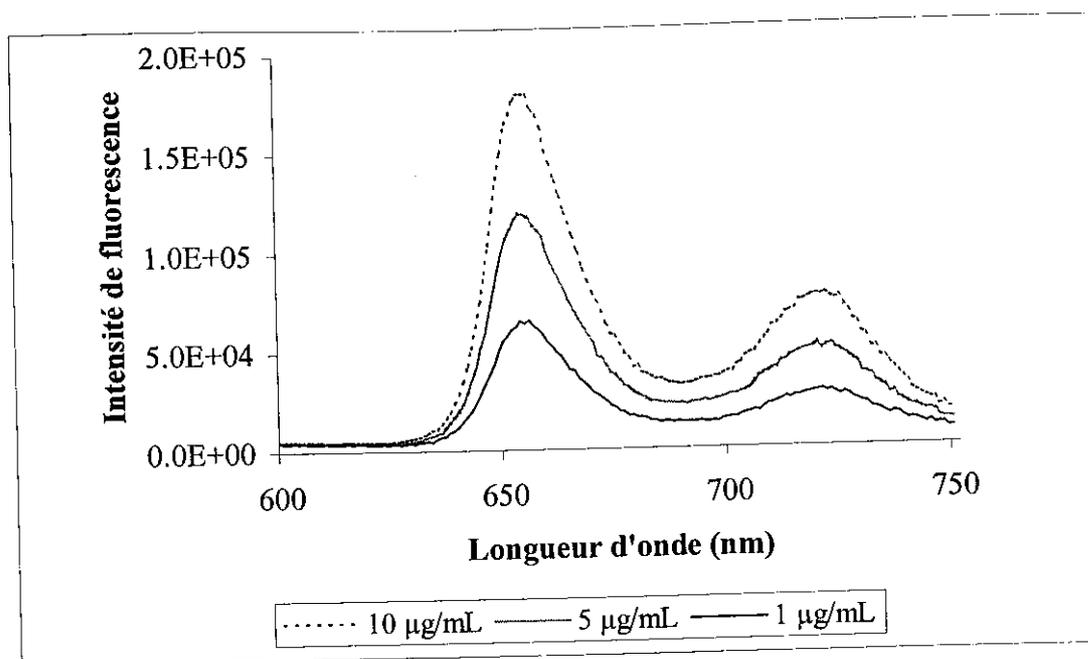


Figure B-39 : Spectres d'émission de fluorescence de la P4GluOAc dans le SVF à différentes concentrations ($\lambda_{exc} = 440 \text{ nm}$)

Des spectres similaires sont obtenus avec la porphyrine P4COOH (Annexe B4).

Les rendements quantiques de fluorescence des porphyrines dans l'éthanol ont été calculés en utilisant comme référence la rhodamine B, dont le rendement quantique de fluorescence dans l'éthanol est de $\phi_f = 0,69$. L'efficacité quantique de fluorescence est faible pour ce type de composé et généralement ne dépasse pas les 10% [Figueiredo et al., 1999].

Nous avons réuni les résultats dans le Tableau B-5 suivant.

Porphyrine	Solvant	λ_{max1} (nm)	λ_{max2} (nm)	ϕ_f
P4GluOAc	Ethanol	653	717	0,11
	SVF	657	721	
P4COOH	Ethanol	653	716	0,05
	SVF	659	723	
P4GluOH [Csik et al., 1998]	Méthanol	649	nd	0,07
	Tampon phosphate	655	nd	

Tableau B-5 : Caractéristiques d'émission de fluorescence à 25°C des porphyrines P4GluOAc, P4COOH et P4GluOH dans l'éthanol et dans le SVF

Nous pouvons remarquer un léger déplacement de la longueur d'onde vers le rouge lorsque les spectres sont réalisés en milieu aqueux (donc en milieu plus polaire) par comparaison avec l'éthanol. Ce résultat est en accord avec ceux décrits dans la littérature [Csik et al., 1998 ; Sol et al., 1999].

IV.5 ETUDE DE L'AGREGATION DES PORPHYRINES

Les propriétés des porphyrines dans les solvants et les milieux biologiques varient suivant leur état d'agrégation qui dépend de la concentration et du milieu. Par ailleurs, certaines porphyrines, comme la protoporphyrine, ne pénètrent pas dans les cellules cancéreuses si elles sont sous forme d'agrégats [Moan, 1986].

Il nous est donc apparu intéressant d'évaluer le comportement agrégatif des porphyrines P4GluOAc et P4COOH. Des travaux similaires ont été effectués par Csik et al., 1998 avec des porphyrines possédant 4 motifs glucosamine non acétylée dans des solvants de type tampon phosphate et méthanol.

IV.5.1 Mise en évidence du phénomène d'agrégation

IV.5.1.1 Spectres d'excitation

En réalisant les spectres d'excitation des deux composés, nous avons obtenu des spectres possédant l'allure du spectre d'absorption UV (ce qui permet de vérifier aussi la pureté des produits) mais présentant un dédoublement de la bande de Soret avec l'augmentation de la concentration (Figure B-40 et Annexe B-4).

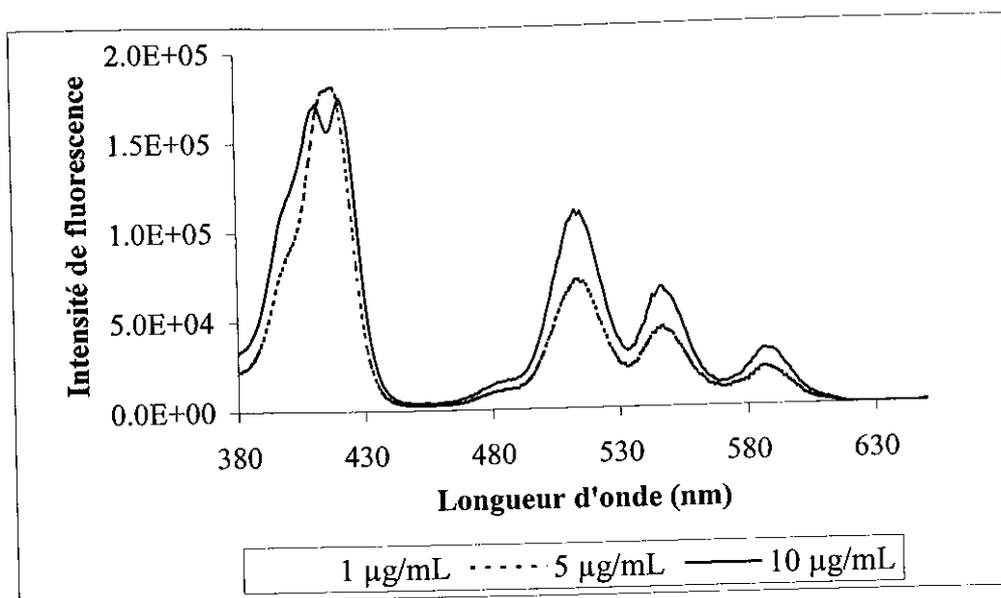


Figure B-40 : Spectres d'excitation (émission à $\lambda = 650$ nm) de la P4GluOAc dans le SVF pour trois concentrations différentes

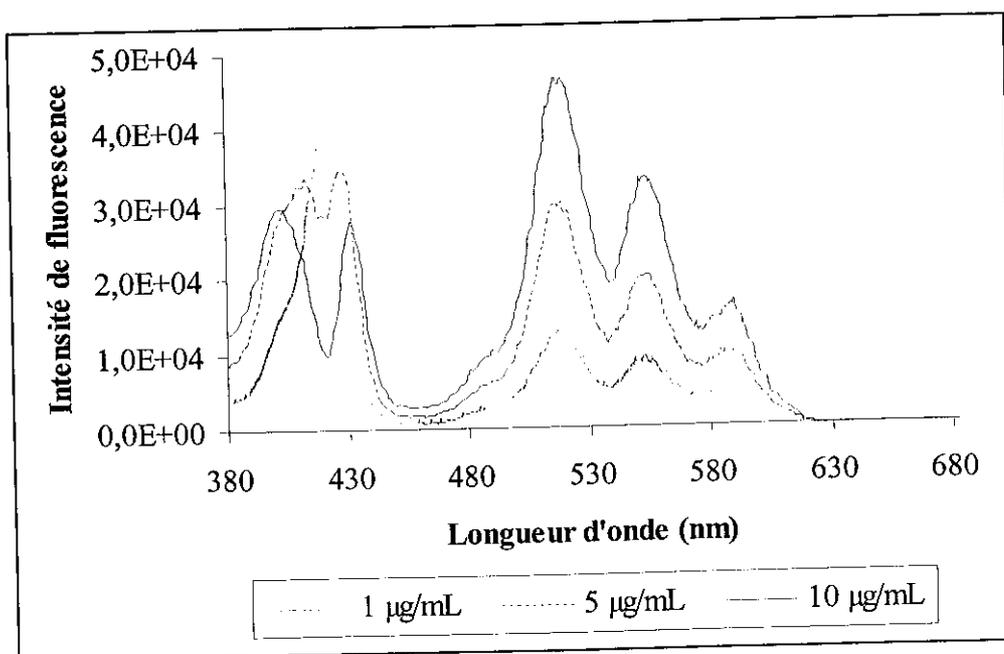


Figure B-41 : Spectres d'excitation (émission à $\lambda = 650$ nm) de la P4COOH dans le SVF pour trois concentrations différentes

Pour de faibles concentrations et quel que soit le solvant, nous observons que ce spectre en excitation correspond bien au spectre UV ; en revanche, pour les concentrations plus importantes (5 $\mu\text{g/mL}$ et 10 $\mu\text{g/mL}$) le dédoublement de la bande de Soret indique qu'un phénomène se déroule lorsque les porphyrines sont plus concentrées. Ce phénomène est interprété comme de la dimérisation. En effet, la formation des dimères entraîne une

modification des transitions électroniques, ce qui expliquerait le dédoublement de la bande de Soret lors de l'excitation [Csik et al., 1998 ; Sol et al., 1998].

IV.5.1.2 Spectres d'absorption UV-Visible

L'agrégation des deux composés P4COOH et P4GluOAc a été étudiée dans une gamme de concentration allant de 0 à 5 μM pour la P4GluOAc et de 0 à 10 μM pour la P4COOH.

Les figures ci-après (Figures B-42 et B-43) représentent la densité optique des deux porphyrines à 430 nm, en fonction de la concentration. Nous pouvons observer dans tous les cas une déviation négative de la loi de Beer-Lambert lorsque les concentrations deviennent plus importantes. Ceci indique également une agrégation des composés (cette perte de linéarité ne peut être attribuée à l'effet de peau, compte tenu des faibles valeurs en absorbance). En revanche, ces concentrations semblent varier selon le composé et le solvant d'étude. Pour chaque porphyrine, la linéarité est conservée à des concentrations plus élevées dans l'éthanol que dans le SVF. Les limites de linéarité observée sont indiquées dans le Tableau B-6 suivant :

Composé	Solvant	Limite de linéarité	
		$\mu\text{mol.L}^{-1}$	$\mu\text{g/mL}$
P4COOH	Ethanol	9	7,1
	SVF	4,5	3,6
P4GluOAc	Ethanol	3,5	7,4
	SVF	< 2	< 4,2

Tableau B-6 : Limite de linéarité des courbes d'absorbance pour les 2 porphyrines dans l'éthanol et dans le SVF

Pour comparaison, les concentrations 1, 5 et 10 $\mu\text{g/mL}$ correspondent respectivement à des concentrations de 0,5, 2,4 et 4,7 μM pour la P4GluOAc et de 1,3, 6,3 et 12,6 μM pour la P4COOH.

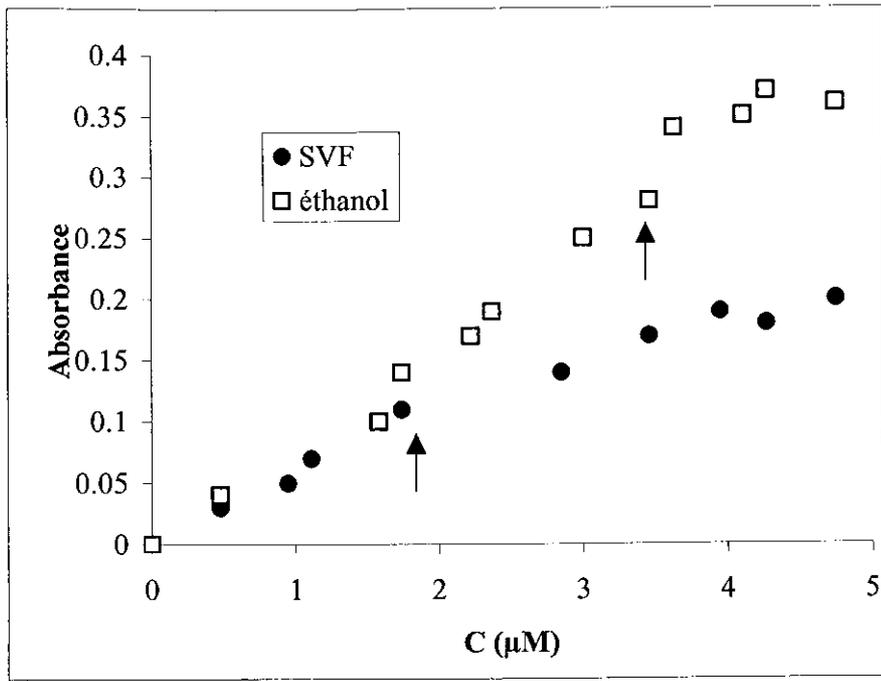


Figure B-42 : Etude de l'absorbance de la P4GluOAc en fonction de la concentration dans l'éthanol et le SVF

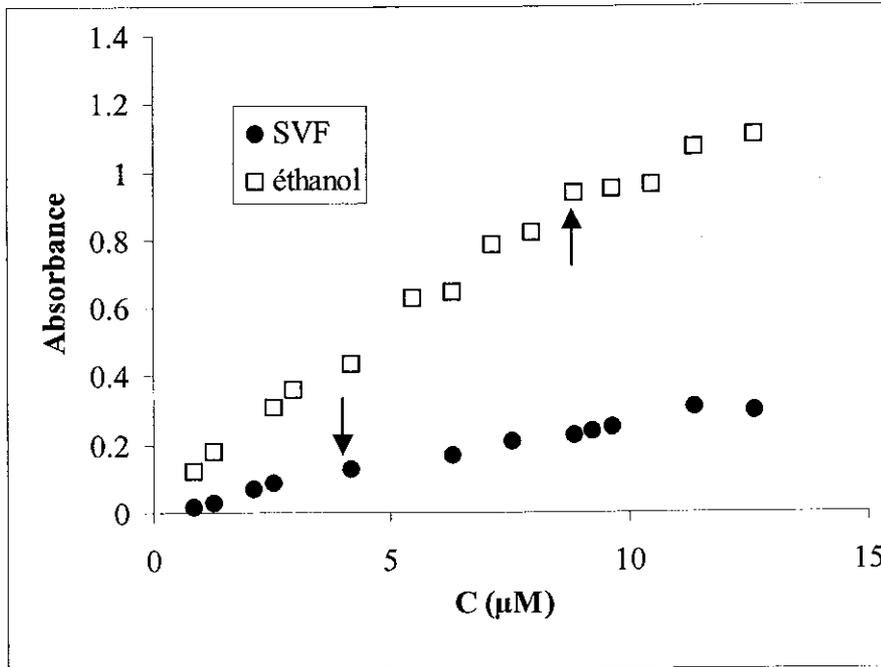


Figure B-43 : Etude de l'absorbance de la P4COOH en fonction de la concentration dans l'éthanol et le SVF

IV.5.1.3 Etude de l'émission de fluorescence en fonction de la concentration

Nous avons réalisé des spectres de fluorescence en fonction de la concentration pour les deux porphyrines. D'après ces spectres, dès les faibles concentrations, nous pouvons remarquer une perte de linéarité de l'intensité de fluorescence (à 650 nm) en fonction de la concentration, pour les deux composés d'autant plus marquée en milieux aqueux pour la P4GluOAc et pour la P4COOH (Figures B-44 et B-45). Ces résultats sont en accord avec les observations faites lors de l'étude de la concentration en fonction de l'absorbance. Cependant, pour déterminer avec précision la concentration critique à partir de laquelle une perte de linéarité est observée, des mesures plus nombreuses doivent être effectuées, en particulier aux faibles concentrations.

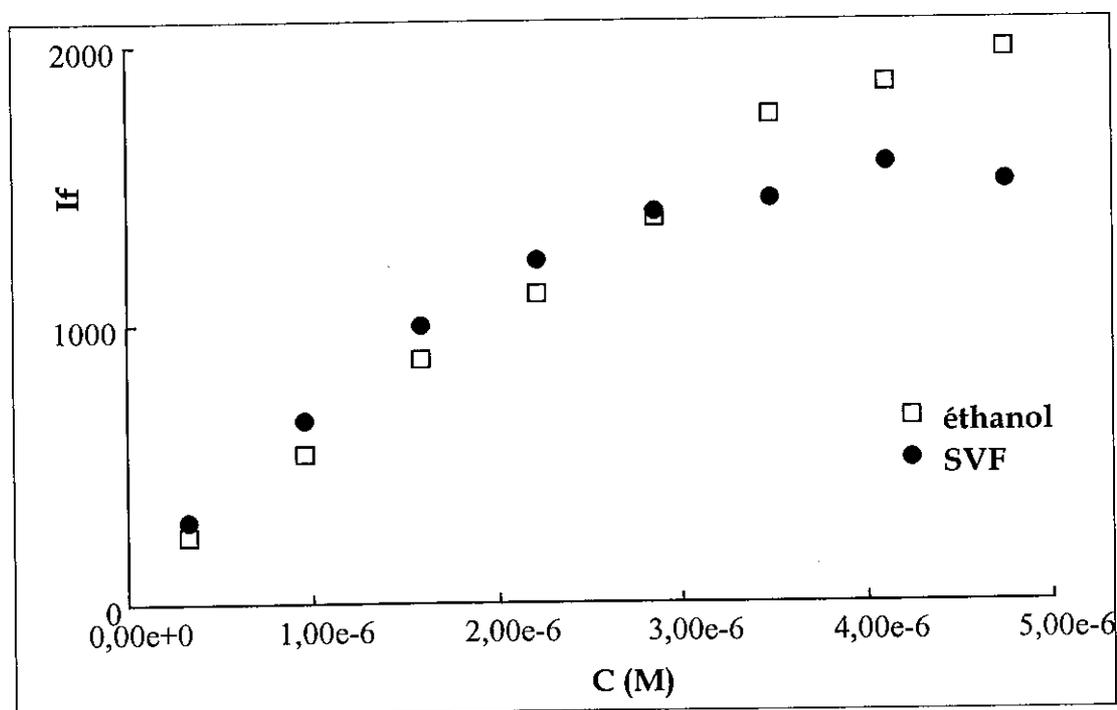


Figure B-44 : Courbes d'intensité de fluorescence à 650 nm en fonction de la concentration pour P4GluOAc dans l'éthanol et le SVF

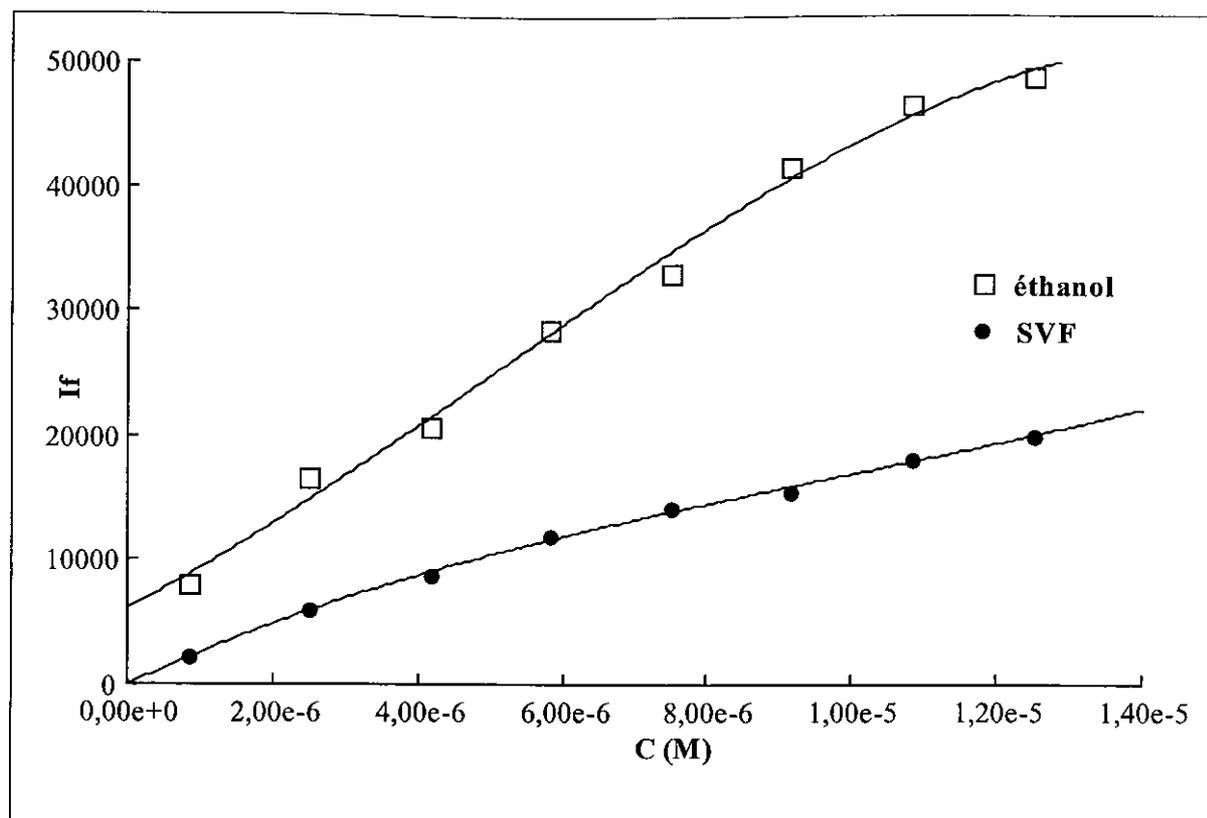


Figure B-45 : Courbes d'intensité de fluorescence à 650 nm en fonction de la concentration pour P4COOH dans l'éthanol et le SVF

Toutes ces données concordent si nous supposons que les porphyrines forment très souvent des agrégats et *a priori* des dimères, même à des concentrations très faibles. Une méthode permet, par le calcul, de déterminer les constantes de dimérisation en admettant que la dimérisation est la première étape d'agrégation et que seul le monomère émet une fluorescence [Margalit et al., 1983]

IV.5.2 Constante de dimérisation

Les constantes d'équilibre de dimérisation ont été déterminées par Margalit [Margalit et al., 1983] en considérant l'équation suivante :

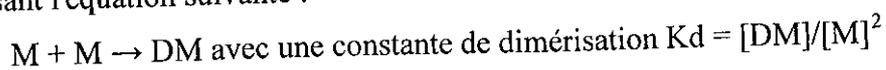
$$[P] = [M] + 2[DM]$$

P : porphyrine totale

M : monomère

DM : dimère

En posant l'équation suivante :



Nous pouvons écrire :

$$[P] = [M] + 2K_d[M]^2$$

En substituant la concentration de monomère par kF , où k est un coefficient de proportionnalité et F l'intensité de fluorescence, et en faisant l'hypothèse que le dimère n'est pas fluorescent, nous obtenons alors :

$$[P]/F = k + 2k^2K_dF$$

En traçant $[P]/F$ en fonction de F , nous obtenons une droite d'ordonnée à l'origine k et de pente $2k^2K_d$, ce qui permet de déterminer la constante d'équilibre de dimérisation K_d . Nous avons choisi pour F l'intensité de fluorescence I_1 (maximum de l'intensité de fluorescence vers 650 nm). Nous avons au préalable vérifié que les intensités I_1 et I_2 sont proportionnelles quel que soit le solvant (Figure B-46).

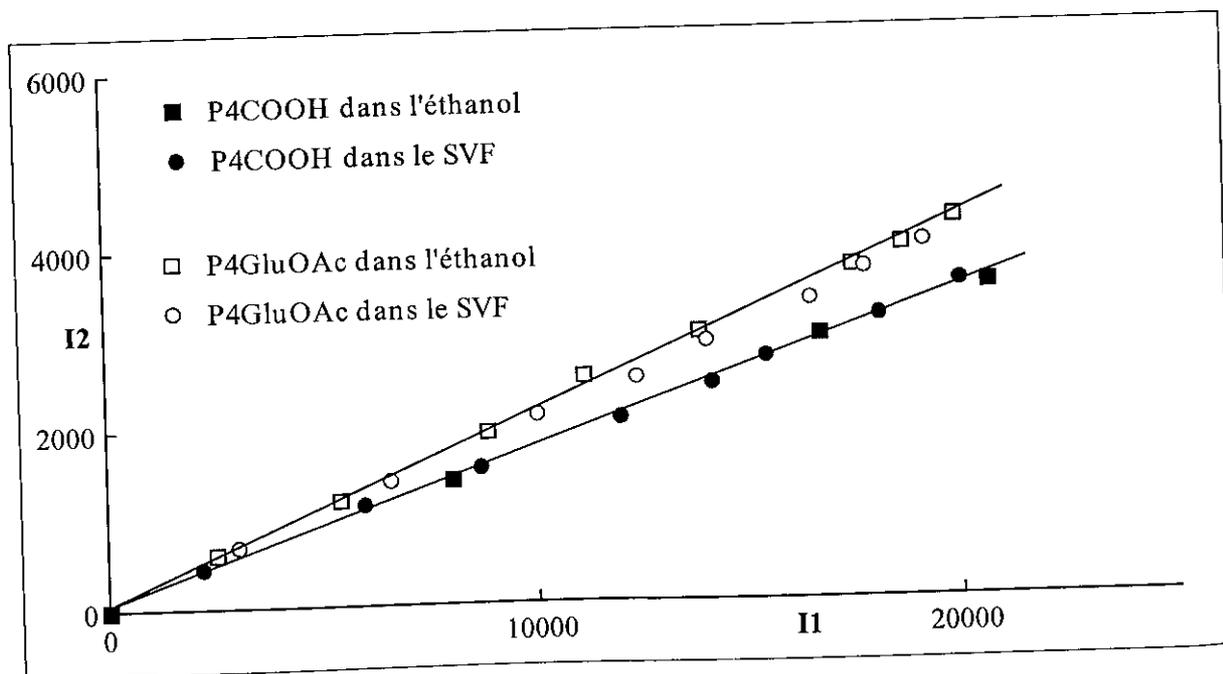


Figure B-46 : Variation du maximum de fluorescence à 720 nm (I_2) en fonction du maximum de fluorescence à 650 nm (I_1)

Nous avons obtenu les résultats suivants (en réalisant trois mesures par porphyrine) :

Composé	Solvant	Kd (M ⁻¹) x10 ⁴
P4COOH	Ethanol	9,1
	SVF	5,8
P4GluOAc	Ethanol	16,8
	SVF	25
P4GluOH [Csik et al., 1998]	Tampon phosphate	3,5

Tableau B-7 : Constante de dimérisation des composés P4GluOAc et P4COOH comparées à la P4GluOH dans l'éthanol et dans le SVF

Dans le cas de P4COOH, la constante de dimérisation est plus importante dans l'éthanol que dans le SVF, ce qui indique que ce composé s'agrège davantage dans l'éthanol que dans le SVF. Nous obtenons le résultat inverse pour P4GluOAc. Ces résultats concordent avec les observations faites lors de l'étude de la concentration sur l'absorbance.

IV.6 BILAN DE L'ETUDE PHOTOPHYSIQUE

Au terme de l'étude photophysique préliminaire concernant les porphyrines P4GluOAc et P4COOH, outre l'étude des propriétés spectroscopiques intrinsèques, nous avons montré que les porphyrines s'agrégeaient pour de faibles concentrations. Ce phénomène a été confirmé par différentes observations :

- non linéarité de l'absorbance et de l'intensité de fluorescence à partir d'une certaine concentration en porphyrine,
- dédoublement de la bande de Soret.

La valeur de la concentration critique dépend de la porphyrine et du solvant utilisés et d'autres mesures devront être effectuées afin d'obtenir des valeurs exactes.

De plus, des calculs de durée de vie sont actuellement en cours. Les premiers résultats montrent un déclin biexponentiel (2 espèces fluorescentes) traduisant la présence de dimère au temps de vie très court (< 1 ns) et de monomère au temps de vie plus long (≈ 7 à 10 ns).

V CONCLUSION

Le nombre croissant de photosensibilisants développés ou en cours de développement, en particulier dans le domaine de l'oncologie, met en évidence l'impossibilité d'obtenir une molécule photosensibilisante universelle.

Afin d'apporter notre contribution dans ce domaine, l'objectif de ce travail était de synthétiser des photosensibilisants de type porphyrine possédant des motifs glycosylés acétylés reliés à la structure porphyrine par des liaisons amide qui pourraient se révéler être de bons candidats pour la PDT. Deux dérivés porphyrine ont été obtenus, l'un comportant 4 motifs glycosylés (P4GluOAc) et l'autre 2 motifs (P2GluOAc). La synthèse et la purification de ces produits sont maîtrisées. Les propriétés photophysiques répondent aux exigences attendues (absorption à 650 nm, fluorescence dans le rouge) ainsi que les caractéristiques structurales (solubilité en milieu aqueux). Nous espérons que ces nouveaux photosensibilisants glycosylés posséderont une efficacité et une spécificité intéressantes.

Un travail important reste encore à faire (mené actuellement par Céline Frochot, CR CNRS au DCPR-GRAPP et en collaboration avec le Centre Alexis Vautrin). D'un point de vue photophysique, le temps de vie de fluorescence permettrait de confirmer la dimérisation : les monomères et les dimères ont des durées de vie de fluorescence très différentes. Un mélange monomère-dimère présentera une décroissance de durée de vie biexponentielle alors qu'elle sera monoexponentielle pour une solution de monomères seuls.

Sur le plan de la synthèse, il serait intéressant de greffer d'autres sucres tels que le galactose et d'étudier l'influence d'un bras espaceur, afin d'éloigner les sucres de la structure porphyrine. Toutefois, une production suffisante et peu coûteuse devra être envisagée afin de pouvoir effectuer un grand nombre d'études précliniques.

Les tests biologiques sont actuellement en cours au Centre Alexis Vautrin pour vérifier notre hypothèse, à savoir la sélectivité des produits glycosylés pour les cellules tumorales. Par la suite, d'autres études devront être entreprises pour déterminer la localisation, le temps de rétention et la toxicité en présence et en absence de lumière. Si les premiers tests biologiques sur les produits glycosylés se révélaient positifs, il pourrait être intéressant de transformer le cycle porphyrine en chlorine par réduction, afin d'augmenter l'absorption à 650 nm permettant une meilleure pénétration de la lumière dans les tissus.

Grâce à une recherche multidisciplinaire fondamentale et appliquée et l'apparition de lasers à diode moins coûteux, la thérapie photodynamique progresse d'année en année et pourrait devenir une méthode à part entière de traitement de certaines tumeurs (vessie, bouche, œsophage, peau, etc.).

CONCLUSION GENERALE

Les études réalisées au cours de ce travail ont concerné le développement de traceurs fluorescents pour des applications en biologie, dans le cadre de deux collaborations.

La première étude a porté sur le marquage fluorescent de différents polysaccharides biospécifiques et hydrosolubles de type dextrane ou héparine, déjà décrits pour leurs propriétés biologiques.

Les traceurs fluorescents greffés sur les polysaccharides sont des rotors moléculaires de la classe des 7-diéthylaminocoumarines. Ces composés présentent tous un groupement donneur et un groupement accepteur d'électrons, séparés par une conjugaison plus ou moins longue, mais permettant un transfert de charge. Cette caractéristique fait que ces composés sont des capteurs sensibles à l'environnement moléculaire en termes de polarité et de cohésion.

Nous avons mis au point le greffage de différents rotors moléculaires fluorescents, présentant des domaines d'excitation/émission très différenciés, sur les dérivés actifs du dextrane (CMDB) et sur l'héparine. Le greffage est maintenant maîtrisé et les polysaccharides fluorescents ont tous été caractérisés, notamment par des méthodes de spectrofluorimétrie.

Ce mode de greffage présente l'avantage d'être applicable à d'autres polymères de type polysaccharide.

D'un point de vue photophysique, nous avons montré que les rotors moléculaires, greffés à des polysaccharides hydrosolubles, conservent leur propriété de capteur : l'augmentation de la viscosité du milieu (en fonction de la concentration en polymère) est bien caractérisée par une augmentation de l'intensité de fluorescence.

D'un point de vue biologique, nous avons également montré que les modifications chimiques des polysaccharides n'influençaient pas sur les propriétés biospécifiques : les CMDB fluorescents conservent leur action proliférative sur les cellules endothéliales, de même l'héparine marquée présente la même activité coagulante que l'héparine native.

Enfin, les études en microscopie 3D ont permis de visualiser les polysaccharides dans des cellules endothéliales dans le cas des dextranses et dans les cellules musculaires lisses dans le cas de l'héparine.

Ces marquages fluorescents sont intéressants parce que l'action des polysaccharides bioactifs pourrait être localisée par des observations en microscopies de fluorescence ; notamment des expériences en microscopie champ proche, pourraient permettre d'accéder à des détails plus fins, comme peut-être des récepteurs cellulaires dans le cas de l'héparine.

La seconde étude a été consacrée à la synthèse de porphyrines possédant des motifs glucosamine tétra O-acétylée en vue de leur utilisation en thérapie photodynamique.

La préparation de ces molécules peut s'effectuer de diverses façons plus ou moins complexes et aisées.

Le greffage de cycles glucosamine sur une porphyrine commerciale (protoporphyrine IX) n'a pas pu être mené à bien, car les différents isomères obtenus et la glucosamine libre sont difficilement séparables.

La synthèse totale, bien que conduisant à de faibles rendements, est plus satisfaisante. Par ailleurs, les produits sont plus faciles à caractériser. Deux composés comportant deux ou quatre motifs glycosylés ont ainsi été synthétisés et caractérisés. Actuellement, nous maîtrisons bien cette voie de synthèse qui pourrait s'appliquer à la préparation d'autres composés à structure porphyrine possédant différents substituants (par exemple, autres sucres que la glucosamine) capables de jouer le rôle de vecteur.

D'un point de vue photophysique, mises à part leurs propriétés intrinsèques d'absorption et d'émission de fluorescence, nous avons démontré le caractère agrégatif de ces composés à faible concentration. Cette approche, facile à mettre en œuvre, pourra être retenue pour apporter un éclairage sur le mode d'internalisation des composés.

Des études biologiques sont actuellement en cours pour montrer leur efficacité et leur phototoxicité vis-à-vis de cellules cancéreuses.

L'acquisition prochaine d'une cuve de Langmuir-Blodgett devrait permettre de visualiser par fluorescence la localisation de porphyrines dans des couches lipidiques (mimant les membranes cellulaires) et donner une indication de l'action des photosensibilisants au niveau membranaire.

ANNEXES

ANNEXE A-1 : Description du CELLScan [Dumas et al., 1999]

Introduction

Cette technique, qui utilise un microscope optique conventionnel associé à un dispositif de déplacement axial nanométrique et à de puissants algorithmes de restauration et de reconstruction d'images permet, de visualiser des échantillons biologiques en trois dimensions. L'objet est illuminé en entier, à la différence de l'approche confocale.

Cette technique a été développée pour contourner les problèmes liés à l'utilisation de la microscopie confocale soit :

- une vitesse de balayage du laser insuffisante pour suivre des cinétiques rapides (Ca^{2+}),
- une concentration du faisceau laser en un point de focalisation entraînant une photodégradation du marqueur sonde,
- un faible rendement quantique des capteurs : 0,1 à 0,35 pour un photomultiplicateur et 0,6 à 0,8 pour des caméras de type SIT ou CCD.

Principe

Une série d'images 2D est acquise en déplaçant le plan focal à travers l'objet et chacune des images 2D contient des informations de son plan focal (partie "nette") et de tous les autres plans (partie "floue"). La partie nette de l'image correspond aux informations relatives au plan focal, le flou dans l'image provient des informations de tous les autres plans. Ces informations peuvent être séparées par traitement d'image afin d'estimer la vraie structure 3D de l'objet étudié. La procédure suit 4 étapes :

1) Acquisition de coupes 2-D (module d'acquisition)

Le découpage optique consiste à déplacer le plan focal à travers l'échantillon, grâce à un système de déplacement en z par moteur ou piézo-électrique contrôlé par ordinateur. Des images sont acquises à chaque position le long de l'axe optique.

2) Déflouage des coupes 2-D (module de traitement)

Malheureusement en microscopie optique, chaque image contient des informations des plans inférieurs et supérieurs au plan de focalisation. Il a été déterminé que seul(s) 1% à 2% de l'information provient effectivement de ce plan. Afin de supprimer l'information hors plan de focalisation, il est nécessaire de bien connaître les propriétés optiques de formation d'images

en mesurant ou calculant la fonction de transfert optique (ou *point spread function*, PSF) système complet (microscope/détecteur). Le volume de données est traité informatiquement par des algorithmes de déconvolution, fondés sur l'équation classique de formation optique des images en utilisant la fonction de transfert préalablement déterminée (voir restauration d'image).

➤ Restauration d'image

Le traitement d'image concerne la manipulation et l'analyse d'image (restauration, reconstruction et réhaussement ; numérisation et compression ; description et reconnaissance de formes).

Le but de la restauration d'image est de retrouver la scène originelle à partir d'observations dégradées. Ces techniques sont orientées vers la modélisation des phénomènes de dégradation (défocalisation, bruit) et l'application de procédures inverses afin d'obtenir une approximation de la scène originale.

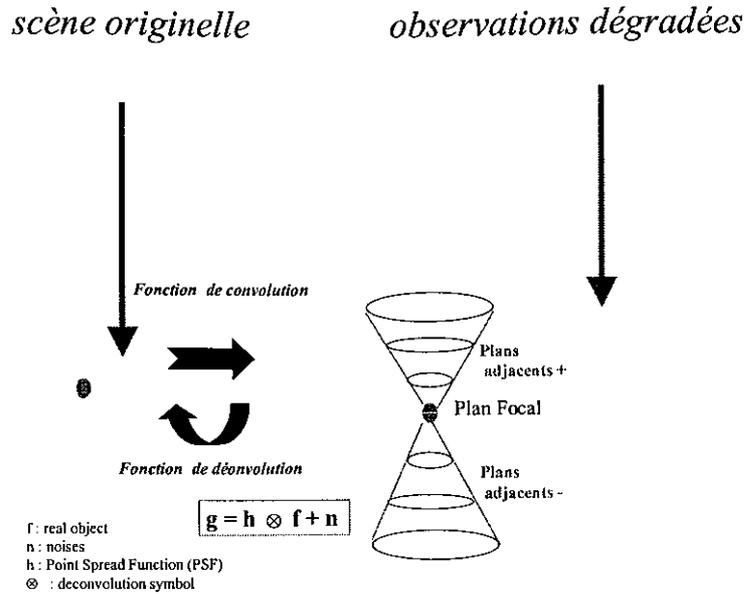
Les différentes approches de restauration dépendent de l'hypothèse particulière faite à propos du modèle de dégradation et de formation de l'image (modèle linéaire ou non linéaire avec bruit additif ou dépendant du signal).

Les origines mathématiques de la restauration d'image sont intimement liées au domaine des équations intégrales car le principe physique d'un modèle linéaire de formation d'image peut être décrit par une intégrale de convolution. Le problème qui est à la base de la restauration d'image est de construire une estimée de l'objet observé en utilisant l'image de la PSF :

$$g = h \otimes f + n$$

g : image formée à travers le système ; h : PSF ; \otimes : symbole de convolution ; f : objet réel ; n : sources de bruit.

Les principes énoncés ci-dessus sont valables dans des conditions d'utilisation dites standards. Les conditions deviennent non-standard dès que l'un des paramètres (épaisseur et indice de l'huile ou de la lamelle, position de l'objet) est modifié.



➤ Fonction de transfert optique

La fonction de transfert optique décrit comment une source ponctuelle est déformée lorsqu'elle est imagée par un système optique. La source ponctuelle est en général transformée en une tache diffuse qui est due à la limite de diffraction du système. Elle dépend de plusieurs paramètres (ouverture numérique de l'objectif, optiques, alignement de la source d'excitation, indice de réfraction du milieu intra-échantillon et du milieu à immersion, longueur d'onde d'émission...).

La réponse en fréquence, ou fonction de transfert optique (OTF) est fréquemment utilisée pour caractériser un système optique. L'OTF 3D est la transformée de Fourier en trois dimensions de la PSF.

➤ Mesure de la fonction de transfert

La PSF est généralement mesurée à partir de billes fluorescentes dont le diamètre est inférieur à la limite de résolution du système.

3) Reconstruction volumique de l'objet

L'acquisition d'un ensemble d'images 2D est réalisée en déplaçant le plan focal jusqu'à ce que l'objet soit complètement traversé. La modélisation de la chaîne d'acquisition complète permettra de traiter ces images afin d'obtenir une estimée 3D de l'objet.

4) Déconvolution EPR

Sur le principe des acquisitions par "coupes optiques", le système CELLScan met en œuvre une étape de déconvolution numérique à l'aide d'algorithmes. CELLScan fait appel à une technologie de pointe en matière de corrections d'image : l'E.P.R. "Exhaustive Photon Reassignment" ou restitution quantitative des photons issus d'un point source à leur plan d'origine. Elle consiste en une minimisation au sens des moindres carrés avec contraintes, qui conduit à une déconvolution 3D itérative. Cette méthode de restauration d'image est née de la collaboration du Pr. Fay (University of Massachusetts Medical Center) et d'un industriel CSPI-Scanalytics, IPLAB actuellement. Cet algorithme est un des premiers mis sur le marché et donne de bons résultats à condition de ne pas sortir de son domaine de validité. Il est très utilisé en restauration d'image de fluorescence. L'algorithme nécessite la connaissance préalable de la PSF du système, mesurée en plusieurs points du champ à l'aide de sources ponctuelles calibrées afin d'évaluer les déformations spécifiques (aberration) du système complet. Cette fonction décrit la façon dont le système optique déforme le signal d'un objet ponctuel qui a son origine au-dessus ou au-dessous du plan de netteté. Pour chaque image, les photons "défocalisés" sont évalués et ré-insérés à leur point d'origine. Dans la méthode de l'E.P.R., les propriétés de distorsion et de profondeur de champ du microscope sont analysées et réversées mathématiquement afin d'obtenir des images plus nettes et plus contrastées.

La qualité du déflouage (déconvolution des plans 2D à l'aide de l'algorithme E.P.R.) dépend directement des paramètres : convergence (10^{-5} recommandé), itération (entre 20 et 100), lissage (15) et essentiellement de la qualité du fichier PSF.

➤ PSF

La PSF (réponse impulsionnelle) caractérise la fonction de transfert du microscope pour des conditions expérimentales particulières, propres à chaque expérience (incrément entre chaque plan, O.N., milieu de montage, objectif, filtres, sondes fluorescentes, longueurs d'onde...). On utilise des billes fluorescentes en latex dont la longueur d'onde d'émission est la même que celle des spécimens biologiques à étudier. La taille des billes doit être inférieure à la limite de résolution du microscope.

Théoriquement, elles devraient être aussi petites que possible et posséder l'intensité la plus forte possible (quasi Dirac). Dans la littérature, on adopte communément le compromis suivant : le diamètre de la bille (D_{bille}) doit être inférieur ou égal à la moitié du diamètre du premier disque d'Airy ou encore $D_{\text{bille}} = 0,61 (\lambda/NA)$.

Une fois le diamètre de la bille déterminé en fonction de la longueur d'onde et de l'ouverture numérique ($D_{\text{bille}} \leq 0,25 \mu\text{m}$ pour $\lambda=530 \text{ nm}$ et $NA=1,25$), la préparation de billes (suffisamment diluée) est placée sur la lame (ou entre lame et lamelles, comme le spécimen). On fait l'acquisition de la PSF du bas vers le haut de la bille afin de minimiser l'influence du "bleaching". La normalisation permet d'avoir la même quantité d'énergie lumineuse dans chacun des plans et de compenser un éventuel bleaching du signal et/ou le papillotement de la source d'excitation.

➤ Profondeur de champ

La profondeur de champ d'un objectif peut être exprimée selon :

$$D = \lambda / (4n \sin^2(\alpha/2)) \text{ avec } \alpha = \sin^{-1} (NA/n)$$

La profondeur de champ représente la distance physique le long de l'axe optique à travers laquelle le spécimen biologique fluorescent observé se trouve focalisé. Il s'agit du déplacement possible selon l'axe z d'un point de l'objet avant que l'image ne change (pour un objectif x100, $NA = 1,25$ et $n = 1,515$, pour $\lambda = 530 \text{ nm}$, $D = 0,4 \mu\text{m}$).

Certains auteurs considèrent qu'il n'est pas utile d'échantillonner selon l'axe z avec un pas inférieur à la profondeur de champ. Mais d'autres affirment cependant qu'une infinité de plans selon z est nécessaire pour arriver à une reconstruction correcte de l'objet. Avec les caractéristiques de l'objectif ci-dessus, à 530 nm, le pas d'échantillonnage théorique est de $\delta_z = 0,248 \mu\text{m}$ et $\delta_x = \delta_y = 0,09 \mu\text{m}$. En pratique, pour l'utilisation de la caméra en "binning 1", $\delta_z = 0,125 \mu\text{m}$ (ou $0,25 \mu\text{m}$) et $\delta_x = \delta_y = 0,06 \mu\text{m}$. Ces valeurs respectent, pour cet objectif, les conditions énoncées dans le théorème de Shannon appliqué au microscope. En "binning 2", $\delta_z = 0,25 \mu\text{m}$ et $\delta_x = \delta_y = 0,12 \mu\text{m}$, ce qui reste satisfaisant.

ANNEXE B-1 : Bref historique du développement de la PDT

1900 : Première observation par Raab :
Paramécie + rayons solaires : survie
Paramécie + acridine + obscurité : survie
Paramécie + acridine + rayons solaires : décès

1904 : Dénomination [Tappeiner et Jodlbauer, 1904] :
Tappeiner crée le terme réaction "photodynamique" pour un système biologique qui exige de l'oxygène et un sensibilisateur absorbant la lumière.

1910 : Hp chez l'animal :
Des souris blanches ayant reçu une injection d'Hématoporphyrine (Hp) et exposées à de la lumière développent des réactions qui varient énormément en fonction des quantités respectives de sensibilisateur et de lumière.

1913 : Hp chez l'homme :
Meyer s'injecte de l'Hp et démontre la photosensibilisation solaire qui persiste pendant deux mois associée à des œdèmes et une hyperpigmentation.

1924 : Fluorescence tumorale :
Constatation que certaines tumeurs émettent une fluorescence orange-rouge lorsqu'elles sont exposées à des rayons du proche UV, émission provenant de la présence de porphyrines endogènes.

1948 : Fluorescence de l'Hp chez l'animal :
Une injection d'Hp cause une augmentation de fluorescence dans des ganglions lymphatiques, dans des tumeurs (sarcomes et glandes mammaires), dans des tissus incisés antérieurement ou traumatisés et dans le placenta de souris en gestation.

1955 : Fluorescence de l'Hp chez l'homme :
Observation de la fluorescence de tumeurs chez des patients ayant reçu une injection d'Hp, ceci concerne les cancers du pénis, du sein, des ganglions mésentériques et axillaires.

1960 : HpD :
L'étude du dérivé de l'hématoporphyrine dit HpD, préparé par Schwartz, sur des souris blanches exposées à la lumière, montre que la réaction engendrée varie avec la dose d'HpD, le flux de lumière et la durée d'exposition à la lumière.

1961 : Fluorescence de l'HpD au niveau endobronchial :
Bilan des études de fluorescence endoscopique observée chez 15 patients atteints d'une tumeur endobronchiale et utilisant l'HpD comme sensibilisateur.

1966 : HpD comme traitement chez l'homme [Lipson et al., 1966] :
Utilisation de l'HpD pour la détection et le suivi de cancer et traitement pour la première fois d'une patiente atteinte d'un cancer du sein.

1968 : Fluorescence de l'HpD chez l'homme :

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

1976 : HpD dans le traitement de tumeurs de la vessie [Kelly et Snell, 1976].

1976 : Oxygène singulet [Weishaupt et al., 1976] :

Weishaupt démontre que l'oxygène singulet produit par l'absorption d'énergie lumineuse par l'HpD, initialise la destruction des tumeurs.

1978 : HpD dans le traitement de cancer de la peau [Dougherty et al., 1979] :

Dougherty rapporte des réponses totales ou partielles dans 111 sur 113 cas de lésions malignes cutanées ou sous-cutanées traitées par PDT utilisant l'HpD comme sensibilisateur.

1980 : Tunable Dye Laser ; 630 nm :

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

1981 : HpD dans le traitement de cancer endobronchial :

Utilisation de fibre optique bronchoscopique dans le traitement par PDT de tumeurs endobronchiques.

1982 : Création de la LMRF :

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

1984 : Photofrin II [Dougherty] :

L'HpD est fractionné et séparé en un mélange désigné comme le Photofrin II ; il s'agit d'éther de dihématoporphyrine (DHE).

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

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

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

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

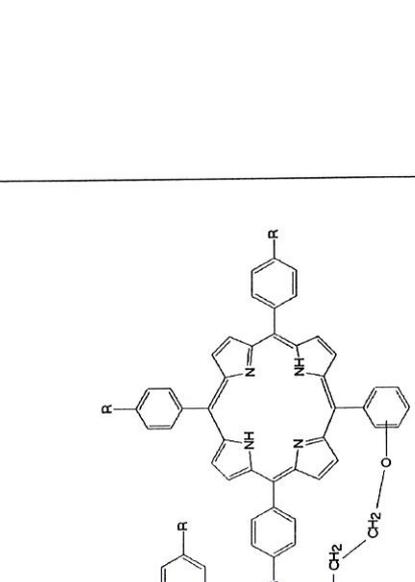
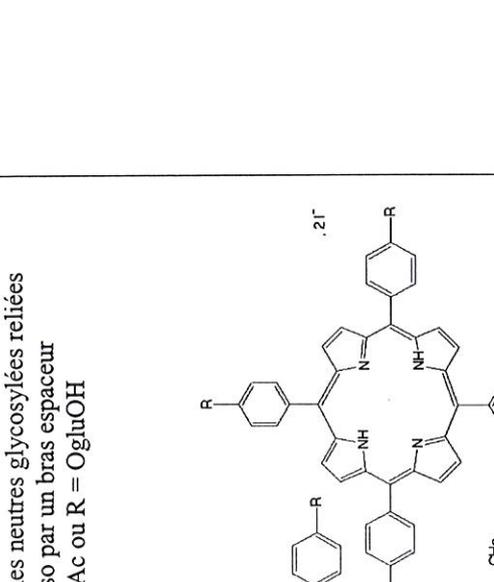
2000 : La FDA autorise la mise sur le marché de Visudyne™ dans le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge.

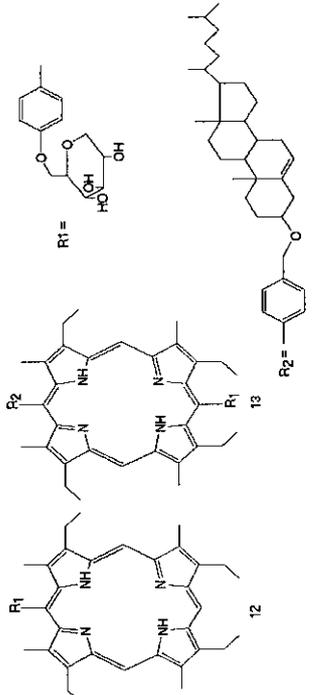
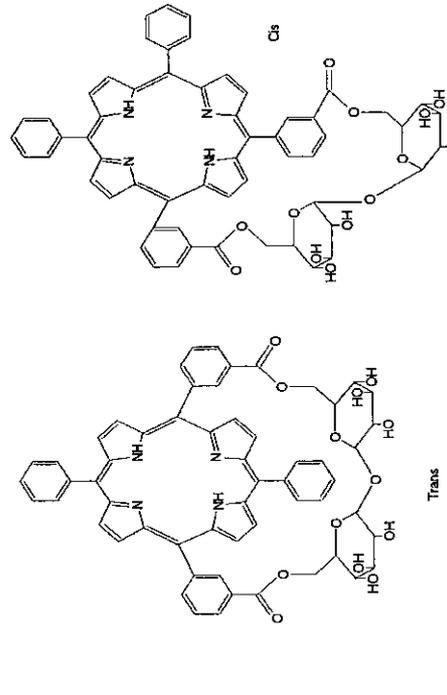
ANNEXE B-2 : Photosensibilisants de seconde génération ayant reçu une AMM et/ou en essais cliniques

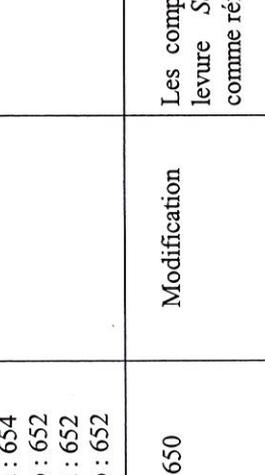
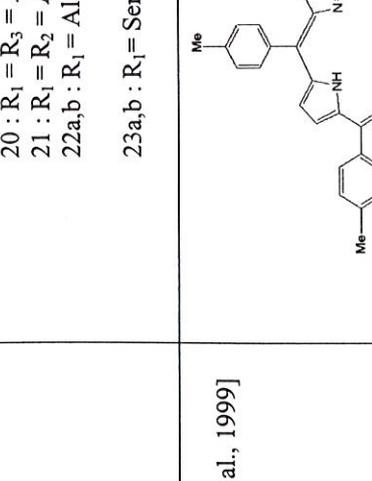
Composé	Nom	Production	λ_{fmax}	Phase de développement
Porfimer sodium	Photofrin®	QLT Pharmaceuticals Sanofi	630 nm	Approbation FDA France (avril 1996)
Acide-5-aminolévulinique (ALA)	Levulan®	DUSA Pharmaceuticals Schering AG	630 nm	Approbation FDA USA (décembre 1999) kératoses actiniques multiples Essais cliniques I/II Psoriasis Carcinome baso-cellulaire Maladie de Bowen
Benzoporphyrine dérivée mono acid ring A (BPD-MA)	Visudyne® Verteporfine®	Cibavision Sanofi Beaufour	690 nm	Approbation FDA USA (novembre 1999) France (septembre 2000) Dégénérescence maculaire Essais cliniques I/II : agent anti-HIV, cancer cutané, infections gynécologiques III : immunosuppresseur
Meta-tetra-hydroxyphenyl chlorine (m-THPC)	Foscan®	Scotia	652 nm	Essais cliniques II : cancer du sein, pancréas III : cancer laryngé, tête, cou avec chirurgie et radiothérapie pour cancers avancés
Zn-phtalocyanine			670 nm	Essais cliniques I : athérosclérose Maladies oculaires maladies dermatologiques
Hypericine		Vim RX Pharmaceuticals		Essais cliniques I : psoriasis, cancer de la peau, verrues II : agent antiviral, hépatite C, HIV, gliomes malins
Tin ethyletiopurpurin (Sn ET2)	Photopoint® Purlytin®	Miravant Pharmacia Upjohn	660 nm	Essais cliniques I : dégénérescence maculaire, cancers cutanés II/III : cancer du sein, cancer métastaté cutané, carcinome baso-cellulaire, sarcome de Kaposi

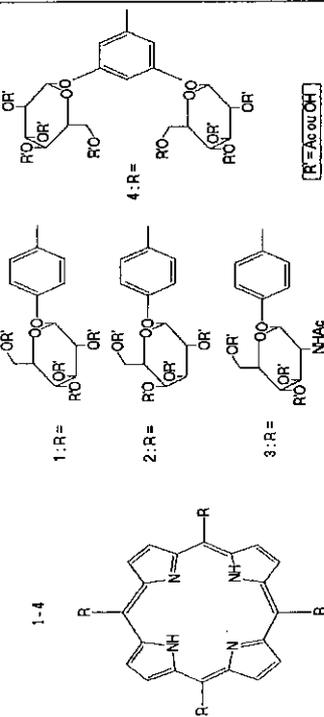
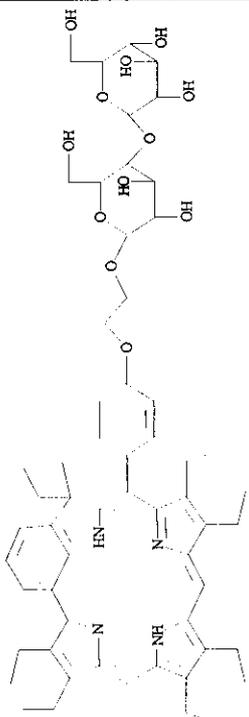
ANNEXE B-3 : Photosensibilisants glycosylés

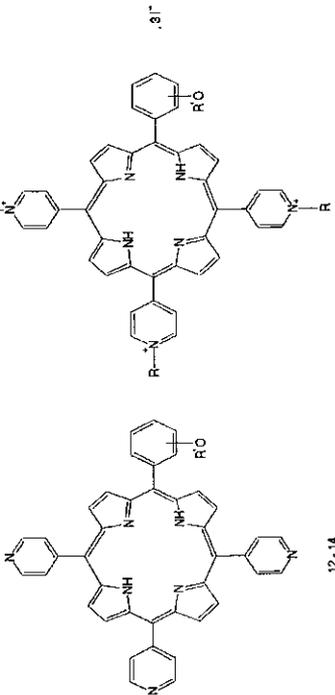
s
i
e
u,
s,
s,

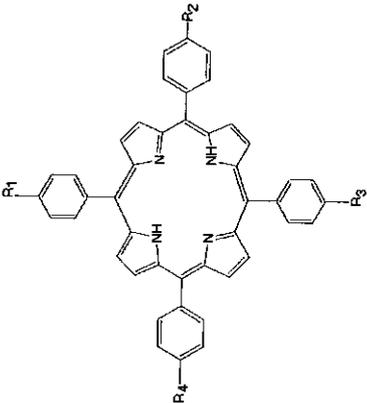
N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
1	[Kaldapa et al., 2000]	 <p data-bbox="782 896 877 1478">Dimères de porphyrines neutres glycosylées reliées en position méso par un bras espaceur R = OgluOAc ou R = OgluOH</p>		Méthode de Lindsey Méthode de Little	Seuls les composés GluOH ont été testés sur des cellules de promyélocytes K.562. La phototoxicité plus faible par rapport aux monomères est explicitée par une mauvaise perméabilité membranaire.
		 <p data-bbox="1292 896 1388 1478">Dimères de porphyrines cationiques reliées en position méso par un bras espaceur R = OgluOAc ou R = OgluOH</p>			

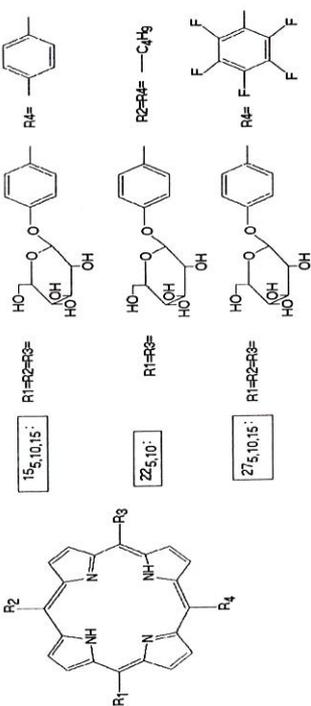
N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
2	[Schell et Hombrecher, 1999]	 <p style="text-align: center;">Monoaryyl (12) et diaryl (13) porphyrines glycosylées</p>	CH ₂ Cl ₂ /MeOH 630		<p>Le composé 12 présente une grande affinité pour les liposomes ou les lipoprotéines, ce qui est à l'opposé du résultat obtenu avec le composé 13, plus hydrophobe.</p> <p>Le réglage de la balance hydrophile/hydrophobe du photosensibilisant est capitale dans la capture de celui-ci par les lipoprotéines et les cellules.</p>
3	[Davoust et al., 1999]	 <p style="text-align: center;">Mésosarylporphyrines avec ceinture de cycles glycosylés Configuration cis ou trans</p>	CH ₂ Cl ₂ Cis : 652 Trans : 646	Méthode de Lindsey	<p>Les composés ont été testés sur des lignées de cellules de promyélocytes K562 avec l'HP comme référence.</p> <p>Le composé trans a un délai de réponse > à l'HP. Le composé cis a une phototoxicité faible.</p>

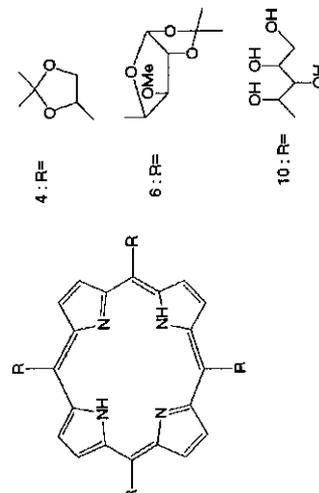
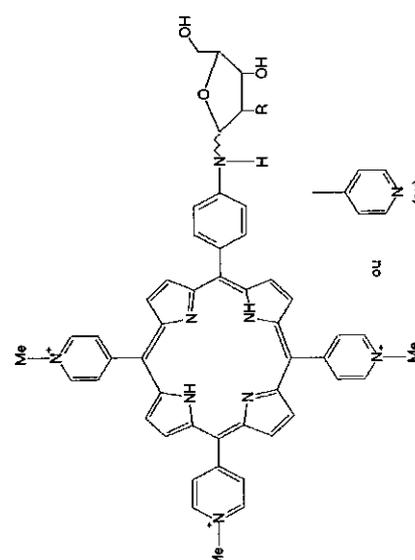
N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
4	[Sol et al., 1999]	<p data-bbox="371 1055 400 1435">Mésoporphyrines avec groupements glycosylés, alanyles (ala) et séryles (ser) (a,b = ortho et para)</p> <p data-bbox="400 1055 429 1435">19a,b : R₂ = R₃ = R₄ = Ala ; R₁ = OgluOH</p> <p data-bbox="429 1055 458 1435">20 : R₁ = R₃ = Ala ; R₂ = R₄ = OgluOH</p> <p data-bbox="458 1055 486 1435">21 : R₁ = R₂ = Ala ; R₃ = R₄ = OgluOH</p> <p data-bbox="486 1055 515 1435">22a,b : R₁ = Ala ; R₂ = R₃ = R₄ = OgluOH</p> <p data-bbox="515 1055 544 1435">23a,b : R₁ = SerOgluOH</p> 	<p data-bbox="371 1435 400 1765">H₂O</p> <p data-bbox="400 1435 429 1765">19a,b : 654</p> <p data-bbox="429 1435 458 1765">20 : 652</p> <p data-bbox="458 1435 486 1765">21 : 654</p> <p data-bbox="486 1435 515 1765">22a : 654</p> <p data-bbox="515 1435 544 1765">22b : 652</p> <p data-bbox="544 1435 572 1765">23a : 652</p> <p data-bbox="572 1435 601 1765">23b : 652</p>	<p data-bbox="371 1765 400 2094">Méthode de Lindsey</p>	<p data-bbox="371 2094 400 2197">Bonne solubilité des porphyrines glycosylées en solution aqueuse. La présence des groupes aryle et les substrats glycosylés hydrophiles pourraient augmenter l'interaction avec la membrane lipidique.</p> <p data-bbox="400 2094 429 2197">Les composés 20, 21 et 22a ont été testés sur des lignées cellulaires de promyélocytes K562 avec l'Hp comme référence.</p> <p data-bbox="429 2094 458 2197">Les résultats sont comparables avec ceux obtenus avec l'Hp lorsque le temps d'irradiation est > à 60 min.</p>
5	[Sylvain et al., 1999]	<p data-bbox="408 1055 437 1435">Mésoporphyrines thioglycosylées (a,b = ortho et para)</p> <p data-bbox="437 1055 466 1435">6a,b : R = -S-gluOH</p> <p data-bbox="466 1055 494 1435">7a,b : R = -S-galOH</p> <p data-bbox="494 1055 523 1435">8a,b : R = -S-manOH</p> <p data-bbox="523 1055 552 1435">bras espaceur : -(CH₂)₃-</p> 	650	Modification	<p data-bbox="408 2094 437 2197">Les composés ont été testés sur des lignées de levure <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> avec l'Hp comme référence.</p> <p data-bbox="437 2094 466 2197">Les composés 6, 7 et 8 sont plus efficaces si les groupements thioglycosylés sont en position ortho.</p> <p data-bbox="466 2094 494 2197">La phototoxicité n'est pas reliée à la nature du cycle glycosylé.</p> <p data-bbox="494 2094 523 2197">Le délai d'action de ces produits est comparable à celui de l'HP.</p>

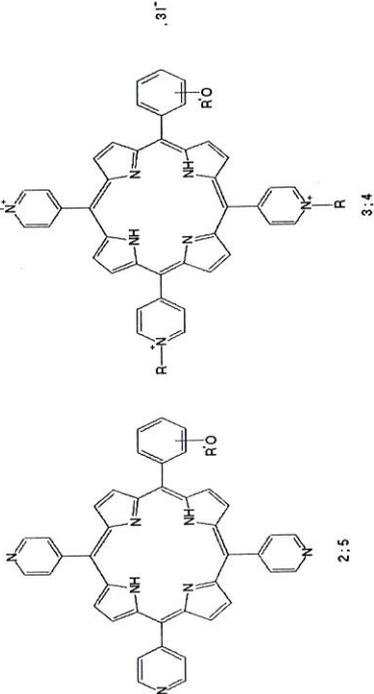
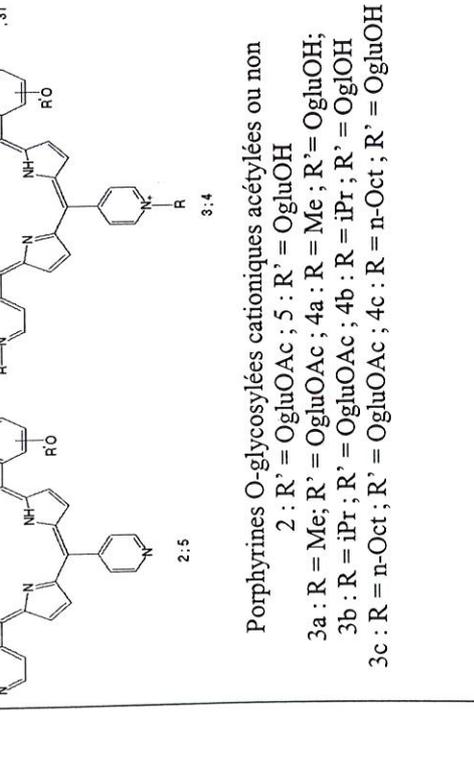
N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
6	[Mikata et al., 1998]	<p data-bbox="245 1581 268 1704">1-4</p>  <p data-bbox="692 1111 810 1783">Mésoporphyrines avec groupements glycosylés acétylés ou non (a : R' = Ac ; b : R' = H) 1 : Tétra-glucose ; 2 : Tétra-galactose ; 3 : Tétra-N-Acétyleglucosamine ; 4 : Octa-glucose</p>	DMSO	Méthode de Lindsey	<p data-bbox="245 85 395 647">Les composés ont été testés sur des lignées HeLa. Le composé octaglycosylé 4a synthétisé n'a pas montré de réels résultats à cause de sa structure trop volumineuse. Le composé tétraglycosylé 1a a permis d'obtenir de meilleurs résultats.</p> <p data-bbox="427 85 517 647">Protéger les fonctions OH par des groupements acétyle augmente l'incorporation du photosensibilisant dans les cellules.</p> <p data-bbox="549 85 606 647">Nécessité de ne pas utiliser des composés trop volumineux.</p>
7	[Maillard et al., 1997]	 <p data-bbox="1257 1200 1289 1693">Mésomonoarylbenzochlorine glycoconjuguée</p>	MeOH : 672	Monoarylporphyrine comme précurseur	<p data-bbox="948 85 1069 647">Ce composé présente une bonne photocytotoxicité sur une lignée cellulaire tumorale HT 29 <i>in vitro</i> à 10 $\mu\text{g/mL}$ (85% de mort cellulaire), après irradiation avec une lumière > à 590 nm.</p> <p data-bbox="1069 85 1158 647">En comparaison, le composé non glycosylé correspondant, présente un taux de mort cellulaire de 17%.</p>

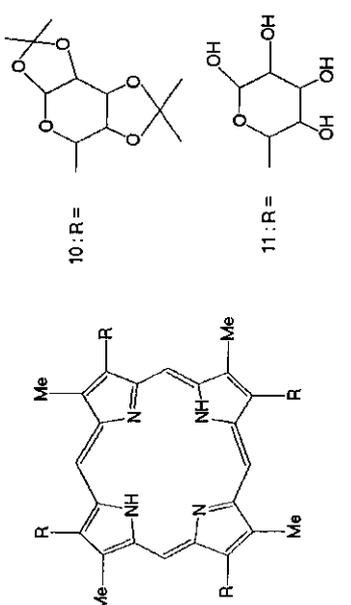
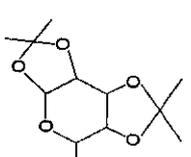
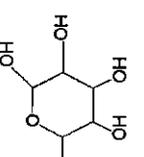
N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
8	[Driaf et al., 1996]	 <p>12-14</p> <p>15-19</p>	<p>Acétone/eau (50/50, v/v)</p> <p>12a : 642 12b : 644 13a : 640 13b : 642 14a : 642 14b : 644 15a : 642 15b : 650 16a : 644 16b : 650 17a : 648 17b : 650 18a : 642 18b : 646 19a, b : 648</p>	Méthode de Little	Etudes PDT non effectuées.
		<p>Porphyrines glycosylées acétylées ou non</p> <p>a, b = ortho et para</p> <p>12a, b : R = gluOH (OAc) 13a, b : R = maltOH (OAc) 14a, b : R = lactOH (OAc) 15a, b : R = Me ; R' = gluOH (OAc) 16a, b : R = Me ; R' = maltOH (OAc) 17a, b : R = Me ; R' = lactOH (OAc) 18a, b : R = i-Pr ; R' = gluOH (OAc) 19a, b : R = n-Oct ; R' = gluOH(OAc)</p>			

N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
9	[Gaud et al., 1996]	 <p style="text-align: center;">mésoarylporphyrines glycosylées</p> <p style="text-align: center;"> $R_2 = R_3 = R_4 = CH_3$; $R_1 = O(CH_2)_3 O\text{sucrose}^*$ $R_1 = R_2 = CH_3$; $R_3 = R_4 = O(CH_2)_3 OGlc$ $R_1 = R_3 = CH_3$; $R_2 = R_4 = O(CH_2)_3 OGlc$ $R_1 = CH_3$; $R_2 = R_3 = R_4 = O(CH_2)_3 OGlc$ $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = O(CH_2)_3 Glic$ $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = O(CH_2)_3 Mal$ </p> <p style="text-align: center;">(*) Sucre = Glic (Galactose), Rb (Ribose), Mal (Maltose), Lac (Lactose)</p>	~ 650	Little Lee et Lindsey	Tests biologiques non effectués. Pas d'acétylation des unités osidiques. Introduction d'un bras espaceur pour éloigner le motif sucre du noyau pyrrololique.

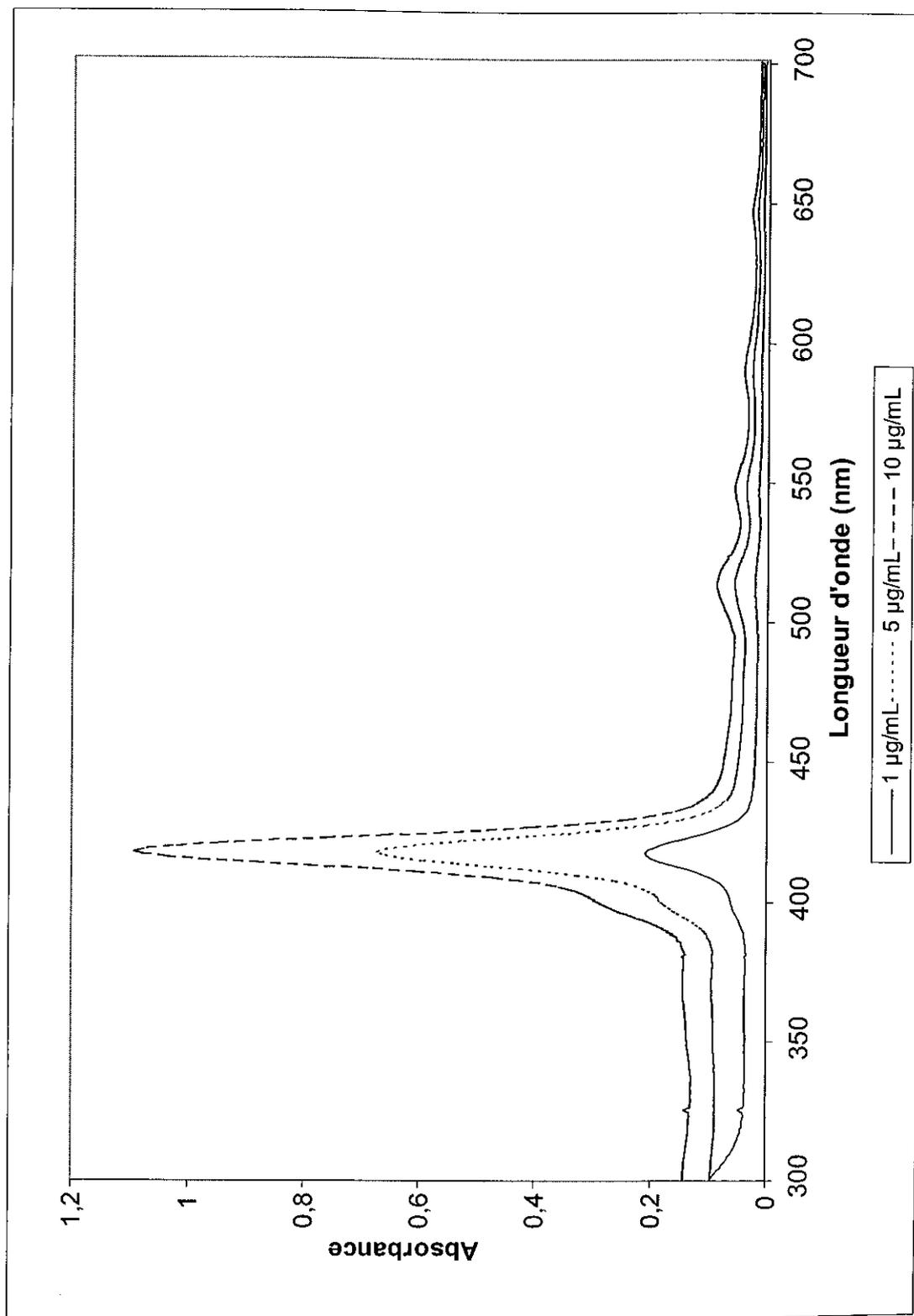
N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
10	[Oulmi et al., 1995]	 <p style="text-align: center;">Porphyrines glycosylées</p> <p>Porphyrines tétrakis(arylglycosylées) :</p> <p>5 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OgluOAc</p> <p>6 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OGalOAc</p> <p>7 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OMaltOAc</p> <p>8 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OgluOAcNHAc</p> <p>9 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OGluOH</p> <p>10 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OGalOH</p> <p>11 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OMaltOH</p> <p>12 : R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = OgluOHNHAc</p> <p>Phénylporphyrines poly(arylglycosylées) : 15_{5,10,15}</p> <p>Alkylporphyrines poly(arylglycosylées) : 22_{5,10}</p> <p>Perfluorophénylporphyrines poly(arylglycosylées) : 27_{5,10,15}</p>	655	Méthode de Lindsey	<p>Les différents sucres reliés en position para du cycle aromatique confèrent à la porphyrine une bonne solubilité dans l'eau.</p> <p>Les résultats indiquent que le degré de substitution en cycles glycosylés et la nature des substituants lipophiles ont une répercussion sur l'efficacité de la phototoxicité des produits. Les dérivés mésobutyles et mésopentafluorés ont montré une meilleure activité antitumorale.</p> <p>Le caractère amphiphile est déterminant pour pouvoir observer une bonne activité antitumorale.</p>

N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
11	[Comia et al., 1994]	 <p style="text-align: center;">Porphyrines glycosylées en méso</p>	CHCl ₃ 4 : 650 6 : 652 H ₂ O 10 : 650	Méthode de Lindsey	Synthèse uniquement.
12	[Li et al. 1994]	 <p style="text-align: center;">Porphyrinyl-N-glycosides</p> <p style="text-align: center;">3 : Py, R = OH 4 : Py, R = H 5 : N-Mepy, R = OH 6 : N-Mepy, R = H</p>	EtOH 3 : 646 4 : 646 5 : 653 6 : 651	Méthode de Rothermund	Synthèse uniquement.

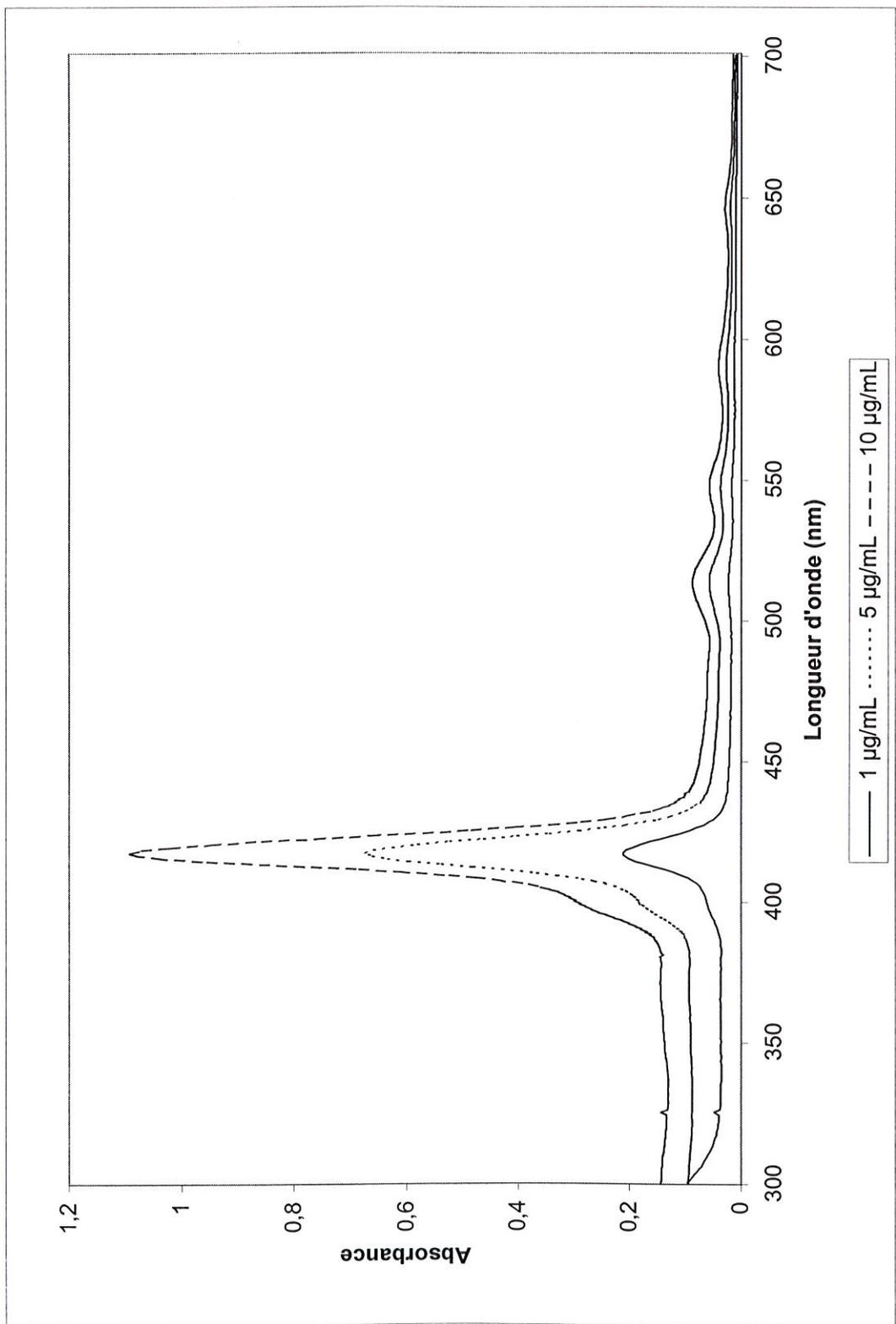
N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
13	[Driaf et al., 1993]	 <p>2:5</p> <p>3:4</p> <p>31"</p>		Méthode Alder-Longo	Etudes biologiques non effectuées.
		<p>Porphyrines O-glycosylées cationiques acétylées ou non</p> <p>2 : R' = OgluOAc ; 5 : R' = OgluOH</p> <p>3a : R = Me ; R' = OgluOAc ; 4a : R = Me ; R' = OgluOH ;</p> <p>3b : R = iPr ; R' = OgluOAc ; 4b : R = iPr ; R' = OgluOH</p> <p>3c : R = n-Oct ; R' = OgluOAc ; 4c : R = n-Oct ; R' = OgluOH</p>			
14	[Adams et al., 1992]	 <p>2</p> <p>3</p> <p>6-12</p> <p>Porphyrines modifiées</p> <p>11 : = OgluOH ; 12 : = OmanOH</p>	CHCl ₃ 11, 12 : 641		Les composés glycosylés amphiphiles agissent plus en profondeur que le photofrin. Il est nécessaire d'étudier leur sélectivité d'action afin d'évaluer les effets secondaires qu'ils pourraient occasionner.

N°	Auteurs	Structure des photosensibilisants	λ (nm) à Q1	Synthèse	Résultats
15	[Ono et al., 1992]	 <p style="text-align: center;">10 : R =  11 : R = </p> <p style="text-align: center;">Porphyrines avec cycle saccharide directement relié en position β</p>	H ₂ O 11 : 614	Synthèse totale	Le composé 11 est presque aussi efficace que l'HP.

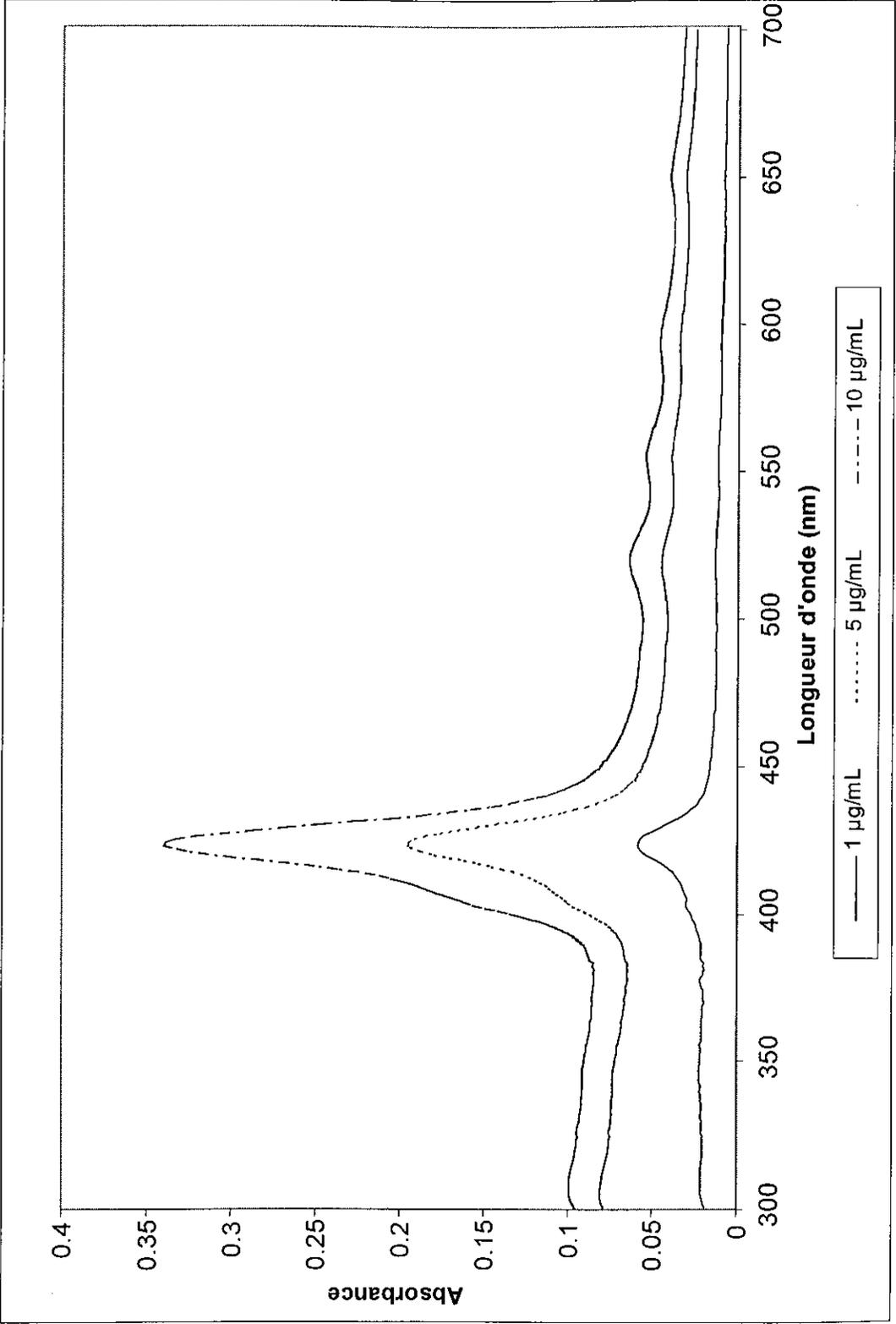
ANNEXE B-4 : Spectres d'absorption et d'émission de fluorescence des porphyrines P4GluOAc et P4COOH



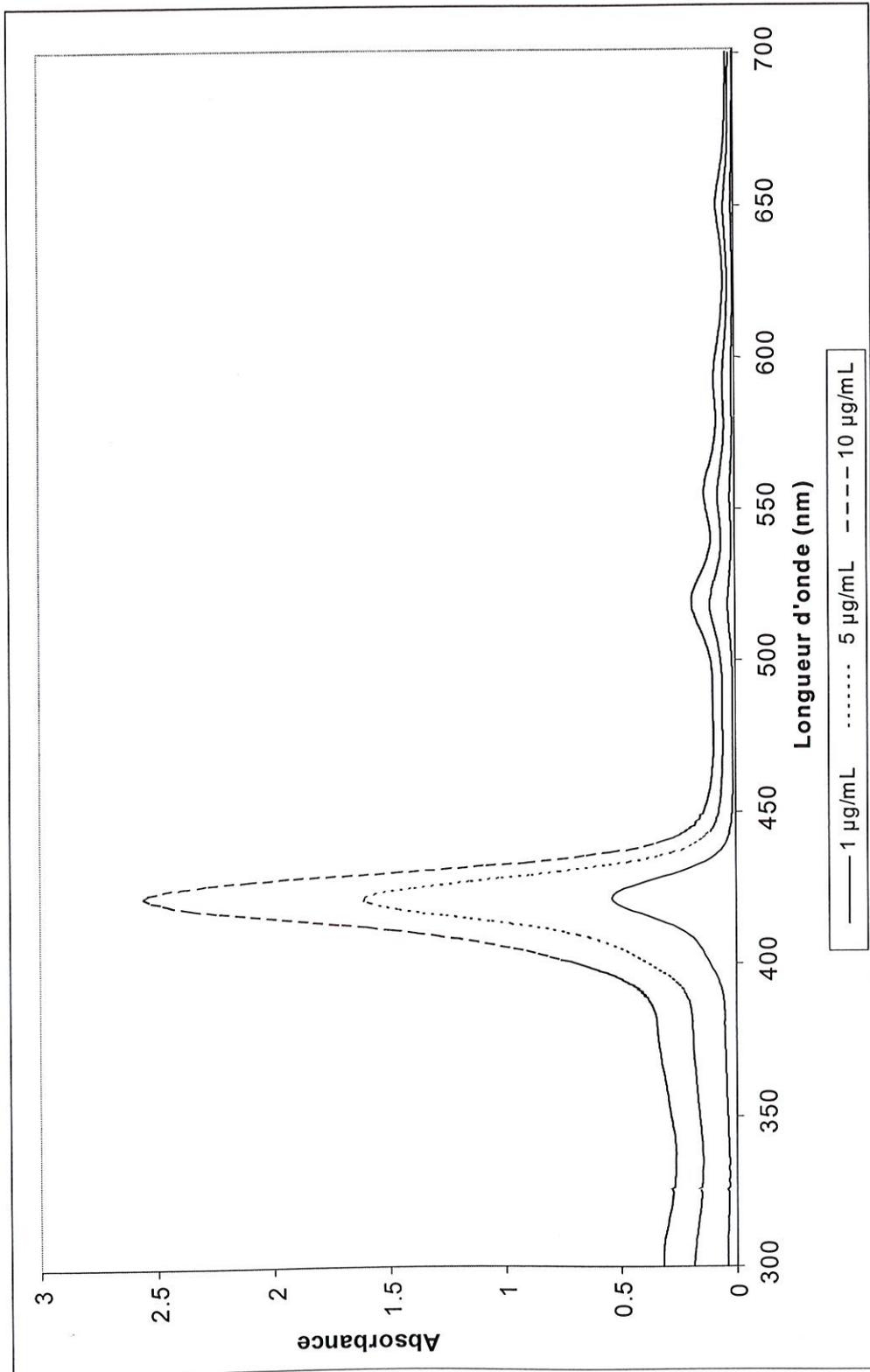
Spectres d'absorption UV-visible de la P4GluOAc dans l'éthanol pour 3 concentrations différentes



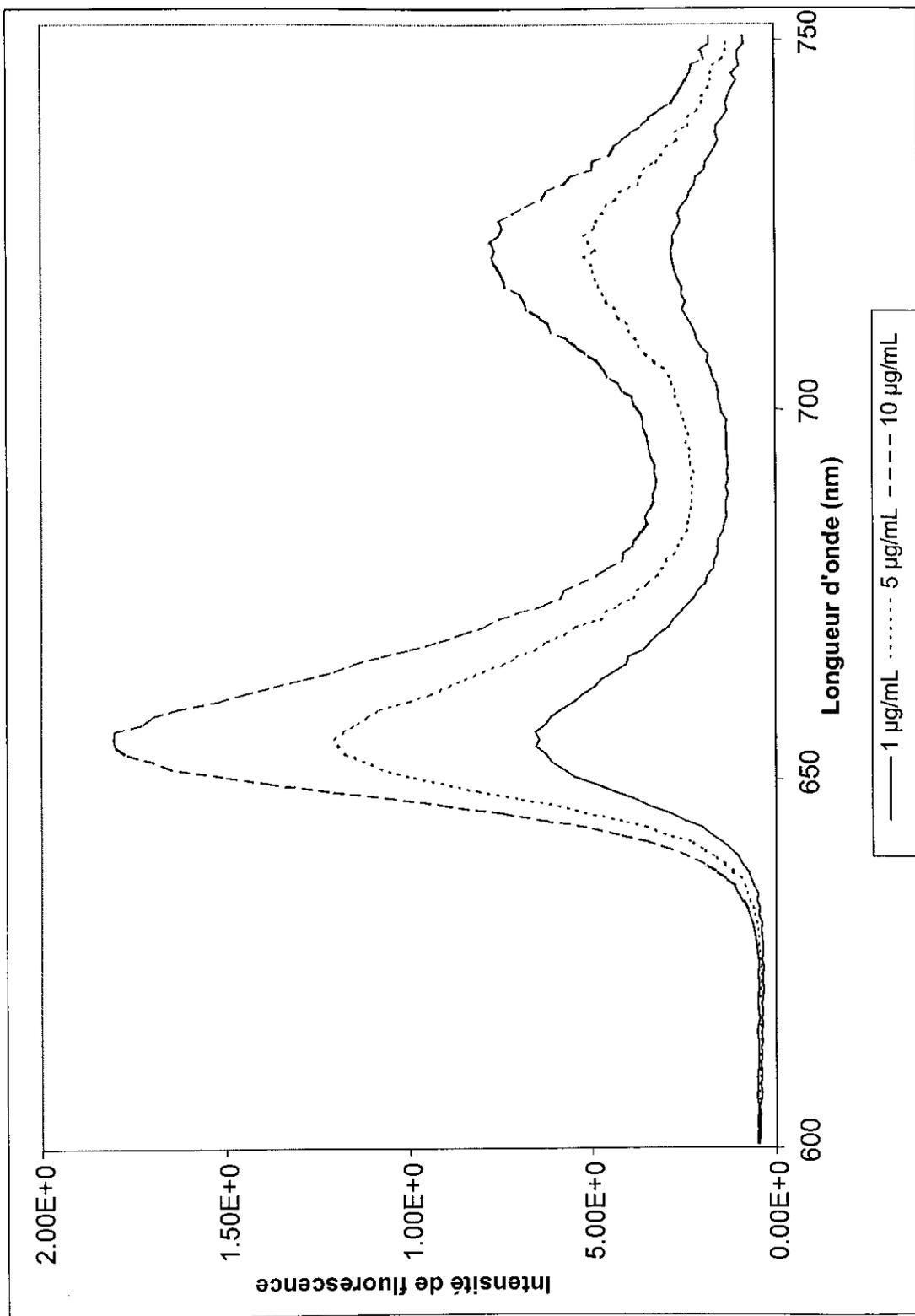
Spectres d'absorption UV-visible de la P4COOH dans l'éthanol pour 3 concentrations différentes



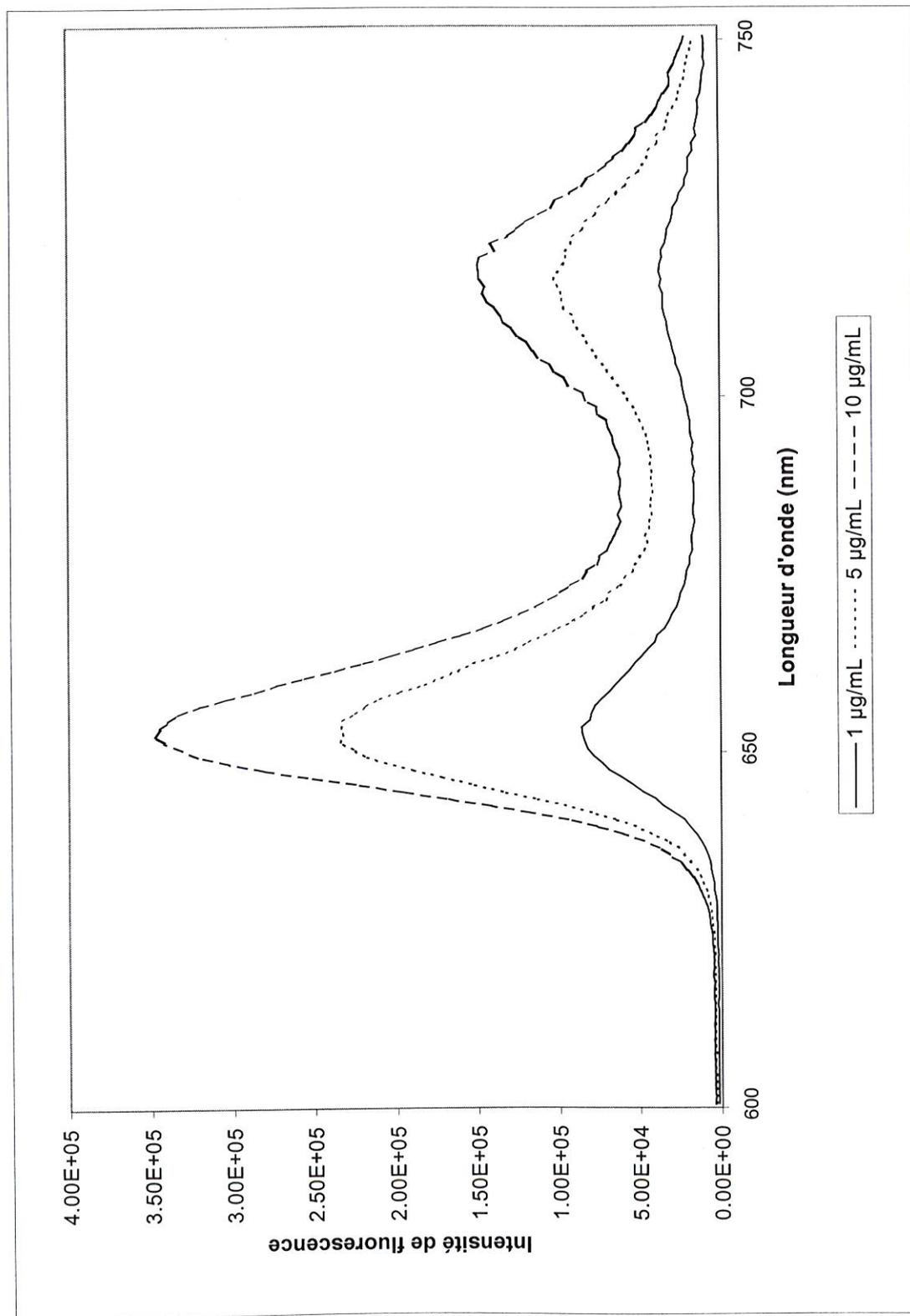
Spectres d'absorption UV-visible de la P4GluOAc dans le SVF pour 3 concentrations différentes



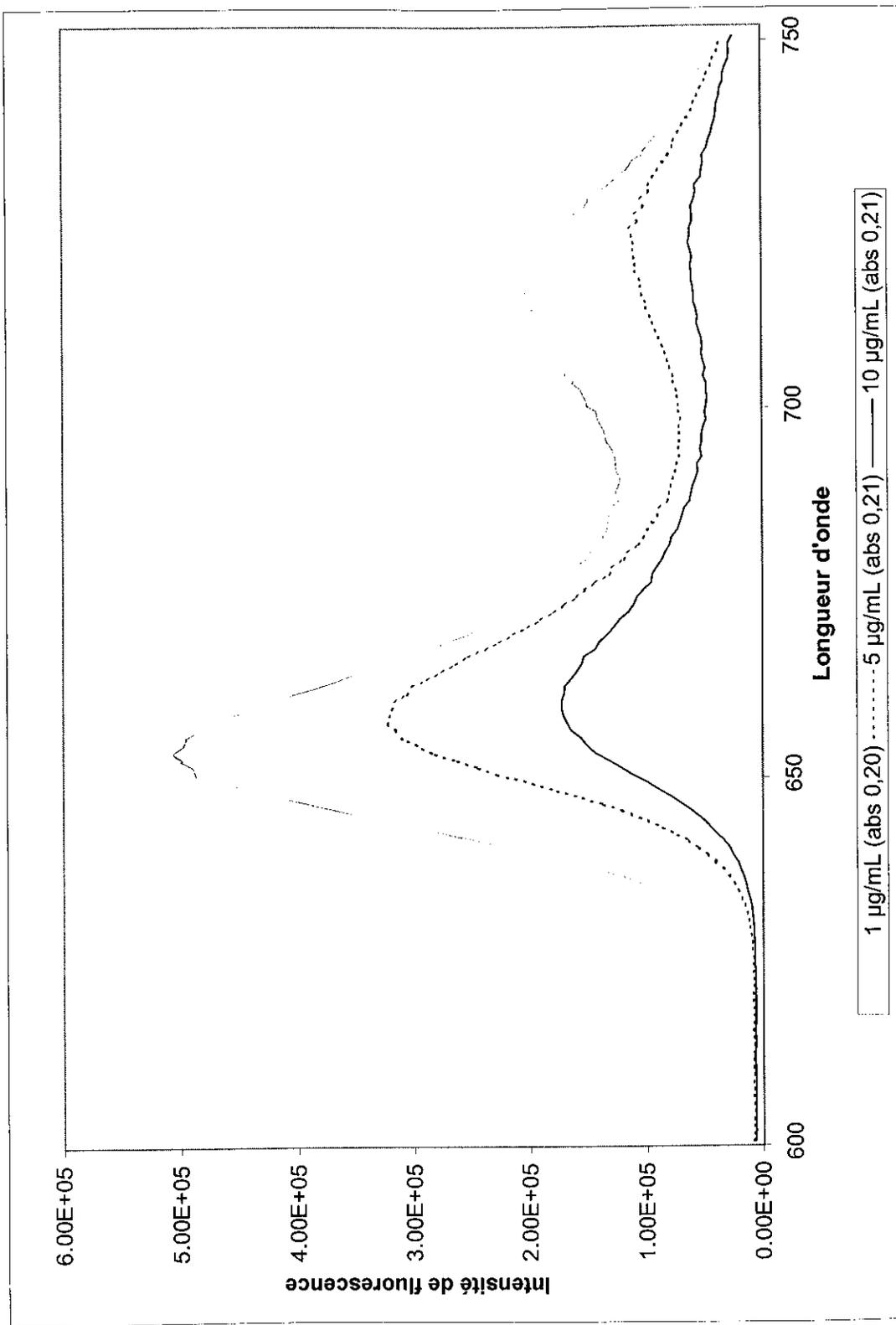
Spectres d'absorption UV-visible de la P4COOH dans le SVF pour 3 concentrations différentes



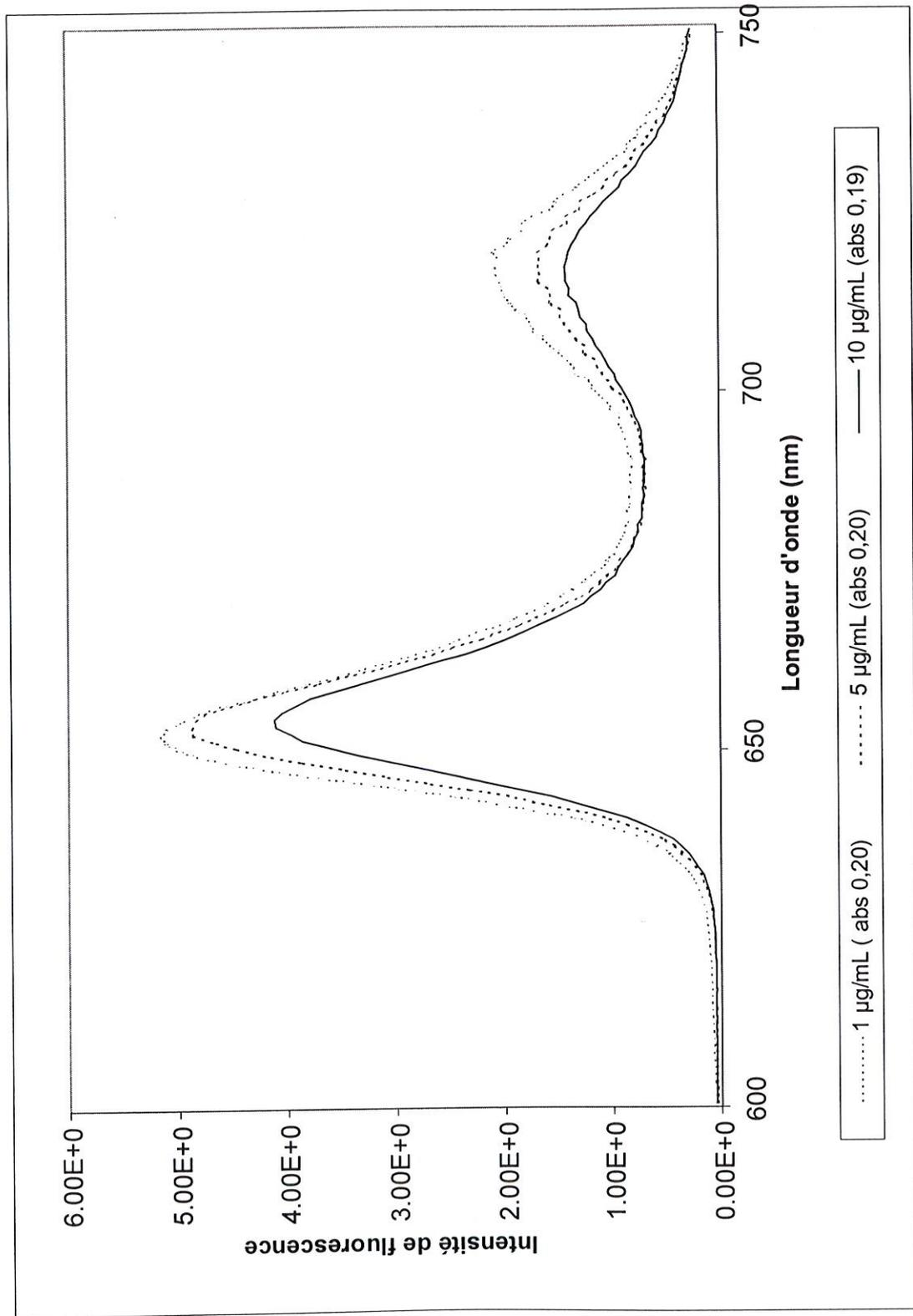
Spectres d'émission de fluorescence de la P4GluOAc dans le SVF pour 3 concentrations différentes



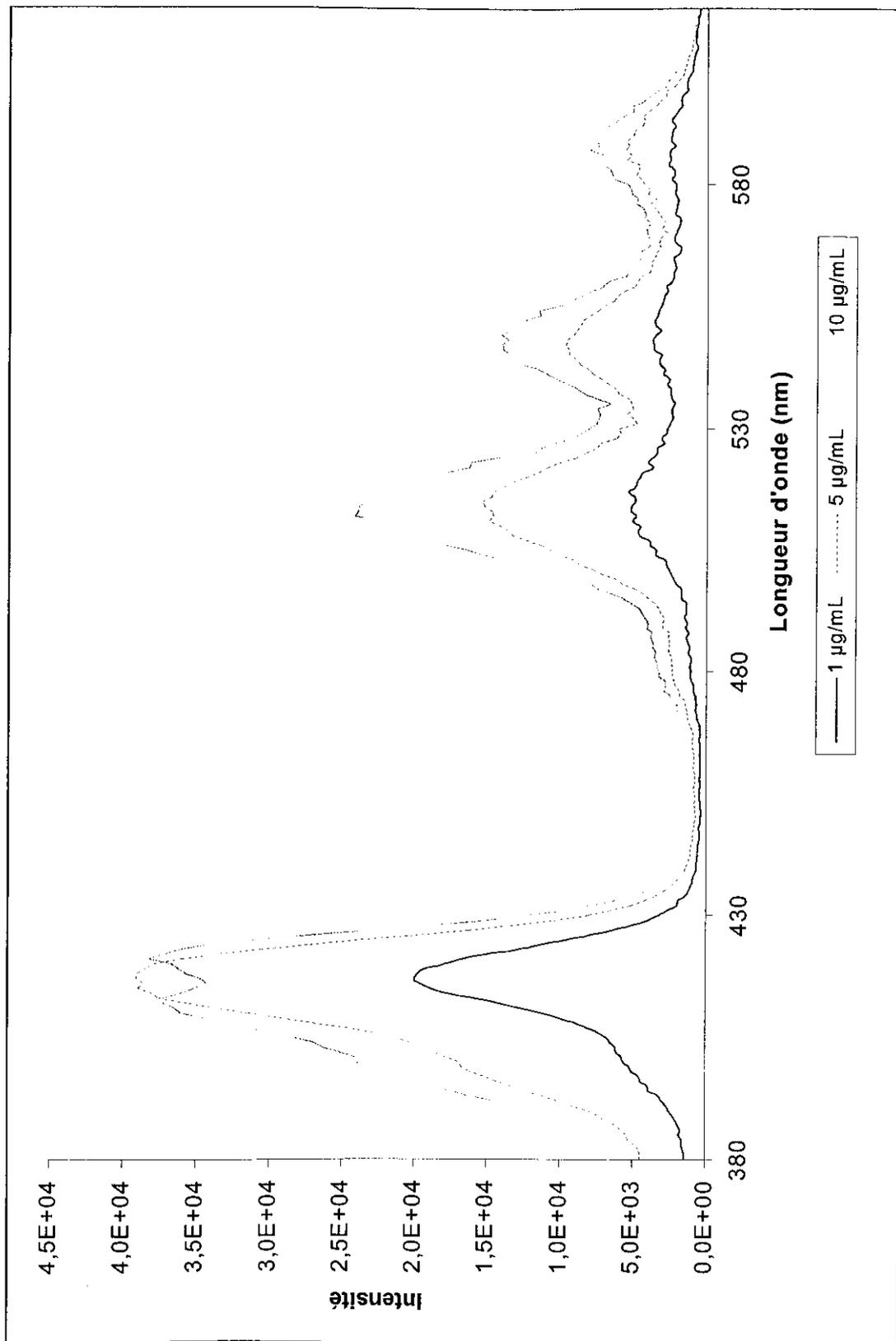
Spectres d'émission de fluorescence de la P4GluOAc dans l'éthanol pour 3 concentrations différentes



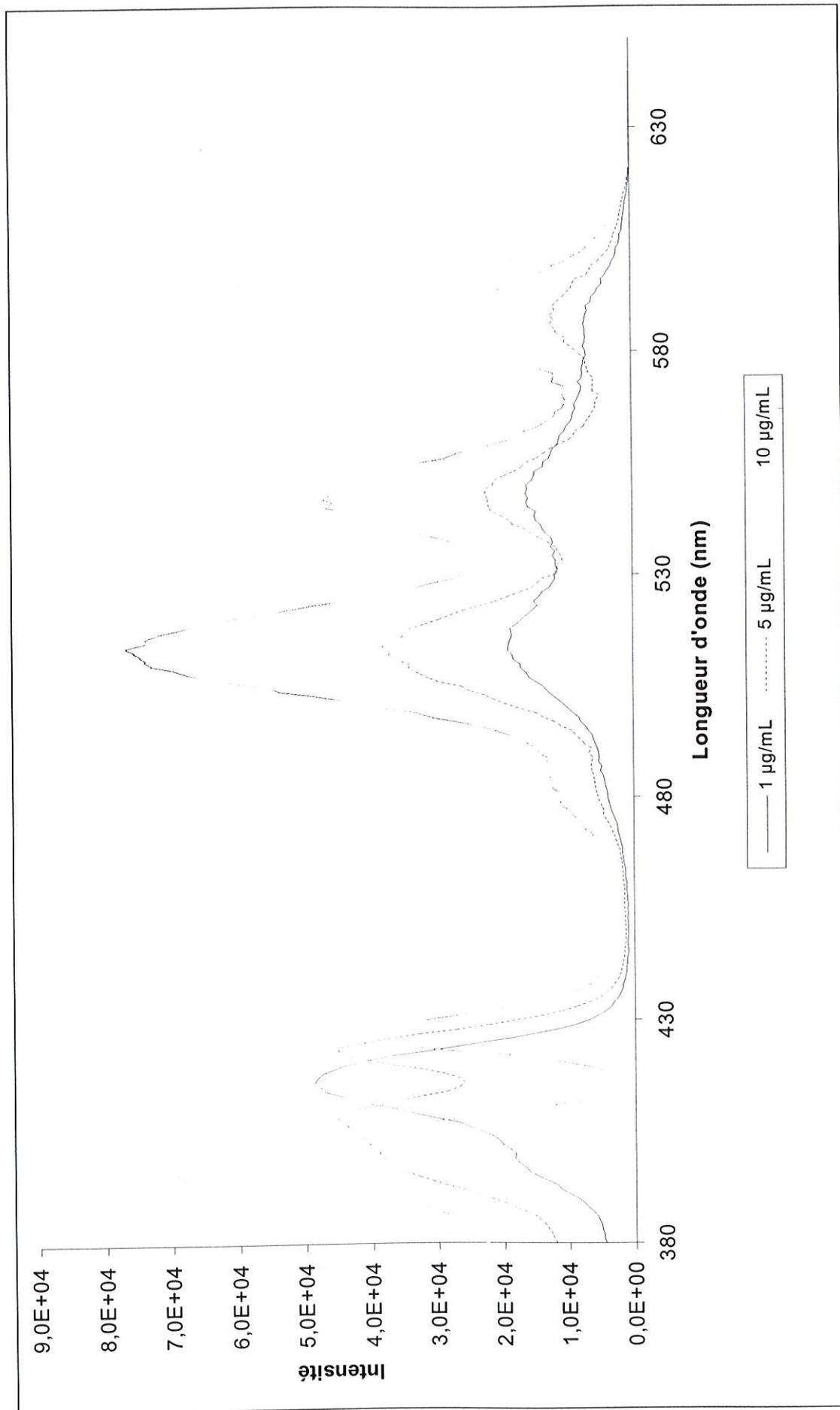
Spectres d'émission de fluorescence de la P4COOH dans le SVF pour 3 concentrations différentes



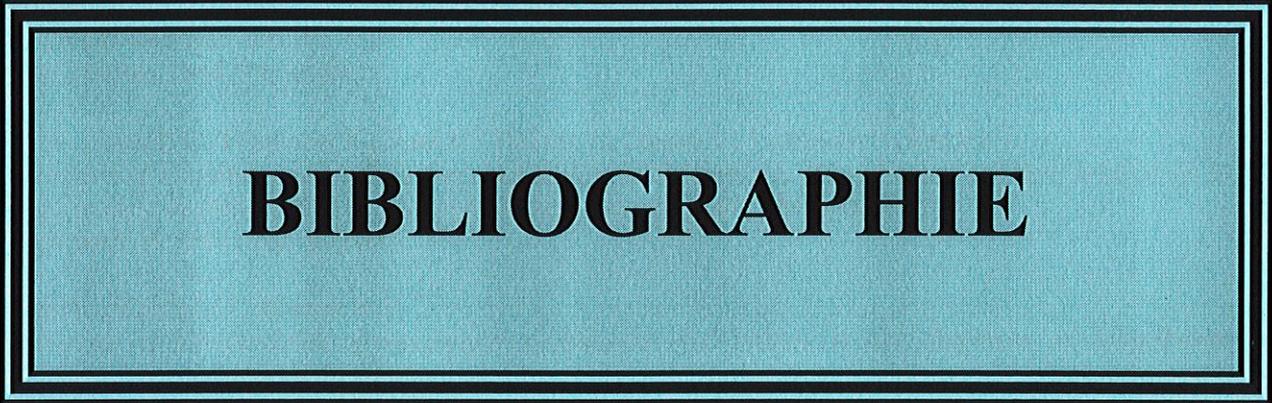
Spectres d'émission de fluorescence de la P4COOH dans l'éthanol pour 3 concentrations différentes



Spectres en excitation de la P4GluOAc dans l'éthanol



Spectres en excitation de la P4COOH dans l'éthanol



BIBLIOGRAPHIE

A

- Adams K.R., Berenbaum M.C., Bonnett R., Nizhnik A.N., Salgado A., Vallés M.A.
Second generation tumour photosensitisers : the synthesis and biological activity of octaalkyl chlorins and bacteriochlorins with graded amphiphilic character
J. Chem. Soc. Perkin Trans I., 1992, 1465-1470
- Adibnejad M.
Rotors moléculaires fluorescents. Synthèse - Etude photophysique - Applications
Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy, 1996
- Adler A.D., Longo F.R., Finarelli J.D., Goldmacher J., Assour J., Korsakoff L.
A simplified synthesis for meso-tetraphenylporphyrin
J. Org. Chem., 1967, 32, 476-480
- Agarwal M.L., Clay M.E., Harvey E.J., Evans H.H., Antunez A.R., Oleinick N.L.
Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells
Cancer Res., 1991, 51, 5993-5996
- Antonini A., Bellelli L., Bruzzesi M.R., Caputo A., Chiancone E., Mondovi B., Rossi-Fanelli A., Zito R.
Studi sul destrano e derivati del destrano. Nota III. Preparazione e proprietà del carbossil-e dietilaminoetil derivati dal destrano nativo
Giorn. Biochi., 1964, 14, 88-98
- Araki Y., Andoh H., Fujiyama Y., Hata K., Makino J., Okuno T., Nakanura F., Bamba T.
Application of 2-aminopyridine fluorescence labeling in the analysis of in vivo and in vitro metabolism of dextran sulfate sodium by size-exclusion high-performance liquid chromatography
J. Chromato. B, 2001, 753, 209-215
- Arnosti C., Keith S.C., Blough N.V.
Application of fluorescence spectroscopic techniques and probes to the detection of biopolymer degradation in natural environments
Marin. Chem., 2000, 71, 321-330
- Arsenault G.P., Bullock E., MacDonald S.F.
J. Am. Chem. Soc., 1960, 82, 4384-4389
- Arthur J., de Silva F., Stroyny N.
Spectrofluorometric determination of pharmaceuticals containing aromatic or aliphatic primary amino groups as their fluorescamine (fluram) derivatives
Anal. Chem., 1975, 47, 714-718
- Atha D., Stephens A., Rimon A., Rosenberg R.
Sequence variation in heparin oligosaccharides with high affinity for antithrombin III
J. Am. Chem. Soc., 1984, 23, 5801-5812
- Atkins T.W., Mac Callion R.L., Tighe B.J.
Incorporation and release of fluorescein isothiocyanate-linked dextrans from a bead formed macroporous hydrophilic matrix with potential for sustained release
Biomat., 1993, 14, 16-20

B

Bangar Raju B., Varadarajan T.S.

Substituent and solvent effects on the twisted intramolecular charge transfer of 3 new 7-(diethylamino)coumarin-3-aldehyde derivatives

J. Phys. Chem., 1994, **98**, 8903-8905

Bangar Raju B., Varadarajan T.S.

Photophysical properties and energy transfer dye laser characteristics of 7-(diethylamino)-3-heteroaryl coumarin in solution

Laser Chem., 1995, **16**, 109-120

Berg K., Moan J.

Lysosomes and microtubules as targets for photochemotherapy of cancer

Photochem. Photobiol., 1997, **65**, 403-409

Bigge C., Patel P., Bruce A., Goulding N., Charles M., Parekh B.

Nonselective and efficient fluorescent labeling of glycans using 2-aminobenzamide and anthanilic acid

Anal. Biochem., 1995, **230**, 229-238

Bisland S.K., Singh D., Gariépy J.

Potential of chlorin e6 photodynamic activity in vitro with peptide-based intracellular vesicles

Bioconjugate Chem., 1999, **10**, 982-992.

Biswas C.

Heparin and heparan sulfate binding sites on B-16 melanoma cells

J. Cell. Physiol., 1988, **136**, 147-153

Bittoun P., Avramaglou T., Vassy J., Chaubet F., Femandjian S.

Low molecular weight dextran derivatives (f-CMDB) enter the nucleus and are better cell-growth inhibitors compared with parents CMDB polymers

Carb. Res., 1999, **322**, 247-255

Bolton A.E., Hunter W.

The labelling of proteins to high specific radioactivities by conjugation to a ¹²⁵I-containing acylating agent

J. Biochem., 1973, **133**, 529-539

Bortner C.D., Cidlowski J.A.

A necessary role for cell shrinkage in apoptosis

Biochem. Pharmacol., 1998, **56**, 1549-1559

Bossu E., Padilla J.J., A'amar O., Michel R., Parache R.M., Notter D., Vigneron C., Guillemin F.

Determination of endogenous porphyrins and the maximal HpD tumor/normal skin ratio in SKH-1 hairless mice by light induced fluorescence spectroscopy

Artif. Cells, Blood Substitutes Immobil. Biotechnol., 1999, **27**, 109-117

Braun A.M., Maurette M.T., Oliveros E.

Technologie photochimique 1^{ère} édition, 1986

Presses polytechniques romandes, Lausanne

Brunner A., Minamitake Y., Göpferich A.

Labelling peptides with fluorescent probes for incorporation into degradable polymers

Eur. J. Pharma. Biopharma., 1998, **45**, 265-273

C

Carré M.C., Dorion C., Rebizak R., Pla F., Brembilla A., Viriot M.L.

Fluorescent molecular rotors as probes for polymers

Macromol. Symp., 1998, **127**, 173-180

Calabro A., Benavides M., Tammi M., Hascall V.C., Midura R.J.

Microanalysis of enzyme digests of hyaluronan and chondroitin/dermatan sulfate by fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE)

Glycobiol., 2000, **10**, 273-281

Carson D.A., Ribeiro J.M.

Apoptosis and disease

Lancet, 1993, **341**, 1251-1254

Castellot J.J., Wong K., Herman B., Hoover R.L., Albertini D.F., Wright T.C., Caleb B.L., Karnowski M.J.

Binding and internalisation of heparin by vascular smooth muscle cells

J. Cell. Physiol., 1985, **124**, 13-20

Chaubet F., Champion J., Maïga O., Mauray S., Jozefonvicz J.

Synthesis and structure-anticoagulant property relationships of functionalized dextrans : CMDBS

Carbohydr. Polym., 1995, **28**, 145-152

Clowes A.W., Karnowski M.J.

Suppression by heparin of smooth muscle cell proliferation in injured arteries

Nature, 1977, **265**, 625-626

Cornia M., Casiraghi G., Binacchi S., Zanardi F., Rassu G.

Facile entry to 5,10,15,20-tetra-C-glycosylporphyrins

J. Org. Chem., 1994, **59**, 1226-1230

Csik G., Balog E., Voszka I., Tölgyesi F., Oulmi D., Maillard P., Momenteau M.

Glycosylated derivatives of tetraphenyl porphyrin : photophysical characterization, self-aggregation and membrane binding

J. Photochem. Photobiol., 1998, **44**, 216-224

D

Dardoize F., Goasdoue C., Goasdoue N., Laborit H.M., Topall G.

4-hydroxybutyric acid (and analogues) derivatives of D-glucosamine

Tetrahedron, 1989, **45**, 7783-7764

Davoust E., Granet R., Krausz P., Carré V., Guilloton M.

Synthesis of glycosylated porphyrins

Tetrahedron Lett., 1999, **40**, 2513-2516

Deangelis P.L.

Polysaccharide labeling with N-methylisatoic anhydride : generation of ultraviolet chromophores and blue fluorophores

Anal. Biochem., 2000, **284**, 167-169

- Del Governatore M., Hamblin M.R., Piccinini E.E., Ugolini G., Hasan T.
Targeted photodestruction of human colon cancer cells using charged 17.1A chlorin e6 immunoconjugates
Br. J. Cancer., 2000, **82**, 56-64
- Dellinger M.
Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization : influence of the incubation protocol
Photochem. Photobiol., 1996, **64**, 182-187
- De Silva J.A.F., Strojny N.
Spectrofluorimetric of pharmaceuticals containing aromatic or aliphatic primary amino groups as their fluorescamine (floram) derivatives
Anal. Chem., 1975, **47**, 714-718
- De Smedt S.C., Meyvis T.K.L., Demeester J., Van Oostveldt P., Blonk J.C.G., Hennink W.E.
Diffusion of macromolecules in dextran methacrylate solutions and gels as studied by confocal scanning laser microscopy
Macromol., 1997, **30**, 4863-4870
- Desoize B., Sens S.
L'apoptose ou mort cellulaire programmée : concepts, mécanismes et apports en cancérologie
Bull. Cancer, 1992, **79**, 413-425
- Desoize B.
Apoptose et mort cellulaire programmée
Bull. Cancer., 1994, **81**, 670-676
- Domard A.
Les matériaux polymères à l'interface avec les sciences de la vie
Actualités GFP, 2001, **89**, 9-14
- Dougherty T.J., Lawrence G., Kaufman J.H., Boyle D., Weishaupt K.R., Goldfard A.
Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma
J. Natl. Cancer Inst., 1979, **62**, 231-237
- Dougherty T.J.
Photosensitizers : therapy and detection of malignant tumors
Photochem. Photobiol., 1987, **45**, 879-889
- Dougherty T.J.
Yearly review : Photodynamic therapy
Photochem. Photobiol., 1993, **58**, 895-900
- Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbélik M., Moan J., Peng Q.
Photodynamic therapy
J. Natl. Cancer Inst., 1998, **12**, 889-905
- Driaf K., Krausz P., Verneuil B.
Glycosylated cationic porphyrin as potential agents in cancer phototherapy
Tetrahedron Lett., 1993, **34**, 1027-1030
- Driaf K., Granet R., Krausz P., Kaouadji M., Thomasson F., Chulia A.J., Verneuil B., Spiro M., Blais J.C., Bolbach G.
Synthesis of glycosylated cationic porphyrins as potential agents in photodynamic therapy
Can. J. Chem., 1996, **74**, 1550-1563

Dumas D., Muller S., Padilla J.J., Latger V., Woodard S., Carré M.C., Blondel W., Baros F., Viriot M.L., Stoltz J.F.

New trends in optical bioengineering : applications to cell biology

Recent Res. Dev. Optical Engg., 1999, **2**, 295-315

E

El Rassi Z.

Carbohydrate analysis

J. Chromatograph., 1995, **58**, 391-553

F

Fan Q., Miller R.

Abstract SPM-E4 : Reduction of atheromatous plaque with ANITRIN® photoangioplasty

Photochem. Photobiol., 1999, **69**, 19-20

Figueiredo T.L.C., Johnstone R.A.W., Santana Sørensen A.M.P., Burget D., Jacques P.

Determination of fluorescence yields, singlet lifetimes and singlet oxygen yields of water insoluble porphyrins and metalloporphyrins in organic solvents and in aqueous media

Photochem. Photobiol., 1999, **69**, 517-528

Fischer F., Maier-Borst W., Lorenz W.J.

Photodynamic therapy as a tool for suppressing the haematogenous dissemination of tumour cells

J. Photochem. Photobiol. B : Biol., 1998, **43**, 27-33

Foote S.

Definition of type I and type II photosensitized oxidation

Photochem. Photobiol., 1991, **54**, 659-660

Frangin Y., Edmond P., Galinier E., Guilloteau D.

De la découverte de Henri Becquerel à la radiochimie. De la synthèse radiochimique à l'imagerie médicale nucléaire

L'Act. Chim., 1997, **11**, 4-12

Fuhrhop J.H., Demoulin C., Boettcher C., Köning J., Siggel U.

Chiral micellar porphyrin fibers with 2-aminoglycosamide head groups

J. Am. Chem. Soc., 1992, **114**, 4159-4165

Füllung G., Schröder D., Franck B.

Water-soluble porphyrin diglycosides with photosensitizing properties

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1989, **28**, 1519-1521

G

Gantchev T.G., Van Lier J.E.

Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulfonated metallophthalocyanines

Photochem. Photobiol., 1995, **62**, 123-124

Gaud O., Granet R., Kaouadji M., Krausz P., Blais J.C., Bolbach G.

Synthèse et analyse structurale de nouvelles méso-arylporphyrines glycosylées en vue de l'application en photothérapie des cancers

Can. J. Chem., 1996, **74**, 481-499

Geoffroy- Chapotot C.

Elaboration de sondes fluorescentes pour des applications d'intérêt biologique, et imagerie par microscopie optique en champ proche
Thèse INPL, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy, 1998

Glabe C.G., Harty P.K., Rosen S.D.

Preparation and properties of fluorescent polysaccharides
Anal. Biochem., 1983, **130**, 287-294

Goff B.A., Bamberg M., Hasan T.

Photoimmunotherapy of human ovarian carcinoma cells ex vivo
Cancer Res., 1991, **51**, 4762-4767

Grabowski Z.R., Rotkiewicz K., Siemiarczuk A., Cowley D., Baumann W.

Twisted intramolecular charge transfer states (TICT). A new class of excited states with a full charge separation
Nouv. J. Chim., 1979, **3**, 443-454

Grécias P., Migeon J.P.

Chimie 1 Sup Bio Vété, Cours et tests d'application
Technique et documentation-Lavoisier, 1987, Paris

Guery B.P., Nelson S., Viget N., Fialdes P., Summer W.R., Dobard E., Beaucaire G., Mason C.M.
Fluorescein-labeled dextran concentration is increased in BAL fluid after ANTU-induced edema in rats
J. Appl. Physiol., 1998, **85**, 842-848

H

Harenberg J., Malsch R., Piazzolo L., Huhle G., Heene D.L.

Analysis of heparin binding to human leukocytes using a fluorescein-5-isothiocyanate labeled heparin fragment
Cytometry, 1996, **23**, 59-66

Hase S., Ibuki T., Ikenaka T.

Reexamination of the pyridylamination used of fluorescence labeling of oligosaccharides and its application to glycoproteins
J. Biochem., 1984, **95**, 197-203

Hatton M.W.C., Berry L.R., Machovich R., Regoeczi E.

Tritiation of commercial heparins by reaction with NaB^3H_4 : chemical analysis and biological properties of the product
Anal. Biochem., 1980, **106**, 417-426

Haugland R.P.

Fluorescent Labels
Part 3, Biosensors with fiberoptics, Ed. Wise and Wingard, The Humana Press Inc., 1991

Henderson B.W., Bellnier D.A., Ziring B., Dougherty T.J.

Aspects of the cellular uptake and retention of hematoporphyrin derivative and their correlation with the biological response to PRT in vitro
Adv. Exp. Med. Biol., 1983, **160**, 129-138

Huang Y., Washio Y., Hara M., Toyoda H., Koshiishi I., Toida T., Imanari T.
Simultaneous derivatization of dermatan sulfate and oversulfated dermatan sulfate in plasma by HPLC with postcolumn fluorescence derivatization
Anal. Biochem., 1996, **240**, 227-234

Huynh R., Chaubet F., Jozefonvicz J.
Carboxymethylation of dextran in aqueous alcohol as the first step of the preparation of derivated dextrans
Angew. Makromol. Chem., 1998, **254**, 61-65

J

James D.A., Swamy N., Paz N., Hanson R.N., Ray R.
Synthesis and estrogen receptor binding affinity of a porphyrin-estradiol conjugate for targeted photodynamic therapy of cancer
Bioorg. Med. Chem. Lett., 1999, **9**, 2379-2384

Jeanes A.
Preparation of water-soluble dextran by enzymatic synthesis
Methods Carbohy. Chem., 1965, 127-132

Jones II G., Rahman M.
Fluorescence properties of coumarin laser dyes in aqueous polymer media. Chromophore isolation in poly(methacrylic acid) hypercoils
J. Phys. Chem., 1994, **98**, 13028-13037

Jori G., Beltrami M., Reddi E., Salvato B., Pagnan A., Ziron L., Tomio L., Tsanov T.
Evidence for a major role of plasma lipoproteins as hematoporphyrin carriers in vivo
Cancer Lett., 1984, **24**, 291-297

K

Kaldapa C., Blais J.C., Carré V., Granet R., Sol V., Guilloton M., Spiro M., Krausz P.
Synthesis of new glycosylated neutral and cationic porphyrin dimers
Tetrahedron Lett., 2000, **41**, 331-335

Kalka K., Merk H., Mukhtar H.
Photodynamic therapy in dermatology
J. Am. Acad. Dermatol., 2000, **42**, 389-413

Kelly J.F., Snell M.E.
Hematoporphyrin derivative : a possible aid in the diagnosis and the therapy of carcinoma of the bladder
J. Urol., 1976, **115**, 150-151

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

Kessel D., Luo Y.
Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis
J. Photochem. Photobiol. B : Biol., 1998, **42**, 89-95

- Kinoshita A., Sugahara K.
Microanalysis of glycosaminoglycan-derived oligosaccharides labeled with a fluorophore 2-aminobenzamide by high performance liquid chromatography : application to disaccharide composition analysis and exosequencing of oligosaccharides
Anal. Biochem., 1999, **269**, 367-378
- Kohler G., Rechthaler K.
Excited state properties and desactivation pathways of 7-aminocoumarins
Chem. Phys., 1994, **189**, 99-116
- Kohn J., Wilchek M.
A colorimetric method for monitoring activation of sepharose by cyanogen bromide
Biochem. Biophys. Res. Com., 1978, **84**, 7-14
- Krentsel L.B., Ermakov I.V., Yashin V.V., Rebrov A.I., Limanovich A.D., Platé N.A., Chaubet F., Champion J., Jozefonvicz J.
Kinetic features of the carboxymethylation of dextran and the structure of the reaction product
Polym. Sci. A, 1997, **39**, 74-80
- Kressel M., Groscurth P.
Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA
Cell Tissue Res., 1994, **278**, 549-556
- Kulapaditharom B., Boonkitticharoen V.
Photodynamic therapy for residual or recurrent cancer of the nasopharynx
J. Med. Assoc., 1999, **82**, 1111-1117

L

- Lagerberg J.W.M., Überriegler K.P., Krammer B., Van Steveninck J., Dubbelman T.M.A.R.
Plasma membrane properties involved in the photodynamic efficacy of merocyanine 540 and tetrasulfonated aluminium phthalocyanine
Photochem. Photobiol., 2000, **71**, 341-346
- Lakowicz J.R.
Principles of fluorescence spectroscopy
2nd Ed., 1999, Kluwer Academic/Plenum Publishers
- Lee C.H., Lindsey J.S.
One-flask synthesis of meso-substituted dipyrromethanes and their application in the synthesis of trans-substituted porphyrin building blocks
Tetrahedron, 1994, **50**, 11427-11440
- Letourneur D., Champion J., Slaoui F., Jozefonvicz J.
In vitro stimulation of human endothelial cells by derivatized dextrans
Dev. Biol., 1993a, **29 A**, 67-72
- Letourneur D., Logeart D., Avromaglou T., Jozefonvicz J.
Antiproliferative capacity of synthetic dextrans on smooth muscle cells growth : the model of derivatized dextrans as heparin-like polymers
J. Biomater. Sci. Polymer, 1993b, **4**, 431-444

Letourneur D., Caleb B., Castellot J.J.

Heparin binding, internalization and metabolism in vascular smooth muscle cells. I. Upregulation of heparin binding correlates with antiproliferative activity

J. Cell. Physiol., 1995, **165**, 676-686

Levy J., Obochi M.

New applications in photodynamic therapy, Introduction

Photochem. Photobiol., 1996, **64**, 737-739

Levy J.

Abstract TPM-B1 : PDT in the treatment of ocular neovasculation

Photochem. Photobiol., 1999, **69**, 48

Li H., Czuchajowski L.

Ribofuranosides N-substituted with meso-porphyrin as nucleoside-like compounds

Tetrahedron Lett., 1994, **35**, 1629-1630

Liberda J., Ticha M., Jonakova V.

Preparation of fluorescein-labelled and biotinylated derivatives of polysaccharides for lectin-saccharide binding studies

Biotechnol.Tech., 1997, **11**, 265-267

Lindsey J.S., Schreiman I.C., Hsu H.C., Kearney P.C., Marguerettaz A.M.

Rothmund and Alder-Longo reactions revisited : synthesis of tetraphenylporphyrins under equilibrium conditions

J. Org. Chem., 1987, **52**, 827-836

Lippert E., Lüder W., Boos H.

Advances in molecular spectroscopy

Pergamon Press, Oxford, 1962, **443**

Lipson R.L., Gray M.J., Baldes E.J.

Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer

Ninth Internat. Cancer Congr., Tokyo, Japan, 1966, 393 (Abstract)

Little R.G., Anton J.A., Loach P.A., Ibers J.A.

J. Heterocycl. Chem., 1975, **12**, 343-345

Logeart D., Prigent-Richard S., Jozefonvicz J., Letourneur D.

Fucans, sulphated polysaccharides extracted from brown seaweeds, inhibit vascular smooth muscle cell proliferation. I. Comparison with heparin for antiproliferative activity, binding and internalization

Eur. J. Cell Biol., 1997, **74**, 376-384

Loufty R.O., Arnold B.A.

Effect of viscosity and temperature on torsional relaxation of molecular rotors

J. Phys. Chem., 1982, **86**, 4205-4211

Lukac S.

Thermally induced variations in polarity and microviscosity of phospholipid and surfactant vesicles monitored with a probe forming an intramolecular charge-transfer complex

J. Am. Chem. Soc., 1984, **106**, 4386-4392

M

Ma L.W.E., Bjørklund E., Moan J.

Photochemotherapy of tumours with mesotetrahydroxyphenyl chlorin is pH dependent
Cancer lett., 1999, **138**, 197-201

Magda D., Wright M., Miller R.A., Sessler J.L., Sansom P.T.

Sequence-specific photocleavage of DNA by an expanded porphyrin with irradiation above 700 nm
J. Am. Chem. Soc., 1995, **117**, 3629-3630

Maïga-Revel O., Chaubet F., Jozefonvicz J.

New investigations on heparin-like derivatized dextrans : CMDBS, synergistic role of benzylamide and sulfate substituents in anticoagulant activity
Carbohyd. Polym., 1997, **32**, 89-93

Maillard P., Guerquin-Kern J.L., Momenteau M.

Glycoconjugated tetrapyrrolic macrocycles
J. Am. Chem. Soc., 1989, **111**, 9125-9127

Maillard P., Hery C., Momenteau M.

Synthesis, characterization and photocytotoxicity of a glycoconjugated meso-monoarylbenzochlorin
Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 3731-3734

Malsch R., Guerrini M., Torri G., Löhr G., Casu B., Harenberg J.

Synthesis of a N'-Alkylamine anticoagulant active low-molecular-mass heparin for radioactive and fluorescent labeling
Anal. Biochem., 1994, **217**, 255-264

Marchessault R.H.

Carbohydrate polymers : nature's high-performance materials
Chemtech september, 1984, 542-552

Margalit R., Shaklai N., Cohen S.

Fluorimetric studies on the dimerisation equilibrium of protoporphyrin IX and its haemato derivative
J. Biochem., 1983, **209**, 547-552

Mauzac M., Jozefonvicz J.

Anticoagulant activity of dextrans derivatives. Part I : Synthesis and characterisation
Biomat., 1984, **5**, 301-304

Mayer A., Neueenhofer S.

Luminescent labels - More than just an alternative to radioisotopes ?
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1994, **33**, 1044-1072

Mehta G., Sambaiah T., Maiya B.G., Sirish M., Chatterjee D.

Synthesis and nuclease activity of some "porphyrin-acridone" hybrid molecules
J. Chem. Soc. Perkin Trans. I., 1993, 2667-2669

Melnikova V.O., Bezdetsnaya L.N., Bour C., Festor E., Gramain M.P., Merlin J.L., Potapenko A.Y., Guillemin F.

Subcellular localization of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment
J. Photochem. Photobiol. B : Biol., 1999, **49**, 96-103

- Mikata Y., Onchi Y., Tabata K., Ogura S.I., Okura I., Ono H., Yano S.
Sugar-dependent photocytotoxic property of tetra- and octa-glycoconjugated tetraphenylporphyrins
Tetrahedron Lett., 1998, **39**, 4505-4508
- Miller A.W., Eklund S.H., Robyt J.F.
*Milligram to gram scale purification and characterization of dextransucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-512F*
Carbohydr. Res., 1986, **147**, 119-133
- Miller J.
Photodynamic therapy : the sensitization of cancer cells to light
J. Chem. Ed., 1999, **76**, 592-594
- Moan J.
Porphyrin photosensitization and phototherapy
Photochem. Photobiol., 1986, **43**, 681-690
- Moan J., Peng Q., Evensen J.F., Berg K., Western A., Rimington C.
Photosensitizing efficiencies, tumor and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer
Photochem. Photobiol., 1987, **46**, 713-721
- Moan J., Ma L.W., Bjorklund E.
The effect of glucose and temperature on the in vivo efficiency of Photochemotherapy with meso-tetrahydroxyphenylchlorin
J. Photochem. Photobiol. B : Biol., 1999, **50**, 94-98
- Moghissi K., Dixon K., Thorpe J.A., Stringer M., Moore P.J.
The role of photodynamic therapy (PDT) in inoperable oesophageal cancer
Eur. J. Cardiothorac. Surg., 2000, **17**, 95-100
- Monsigny M., Roche A.C., Midoux P., Mayer R.
Glycoconjugates as carriers for specific delivery of therapeutic drugs and genes
Adv. Drug Deliv. Rev., 1994, **14**, 1-24
- Montforts F.P., Meier A., Scheurich G., Haake G., Bats J.W.
Chlorins designed for photodynamic tumor therapy and as model systems for photosynthesis
Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1992, **31**, 1592-1594
- O**
- Ochsner M.
Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours
J. Photochem. Photobiol B : Biol., 1997, **39**, 1-18
- Ono N., Bougauchi M., Maruyama K.
Water-soluble porphyrins with four sugar molecules
Tetrahedron Lett., 1992, **33**, 1629-1632
- O'Shea M.G., Samuel M.S., Konik C.M., Morell M.K.
Fluorophore-assisted carbohydrate electrophoresis (FACE) of oligosaccharides : efficiency of labelling and high resolution separation
Carbohydr. Res., 1998, **307**, 1-12

Ost D.

Photodynamic therapy in lung cancer

Oncology (Huntingt)., 2000, **14**, 379-386

Oulmi D., Maillard P., Guerquin-Kern J.L., Huel C., Momenteau M.

Glycoconjugated porphyrins. 3. Synthesis of flat amphiphilic mixed meso-(glycosylated aryl)arylporphyrins and mixed meso-(glycosylated aryl)alkylporphyrins bearing some mono- and disaccharide groups

J. Org. Chem., 1995, **60**, 1554-1564

Oulmi D., Maillard P., Vever-Bizet C., Momenteau M., Brault D.

Glycosylated porphyrins : Characterization of association in aqueous solutions by absorption and fluorescence spectroscopies and determination of singlet oxygen yield in organic media

Photochem. Photobiol., 1998, **67**, 511-518

Overhaus M., Heckenkamp J., Kossodo S., Leszczynski D., La Muraglia G.M.

Photodynamic therapy generates a matrix barrier to invasive vascular cell migration

Circ. Res., 2000, **86**, 334-340

P

Pandey R.K., Dougherty T.J., Smith K.M.

Syntheses of hematoporphyrin dimers and trimers with ether linkages

Tetrahedron Lett., 1988, **29**, 4657-4660

Pandey R.K., Shiau F.Y., Medforth C.J., Dougherty T.J., Smith K.M.

Syntheses, stability and tumorcidal activity of porphyrin dimers and trimers with ether linkages

Tetrahedron Lett., 1990, **31**, 7399-7402

Pandey R.K., Jagerovic N., Ryan J.M., Dougherty T.J., Smith K.M.

Syntheses and preliminary in vivo photodynamic efficacy of benzoporphyrin derivatives from phylloerythrin and rhodoporphyrin XV methyl esters and aspartyl amides

Tetrahedron, 1996, **52**, 5349-5362

Pasternack R.F., Huber P.R., Boyd P., Engasser G., Francesconi L., Gibbs E., Fasella P., Cerio Ventura G., Hinds L. de C.

On the aggregation of meso-substituted water-soluble porphyrins

J. Am. Chem. Soc., 1972, **94**, 4511-4517

Prigent-Richard S., Cansell M., Vassy J., Viron A., Puvion E., Jozefonvicz J., Letourneur D.

Fluorescent and radiolabelling of polysaccharides : binding and internalization on vascular cells

J. Biomed. Mater. Res., 1998, **40**, 275-281

R

Rettig W.

Charge separation in excited states of decoupled systems-TICT compounds and implications regarding the development of new lasers dyes and the primary processes of vision and photosynthesis

Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 1986, **25**, 971-988

Rettig W.

Photoinduced charge separation via twisted intramolecular charge transfer

Dans "Topics in current chemistry"

Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1994, **169**, 253-299

- Reyftmann J.P., Morliere P., Goldstein S., Santus R., Dubertret L., Lagrange D.
Interaction of human serum low density lipoproteins with porphyrins : a spectroscopic and photochemical study
Photochem. Photobiol., 1984, **40**, 721-729
- Rezzoug H., Bezdetnaya L., A'amar O., Merlin J.L., Guillemin F.
Parameters affecting photodynamic activity of Foscan® or Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) in vitro and in vivo
Lasers Med. Sci., 1998, **13**, 119-125
- Richter A.M., Meadows H., Jain A.K., Neyndorff H., Moreno G., Salet C., Levy J.G.
Photosensitizing potencies of the structural analogues of benzoporphyrin derivative in different biological test systems
Clin. Laser. Med. Surg., 1996, **5**, 335-341
- Rodal G.H., Rodal S.K., Moan J., Berg K.
Liposome-bound Zn(II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization
J. Photochem. Photobiol. B : Biol., 1998, **45**, 150-159
- Rothemund P., Menotti A.R.
Porphyrin Studies. IV. The synthesis of $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ -tetraphenylporphine
J. Am. Chem. Soc., 1941, **63**, 267-270
- Rothemund B., Rettig W.
Emissive solute-solvent exciplexes in derivatives of DMABN
XVIIIth International Conference on Photochemistry, 3-8 août 1997, Varsovie, Pologne
- Rothenberg E., Hayes K., Toomre D., Manzi E., Varki A.
Biotinilated diaminopyridine : an approach to tagging oligosaccharides and exploring their biology
Biol. Proc. Nat. Acad., 1993, **90**, 11939-11943
- Rück A., Diddens H.
Uptake and subcellular distribution of photosensitizing drugs in malignant cells
The fundamental basis of phototherapy
Ed. Honigsmann H., Jori G., Young A., 1996, 209-227. OEMF, Milano
- S**
- Sailer R., Strauss W.S.L., Emmert H., Stock K., Steiner R., Schneckenburger H.
Plasma membrane associated location of sulfonated meso-tetraphenylporphyrins of different hydrophilicity probed by total internal reflection fluorescence spectroscopy
Photochem. Photobiol., 2000, **71**, 460-465
- Samali A., Nordgren H., Zhivotovsky B., Peterson E., Orrenius S.
A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells : oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis
Biochem. Biophys. Res. Commun., 1999, **255**, 6-11
- Santus R.
Récents développements en photochimiothérapie anticancéreuse
Path. Biol., 1991, **39**, 54-58

Schell C., Hombrecher H.K.

Synthesis and investigation of glycosylated mono- and diarylporphyrins for photodynamic therapy
Bioorg. Med. Chem., 1999, **7**, 1857-1865

Schuitmaker J.J., Baas P., Van Leengoed H.L.L.M., Van der Meulen F.W., Star W.M., Van Zandwijk N.
Photodynamic therapy : a promising new modality for the treatment of cancer
J. Photochem. Photobiol. B : Biol., 1996, **34**, 3-12

Science et vie, mai 2001, **1004**, 60-72

Segura Carretero A., Cruces-Blanco C., Fernandez Peinado S., El Bergmi R., Fernandez Gutiérrez A.
Fluorimetric determination of procaine in pharmaceuticals preparations based on its reaction with fluorescamine
J. Pharm. Biomed. Anal., 1999, **21**, 969-974

Sessler J.L., Murai T., Lynch V., Cyr M.
An Expanded Porphyrin : The Synthesis and Structure of a New Aromatic Pentadentate Ligand
J. Am. Chem. Soc., 1988, **110**, 5586-5588

Sessler J.L., Mody T.D., Hemmi G.W., Lynch V.
Synthesis and structural characterization of lanthanide(III) texaphyrins
Inorg. Chem., 1993, **32**, 3175-3187

Sessler J.L., Miller R.A.
Texaphyrins : New drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy
Biochem. Pharmacol., 2000, **59**, 733-739

Shworak N., Shirakawa M., Collic-Jouault S., Liu J., Milligan R., Birinyi L., Rosenberg R.
Pathway-specific regulation of the synthesis of anticoagulant active heparan sulfate
J. Biol. Chem., 1994, **269**, 24941-24952

Sobolev A.S., Jans D., Rosenkranz A.A.
Targeted intracellular delivery of photosensitizers
Prog. Biophys. Mol. Biol., 2000, **73**, 51-90

Sogawa K., Takahashi K.
Use of fluorescamine-labeled casein as a substrate for assay of proteinases
J. Biochem., 1978, **83**, 1783-1787

Sol V., Blais J.C., Bolbach G., Carré V., Granet R., Guilloton M., Spiro M., Krausz P.
Toward glycosylated peptidic porphyrins : a new strategy for PDT?
Tetrahedron Lett., 1997, **38**, 6391-6394

Sol V., Blais J.C., Carré V., Granet R., Guilloton M., Spiro M., Krausz P.
Synthesis, spectroscopy and photocytotoxicity of glycosylated amino acid porphyrin derivatives as promising molecules for cancer phototherapy
J. Org. Chem., 1999, **64**, 4431-4444

Spikes J.D.

Phthalocyanines as photosensitizers in biological systems and for the photodynamic therapy of tumors
Photochem. Photobiol., 1986, **43**, 691-699

Stearns A., Prigent-Richard S., Letourneur D., Castellot J.J., Jr.
Synthesis and characterization of highly sensitive heparin probes for detection of heparin-binding proteins
Anal. Biochem., 1997, **247**, 348-356

Suda Y., Sumi M., Sobel M., Ottenbrite R.M.
Selective labeling of bioactive polysaccharides with a new fluorescent reagent
J. Bioact. Comp. Polym., 1990, **5**, 412-419

Sternberg E.D., Dolphin D., Brückner C.
Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy
Tetrahedron Lett., 1998, **54**, 4151-4202

Stryer L.
La biochimie
4^{ème} édition, 1997, Médecine-Sciences Flammarion, Paris

Sylvain I., Benhaddou R., Carré V., Cottaz S., Driguez H., Granet R., Guilloton M., Krausz P.
Synthesis and biological evaluation of thioglycosylated meso-arylporphyrins
J. Porphyrins Phthalocyanines, 1999, **3**, 1-4

T

Tappeiner H.
Über die Wirkung fluoreszierender Stoffe auf Infusorien nach Versuchen von O. Raab
Med. Wochenschr., 1900, **47**, 5

Tappeiner H., Jodlbauer A.
Über die Wirkung der photodynamischen Stoffe auf Protozoen und Enzyme
Deutsches Anal. Klin. Med., 1904, **39**, 427-487

Thomas J.P., Girotti A.W.
Glucose administration augments in vivo uptake and phototoxicity of the tumor-localizing fraction of hematoporphyrin derivative
Photochem. Photobiol., 1989, **49**, 241-247

Trauner K.B., Hasan T.
Photodynamic treatment of rheumatoid and inflammatory arthritis
Photochem. Photobiol., 1996, **64**, 740-750

Tsuchida T., Zheng G., Pandey R.K., Potter W.R., Bellnier D.A., Henderson B.W., Kato H., Dougherty T.J.
Correlation between site II-specific human serum albumin (HSA) binding affinity and murine in vivo photosensitizing efficacy of some Photofrin[®] components
Photochem. Photobiol., 1997, **66**, 224-228

U

Uchiyama H., Nagasawa K.
Preparation of biologically active fluorescent heparin composed of fluorescein-labeled species and its behavior to antithrombin III
J. Biochem., 1981, **89**, 185-192

Udenfriend S., Stein S., Böhlen P., Dairan W., Leimgruber W., Weigele M.
Fluorescamine : a reagent for assay of amino acids, peptides, proteins and primary amines in picomole range
Science, 1972, **178**, 871-872

V

Valeur B.
Fluorescent probes for evaluation of local and structural parameters
Molecular Luminescence Spectroscopy
77, Part 3, Ed. Stephen G. Schulman, 1993

Van der Bijl P., Van Eyk A.D., Thompson I.O.C.
Penetration of human vaginal and buccal mucosa by 4,4-kd and 12-kd fluorescein-isothiocyanate-labeled dextrans
Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod., 1998, **8**, 686-691

Van Gompel J., Schuster G.B.
Chemiluminescence of organic peroxides : intramolecular electron-exchange luminescence from a secondary perester
J. Org. Chem., 1987, **52**, 1465-1468

Vassiliou G., Jakobsen K., Parish C.R.
Detection of low-affinity adhesion ligands by linking recombinant cell adhesion molecules in uniform orientation to a fluorescently labelled dextran molecule by means of hexahistidine tagging : the case of multimeric CD40
J. Immunol. Methods, 1998, **215**, 9-15

Vaux D.L., Strasser A.
The molecular biology of apoptosis
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1996, **93**, 2239-2244

Viriot M.L., Bouchy M., Donner M., André J.C.
Kinetics of partly diffusion controlled reactions XII. Intramolecular excimers as fluorescent probes of the microviscosity of living cells
Photochem. Photobiophys., 1983, **5**, 293-306

Viriot M.L., André J.C.
Fluorescent dyes : a search for new tracers
Analisis, 1989, **17**, 97-111

Viriot M.L., Carré M.C., Geoffroy-Chapotot C., Brembilla A., Muller S., Stoltz J.F.
Molecular rotors as fluorescent probes for biological studies
Clin. Hemorheol. Microcirc., 1998, **19**, 151-160

Voet D., Voet J.G.
Biochimie 2^{ème} édition, 1998, De Boeck université, Paris

W

Weil J.H., Boulanger J., Chambon P., Dubertret G., Gautheron D., Kedinger C., Lazdunski M., Montreuil J., Patte J.C., Rebel G., Rossignol J.M., Shechter E., Wright M.
Biochimie générale 7^{ème} édition, 1994, Masson, Paris

Weishaupt K.R., Gomer C.J., Dougherty T.J.

Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor
Cancer Res., 1976, **36**, 2326-2329

Wilson R., Schiffrin D.J.

Use of fluorescamine for the spectrofluorimetric investigation of primary amines on silanized glass and indium tin oxide-coated glass
Analyst., 1995, **120**, 175-178

Woodburn K.W., Vardaxis N.J., Hill J.S., Haye A.H., Phillips D.R.

Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy
Photochem. Photobiol., 1991, **54**, 725-732

Woodburn K.W., Vardaxis N.J., Hill J.S., Kaye A.H., Reiss J.A., Phillips D.R.

Evaluation of porphyrin characteristics required for photodynamic therapy
Photochem. Photobiol., 1992, **55**, 697-704

Z

Zenkevich E., Sagun E., Knyukshto V., Shulga A., Mironov A., Efremova O., Bonnett R., Songca S.P., Kassem M.

Photophysical and photochemical properties of potential porphyrin and photosensitizers for PDT
J. Photochem. Photobiol., 1996, **33**, 171-180

Zusatz B.

Synthèse de rotors moléculaires fluorescents pour diverses applications de marquage
DEA Génie des Procédés, DCPR (GRAPP), ENSIC, Nancy, 1997

BILAN DES ACTIVITES SCIENTIFIQUES

DEA Chimie et Physico-Chimie Moléculaires (juin 1998)

Etude de la réaction de phosphorylation de mimes de lecithines et de lysolécithines

Laboratoire de Chimie-Physique Organique et Colloïdale, URA 406 CNRS, UHP NANCY I

Responsable : Pr C. SELVE

Publications

- P(1) L. DZIADOSZ, P. EVEN, A. BREMBILLA, M.C. CARRE, M. ADRIAN, P. LOCHON, M.L. VIRIOT, *Fluorescence et cryo-met pour la caractérisation de copolymères à blocs*, Synthetic Polymer Journal, 7, 162-170 (2000)
- P(2) C. MULLER, P. BERROY, P. EVEN, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE, *Fluorescent photolabile groups of interest in DNA arrays*. Luminescence, 15, 112-113 (2000)
- P(3) P. EVEN, M.H. TEITEN, P. BURGOS, C. FROCHOT, F. BAROS, M.C. CARRE, L. BOLOTINE, J.L. MERLIN, F. GUILLEMIN, M.L. VIRIOT. *Fluorescence et imagerie : applications en thérapie photodynamique*. Récents Progrès en Génie des Procédés (Visualisation, Image, Modélisation), Tech. Doc. Lavoisier, Cachan, 15 (78), 121-127 (2001)
- P(4) C. MULLER, P. EVEN, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE, *Protection and labeling of thymidine by a fluorescent photolabile group*, Helvetica Chimica Acta, 84, 3735-3741 (2001)
- P(5) M.H. TEITEN, P. EVEN, P. BURGOS, C. FROCHOT, F. BAROS, M.C. CARRE, L. BOLOTINE, J.L. MERLIN, F. GUILLEMIN, M.L. VIRIOT, *Specific fluorescent tracers. Imaging and applications for photodynamic therapy*, Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (2001), sous presse
- P(6) P. EVEN, F. CHAUBET, D. LETOURNEUR, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE *Coumarin-like fluorescent molecular rotors for bioactive polymers probing*, Biorheology, (2001), sous presse

Participations à des Congrès

Communications orales et affiches (* pour la (les) personne(s) qui ont participé)

Congrès Internationaux

- C_i(1) IV^{ème} Colloque Franco-Roumain sur les Polymères, 1-3 septembre 1999, Montpellier
Présentation d'une affiche : *Fluorescence et Cryo-Tem pour la caractérisation de copolymères à blocs*
L. DZIADOSZ, P. EVEN*, A. BREMBILLA, M.C. CARRE, M. ADRIAN, P. LOCHON, M.L. VIRIOT
- C_i(2) II^{ème} Rencontres Franco-Belges de Chimie Organique, 12-13 mai 2000, Pont-à-Mousson
Présentation d'une affiche : *Groupes photolabiles fluorescents pour la protection et le marquage des désoxynucléosides*
C. MULLER*, P. BERROY, P. EVEN*, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE

- C_i(3) IX^{ème} Symposium International de Spectrométrie de Luminescence Appliquée à l'analyse dans le Biomédical et dans l'Environnement, 15-17 mai 2000, Montpellier
Présentation d'une affiche : *Fluorescent photolabile groups of interest in DNA arrays*
C. MULLER*, P. EVEN*, P. BERROY, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE
- C_i(4) XVIIIth Symposium on Photochemistry, 22-27 juillet 2000, Dresden (Allemagne)
Présentation d'une affiche : *Fluorescent photolabile groups for 5'-OH deoxynucleosides protection*
P. BERROY, C. MULLER, P. EVEN, M.L. VIRIOT*, M.C. CARRE
- C_i(5) Conférence invitée : Centro de Quimica Fisica Molecular, Instituto Superior Tecnico, 13 novembre 2000, Lisbonne (Portugal)
Groupes protecteurs photolabiles des nucléosides pour les puces à ADN
P. BERROY, C. MULLER, P. EVEN, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE*
- C_i(6) Euromech Colloquium N°420 Mechanobiology of Cells and Tissues, 24-26 avril 2001, Nancy
Présentation d'une affiche : *Coumarin-like Fluorescent Molecular Probes for Bioactive Polymers Probing*
P. EVEN*, F. CHAUBET, D. LETOURNEUR, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE
- C_i(7) IV^{ème} Colloque Franco-Québécois, de la structure des polymères aux procédés d'élaboration, 5-6 juillet 2001, Nancy
Polymères bioactifs fluorescents : synthèse, caractérisation et visualisation par microscopie de fluorescence
P. EVEN*, J. CHAMPION, F. CHAUBET, D. LETOURNEUR, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE
- C_i(8) V^{ème} Colloque Franco-Roumain sur les Polymères, 3-7 septembre 2001, Timisoara (Roumanie)
Présentation d'une affiche : *Fluorescent dextran derivatives*
P. EVEN, C. FROCHOT*, F. CHAUBET, D. LETOURNEUR, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE
- C_i(9) 7th Conference on Methods and Applications of Fluorescence : Spectroscopy, Imaging and Probes, 16-19 septembre 2001, Amsterdam (Pays-Bas)
Présentation d'une affiche : *Fluorescent dextran derivatives*
P. EVEN, F. CHAUBET, C. FROCHOT*, D. LETOURNEUR, M.L. VIRIOT*, M.C. CARRE
- C_i(10) Updates in Photochemical Technology, 21 septembre 2001, Karlsruhe (Allemagne)
Présentation d'une affiche : *Fluorescence imaging. Applications in Photodynamic Therapy*
C. FROCHOT*, M.H. TEITEN, P. EVEN, M.C. CARRE, L. BOLOTINE, J.L. MERLIN, F. GUILLEMIN, M.L. VIRIOT*
- C_i(11) 4th International Symposium on Photodynamic Diagnostic and Therapy in Clinical Practise, 10-13 octobre 2001, Brixen (Italie)
Présentation d'une affiche : *Fluorescence imaging. Applications in Photodynamic Therapy*
C. FROCHOT*, M.H. TEITEN, P. EVEN, M.C. CARRE, L. BOLOTINE, J.L. MERLIN, F. GUILLEMIN, M.L. VIRIOT

Congrès Nationaux

- C_n(12) 7^{ème} Rencontres « Lumières sur les Systèmes Moléculaires Organisés », 20-22 juin 2000, Marly le Roi
Communication orale : *Groupes photolabiles fluorescents pour la protection et le marquage des desoxynucléosides*
C. MULLER*, P. BERROY, P. EVEN*, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE
- C_n(13) 30^{ème} colloque du GFP, 21-23 novembre 2000, Paris
Présentation d'une affiche : *Des rotors moléculaires fluorescents pour l'études des polymères bioactifs*
P. EVEN*, F. CHAUBET, D. LETOURNEUR, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE
- C_n(14) Congrès AcM (Acquisition conduite par le Modèle)/MdA, Grenoble, 23-24 nov. 2000, Présentation d'une affiche : *Traceurs fluorescents spécifiques. Imagerie et applications en thérapie photodynamique*
P. EVEN, P. BURGOS, C. FROCHOT*, S. AUBERT, M.C. CARRE, M.L. VIRIOT*, L. BOLOTINE, M.H. TEITEN, J.L. MERLIN, F. GUILLEMIN.
- C_n(15) Visualisation Image Modélisation, 15-17 mai 2001, Nancy
Présentation d'une affiche : *Fluorescence et imagerie : Applications en thérapie photodynamique*
P. EVEN*, M.H. TEITEN, P. BURGOS, C. FROCHOT, L. BOLOTINE, F. BAROS, M.C. CARRE, J.L. MERLIN, F. GUILLEMIN, M.L. VIRIOT*

Rapport

Rapport scientifique de fin de programme ANVAR (décembre 99, Programme d'Innovation Jeunes n° J99 06 043 L JJ - ENSIC)
Synthèses et Applications de Groupes Photolabiles Fluorescents dans la Fabrication de « Puces à ADN »
C. COMBE, C. MULLER, P. BERROY, P. EVEN, M.L. VIRIOT, M.C. CARRE

Encadrement

- Encadrement d'un DEA « Génie des Procédés », ENSIC, 1999
C. COMBE, *Fluorescence de rotors moléculaires pour la caractérisation de polymères*
- Encadrement d'une Microthèse et d'une Thèse d'Exercice en Pharmacie, ENSIC, 2000
S. AUBERT, *Nouveaux photosensibilisants pour la thérapie photodynamique*
- Encadrement d'un stage de Maîtrise de Chimie-Physique, ENSIC, 2001
H. ALEM, *Synthèse et étude de composés glycosylés en vue d'applications biologiques*

Enseignement

Enseignement (6 heures) : Cours théorique et pratique d'initiation aux spectroscopies UV-visible et fluorimétrie. Niveau : Licence et Maîtrise I.U.P., Ingénierie de la Santé, UHP, Nancy, février 2000

Stages et Formation

Formations CNRS

- VIII^{ème} Séminaire Adhésion-Agrégation des Microorganismes, 21-23 février 2000, Faculté de Pharmacie, Nancy
- Initiation aux Plans d'Expérience, 20-21 février 2000, Nancy

Stages

- Laboratoire de Recherches sur les Macromolécules, Paris : Plusieurs séjours d'initiation à la culture cellulaire
- Instituto Superior Technico, Centro de Quimica Fisica Molecular, Lisbonne : Initiation à la fluorescence en excitation laser pulsé (4 au 10 septembre 1999)

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

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame BARDEZ Elisabeth, Professeur, CNAM, Paris

Monsieur LETOURNEUR Didier, Chargé de Recherche, Faculté de Médecine Bichat, Paris

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

Mademoiselle EVEN Pascale

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

**"Elaboration de sondes fluorescentes pour des applications en biologie et imagerie par
microscopie de fluorescence".**

en vue de l'obtention du titre de :

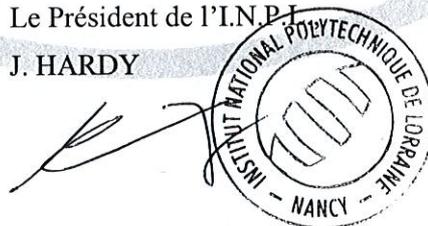
DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Génie Biologique** »

Fait à Vandoeuvre, le 09 octobre 2001

Le Président de l'I.N.P.L.

J. HARDY



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANDŒUVRE CEDEX

Service Commun de la Documentation
INPL
Nancy-Brabois

TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

ELABORATION DE SONDES FLUORESCENTES POUR DES APPLICATIONS EN BIOLOGIE ET IMAGERIE PAR MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE

Les travaux réalisés ont eu comme objectif de développer les méthodes optiques pour des études en biologie avec comme point de départ la synthèse chimique de sondes fluorescentes pour deux applications visant d'une part, les interactions biopolymères - cellules et d'autre part, la thérapie photodynamique (PDT).

La première partie est consacrée à la synthèse et à l'étude de polymères bioactifs de type polysaccharide, marqués par des rotors moléculaires fluorescents. Le travail a porté sur la synthèse et l'étude photophysique des dérivés coumarine associés à des dextrans bioactifs (CMDB) et à l'héparine. Les tests biologiques confirment la potentialité de la méthode : les CMDB fluorescents conservent l'action proliférative sur les cellules endothéliales ; l'internalisation des CMDB et de l'héparine fluorescents, respectivement dans des cellules endothéliales et musculaires lisses a pu être visualisée par microscopie de fluorescence.

La deuxième partie est consacrée au développement de nouveaux photosensibilisants pour la PDT. La PDT est un traitement médical de lutte contre certains types de cancer basé sur l'utilisation combinée d'un photosensibilisant (souvent des dérivés de porphyrine), de l'oxygène et de la lumière. Les effets secondaires et les domaines d'absorption des composés existants, de même qu'une fonctionnalisation spécifique permettant de cibler préférentiellement les cellules tumorales, justifient les travaux qui se poursuivent dans la recherche de nouvelles molécules. Avec l'objectif de vectorisation, nous avons développé la synthèse de porphyrines portant un nombre variable de cycles glucosamine. Différentes approches méthodologiques ont été réalisées, les protocoles de synthèse sont maintenant bien maîtrisés. L'étude photophysique met en évidence la formation d'agrégats, même à faibles concentrations. Les tests biologiques, en cours, devraient orienter les modifications à apporter.

Mots-clés : Fluorescence - Rotors moléculaires - Coumarine - Dérivés de dextrane - Héparine - Thérapie photodynamique - Porphyrine - Glucosamine

FLUORESCENT PROBES FOR BIOLOGICAL APPLICATIONS AND MAPPING BY FLUORESCENCE MICROSCOPY

Researchs are done with the aim to develop optical methods for biological studies, with the starting point, the fluorescent tracers chemical synthesis for two biological applications, namely for biopolymer - cells interactions studies and in photodynamic therapy, respectively.

In the first part are described the synthesis and the study of bioactive polysaccharides polymers, labeled with fluorescent molecular rotors. The aim was to synthesise and to study the photophysical properties of coumarin derivatives associated with bioactive dextran (carboxymethyl-dextran-benzylamide (CMDB)) and heparin. The results of the biological tests prove the interest of the study : fluorescent CMDB polymers keep their stimulation effect on endothelial cells growth ; moreover, labeling of endothelial and smooth muscle cells with derivatized fluorescent dextran and heparin respectively, has been demonstrated by fluorescence microscopy.

The second part is devoted to the development of new photosensitizers for photodynamic therapy (PDT). PDT is a medical treatment against some cancers, based on the combined use of a photosensitizer (often porphyrin compound), oxygen and light. Nowadays, compounds used suffer from some drawbacks, especially secondary effects and no specificity. This explains the extend of research in this field, to discover more efficient molecules. Our main objective being the targeting, we developed some new porphyrins linked with a variable number of glucosamine rings. Different synthetic routes have been explored and now, the synthese protocols are well known. The photophysical properties of compounds have been studied and aggregate formation, even at low concentration has been observed. Biological tests in course, will orientated the further chemical modifications for a good selectivity.

Key-words : Fluorescence - Molecular Rotors - Coumarin - Dextran Derivatives - Heparin - Photodynamic Therapy - Porphyrin - Glucosamine