

Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel

**Synthèse de dérivés de l'acide δ -aminolévulinique,
capable de cibler des cellules spécifiques, en vue de
leur utilisation en thérapie photodynamique**

Thèse

Présentée à la faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel

Pour l'obtention du grade de docteur ès Science

Par

Yann Berger

de Grosshöchstetten (BE)

Chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel

UNIVERSITE DE NEUCHATEL
FACULTE DES SCIENCES

Septembre 2002

IMPRIMATUR POUR LA THESE

**Synthèse de dérivés de l'acide δ -aminolévulinique,
capable de cibler des cellules spécifiques, en vue de
leur utilisation en thérapie photodynamique**

de M. Yann Berger

UNIVERSITE DE NEUCHATEL

FACULTE DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de
Neuchâtel sur le rapport des membres du jury,

Mme L. Juillerat-Jeanneret (Lausanne),
MM. R. Neier (directeur de thèse), R. Deschenaux,
et M. M. Juillerat (Lausanne)

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le 3 décembre 2002

Le doyen:

A handwritten signature in black ink, consisting of a series of loops and a long horizontal stroke at the end.

F. Zwahlen

"La sagesse, c'est d'avoir des rêves
suffisamment
grands pour ne pas les perdre de vue
lorsqu'on les poursuit"

Oscar Wilde

A mes parents,

A toute ma famille et à mes amis

Ce travail de recherche, a été effectué de novembre 1998 à février 2002 à l'institut de chimie de l'Université de Neuchâtel dans les laboratoires de chimie organique, sous la direction du Monsieur le Professeur Reinhard Neier. Je tiens à remercier ce dernier pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur un projet scientifique en collaboration avec le milieu médical.

Mes respectueux remerciements vont également aux membres du jury : Madame le Docteur Lucienne Juillerat-Jeanneret (biochimiste, Habilitation à la Faculté de Médecine de l'Université de Lausanne), Monsieur Professeur Robert Deschenaux (Université de Neuchâtel), Dr. M. Juillerat (Chef de projet chez Nestlé, Centre de Recherche Nestlé, Verschez-les Blanc).

Je remercie particulièrement les gens qui ont pris part activement à la réalisation du travail synthétique : Dr. Alain Greppi, Dr. Frédéric Stauffer, Yasmine Willener, Roger Maffua et Tiffany Monnier. Je remercie également les autres collaborateurs du groupes : Dr. Jean-Mary Simone, Dr. Nicolas Soldermann, Dr. Carole Soldermann, Dr. Olivier Siri, Dr Laurent Ingrassia, Dr. Jean-Philippe Roblin, Dr. Eleonora Zizzari, Michael Schmid, Sébastien Lanaspèze, Olivier Vallat, Valéria Bottomei, Jean-Philippe Faurite.

Dans le cadre de la collaboration de notre Département avec le Centre Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), je tiens à remercier très sincèrement Madame le Docteur Lucienne Juillerat-Jeannert et ses collaboratrices, pour le travail effectué lors des mesures de fluorescence sur les lignées cellulaires et pour l'analyse biochimique des résultats obtenus.

Je remercie sincèrement pour le service de spectroscopie de masse Nicolas Motier, Dr. Camille Perret, Dr. Armelle Michel et pour le service de spectroscopie de résonance magnétique nucléaire Dr. Claude Saturnin et Heinz Bursian.

Pour leur travail quotidien, je remercie l'ensemble des personnes qui permettent par leurs tâches de faire vivre l'Institut de Chimie de l'Université de Neuchâtel.

Je remercie également l'Etat de Neuchâtel pour m'avoir accordé un poste d'assistant durant trois ans et au Fond National pour avoir financé ma première année de thèse.

Finalement, je remercie mes parents, ma sœur, mon frère qui m'ont soutenu durant toutes mes études, ainsi que mes amis qui ont toujours été là durant les coups durs.

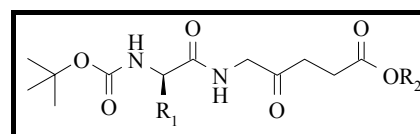
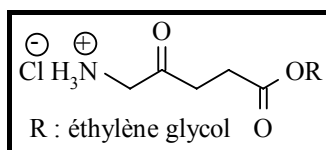
Résumé

Lorsque l'acide 5-aminolévulinique (ALA) est administré de façon topique, par intraveineuse ou directement au sein de la lésion à des tumeurs humaines ou animales, une production sélective de protoporphyrine IX (PpIX) est fréquemment observée au sein des tumeurs. Plusieurs facteurs physiques chimiques et physiologiques permettent d'expliquer ce phénomène. Les plus importants semblent être :

- Une concentration relativement élevée dans les tumeurs de l'enzyme *porphobilinogène deaminase* (PBGD), responsable de la limitation de la formation de la PpIX.
- Une concentration plus faible de *ferrochelatase* (FC) et de fer dans de nombreuses tumeurs
- Une température plus élevée, due à l'inflammation induite par la tumeur.
- Une barrière de peau entourant la tumeur moins efficace, entraînant une augmentation de la pénétration de ALA au sein des tumeurs.

La protoporphyrine IX (PpIX) est utilisée comme un marqueur fluorescent et comme agent photosensibilisant en thérapie photodynamique (PDT). Une augmentation temporaire de la PpIX dans les tissus peut être obtenue par administration de l'acide 5-aminolévulinique (ALA). La lipophilicité du produit est un des paramètres clé définissant la disponibilité biologique du produit lors d'une application topique du médicament. La production de fluorescence à partir de l'acide 5-aminolévulinique a été utilisée, afin d'évaluer la possibilité de cibler des cellules spécifiques avec un médicament.

Afin de déterminer la possibilité d'adresser spécifiquement des dérivés de ALA à des cellules spécifiques, nous avons synthétisé et caractérisé des dérivés esters de ALA à base d'éthylène glycol, ainsi que des dérivés pseudo-peptidiques, capable de cibler respectivement les estérases et les aminopeptidases cellulaires.

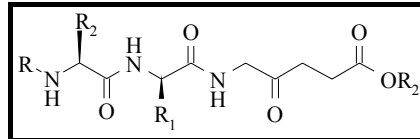


Dérivés à base d'ester d'éthylène glycol et d'acides aminés

La formation de la PpIX induite par ces produits a été étudiée en utilisant des cultures de cellules endothéliales ou de carcinome, provenant de rat et d'humain. La cytotoxicité de ces produits en absence de lumière a également été contrôlée. Les résultats ont montré que les esters à base d'éthylène glycol peuvent produire des concentrations importantes de PpIX et sont efficaces à des concentrations inférieures à celles induisant une cytotoxicité. Parmi les dérivés de ALA à base d'acides aminés qui ont été testés, la production de PpIX la plus importante a été obtenue en utilisant des dérivés de ALA formés avec des acides aminés

neutres, comparés aux résultats obtenus avec les dérivés à base d'acides aminés, acides ou basiques.

La seconde génération de dérivés synthétisés et caractérisés sont des produits à base de Gly-Gly ou Gly-Pro, ayant leur N terminal protégé ou libre. Ces dérivés de ALA ont été synthétisés en tant que substrat potentiel, spécifique pour les transporteurs de peptide et les aminopeptidases cellulaires.



Dérivés dipeptidiques de la deuxième génération

La formation de PpIX induite par ces produits a été étudiée en utilisant des cultures de cellules endothéliale et de carcinome d'origine humaine. Les dérivés de type dipeptide-ALA-OEt ayant leur N terminal libre ou protégé se sont révélés être des substrats pour les transporteurs membranaires et les aminopeptidases cellulaires, capable de métaboliser ALA à partir des précurseurs. Alors que les tests effectués avec les dérivés tripeptides-ALA-OEt ou dipeptides-ALA-OEtylène glycol ont donné que peu ou pas de fluorescence. Le précurseur non hydrolysé est transporté au sein de la cellule, il est ensuite hydrolysé de façon intracellulaire avec l'aide de serine-protéases. La sélectivité envers les cellules humaines endothéliales ou de carcinome est dépendante à la fois de l'expression sur la membrane cellulaire de transporteurs sélectifs et de l'activité enzymatique cellulaire. De ce fait, des médicaments couplés à des séquences Gly-Gly ou Gly-Pro pourraient sélectivement cibler des cellules spécifiques dans le cas de cancer humain, en utilisant des transporteurs de peptides spécifiques exprimés au niveau de la membrane cellulaire, ainsi que l'activité des peptidases exprimées au sein des cellules.

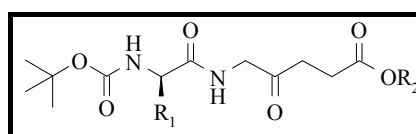
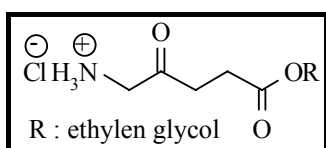
Abstract

When 5-aminolevulinic acid (ALA) is administered topically, intravenously or intraperitoneally to tumor-bearing animals or humans, tumour selective production of protoporphyrin IX (PpIX) is frequently observed. Several biophysical, biochemical and physiological factors explain this tumour selectivity, among which the most important ones seem to be:

- A relatively high concentration of the rate-limiting enzyme *prophobilinogen deaminase* (PBGD) in tumours.
- Relatively low concentrations of ferrochelatase (FC) and iron in many tumours
- A slightly elevated tumour temperature, related to inflammation
- A compromised barrier of the skin overlying tumours, leading to an increased penetration of ALA into tumours.

Protoporphyrin IX (PpIX) is used as a fluorescent marker and photosensitising agent in photodynamic therapy (PDT). A temporary increase of PpIX in tissues can be obtained by administration of 5-aminolevulinic acid (ALA). Lipophilicity is one of the key parameters defining the bioavailability of a topically applied drug. The production of fluorescent PpIX from non-fluorescent 5-aminolevulinic acid (ALA) was used to evaluate drug targeting to specific cells in a tissue.

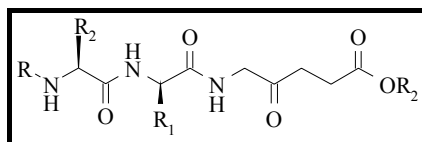
To evaluate means to specifically target ALA-derivatives to defined cells, we have synthesized and characterized ethylene glycol esters and amino acid pseudodipeptide derivatives of ALA as potential specific substrates for cellular esterases and aminopeptidases, respectively.



Ethylene glycol esters and amino acid pseudodipeptide derivatives of ALA

The PpIX formation induced by these products was investigated using cultures of human and rat cell lines of carcinoma and endothelial origins. The cytotoxicity of these compounds in the absence of light was also controlled. The results have shown that ethyleneglycol esters can induce high levels of PpIX and are useful at concentrations below their cytotoxicity threshold. From the ALA-amino acid derivatives which were evaluated, the highest PpIX production was obtained using ALA derivatives of neutral amino acids, as compared to acidic or basic amino acids.

The second generation of derivatives synthesized and characterized were N-terminal-blocked and N-terminal-free pseudotriptide Gly-Gly and Gly-Pro derivatives of ALA were synthesized as potential specific substrates for cellular peptide transporters and peptidases.



Second generation of amino acid derivatives of ALA

The PpIX formation induced by these products was investigated using cultures of human carcinoma and endothelial cells. N-blocked or N-free dipeptides-ALA-OEt, but not tripeptides-ALA or dipeptides-ALA-ethyleneglycols, were substrates for cellular transporters and peptidases, able to metabolize ALA from the precursors. The unhydrolyzed precursor is transported into the cell first, then hydrolyzed intracellularly involving serine-proteases. Cell selectivity for human endothelial or carcinoma cells was dependent on both the cell membrane expression of selective transporters and the intracellular enzymatic activities. Thus drugs coupled to Gly-Gly-/Gly-Pro-derivatives may selectively target defined cells in human cancer, depending on specific peptide transporters and peptidase activities expressed by the cells

Récapitulation des produits synthétisés

N°	Produit	N°	Produit
1	Acide lévulinique	32	Boc-(Gly) ₂ -ALA- O((CH ₂) ₂ O) ₂ Et
2	5-bromolévulinate de méthyle	33	Boc-(Gly) ₂ -ALA- O((CH ₂) ₂ O) ₃ Et
3	3-bromolévulinate de méthyle	34	Boc-Phe-ALA-Ala-OMe
4	lévulinate de méthyle	35	Ala-ALA-OMe
5	phtalimide de potassium	36	Ala-ALA
6	5-(<i>N</i> -Phthalimido)-lévulinate de méthyle	37	Ala-ALA-OEt
7	acide 5-aminolévulinique (ALA)	38	Ala-ALA-O(CH ₂) ₅ Me
8	ALA-OMe	39	Ala-ALA-O(CH ₂) ₆
9	ALA-O(CH ₂) ₅ Me	40	Phe-ALA-OMe
10	ALA-O(CH ₂) ₆	41	Lys-ALA-OMe
11	ALA-OCH ₂ (CH) ₆	42	Asp-ALA-OMe
12	ALA-O((CH ₂) ₂ O)Me	43	(Gly) ₂ -ALA-OEt
13	ALA-O((CH ₂) ₂ O)Et	44	Gly-Pro-ALA-OEt
14	ALA-O((CH ₂) ₂ O) ₂ Et	45	(Gly) ₂ -ALA- O((CH ₂) ₂ O) ₂ Et
15	ALA-O((CH ₂) ₂ O) ₃ Et	46	(Gly) ₂ -ALA- O((CH ₂) ₂ O) ₃ Et
16	Boc-Ala-ALA-OMe	47	(Gly) ₃ -ALA-OMe
17	Boc-Phe-ALA-OMe	48	Boc-Ala-ALA
18	Boc-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-ALA-OMe	49	Boc-Phe-ALA
19	Boc-Glu(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-ALA-OEt	50	(Gly) ₂ -ALA
20	Boc-Lys(Boc)-ALA-OMe	51	5-azidolévulinate de méthyle
21	Boc-Arg(Boc) ₂ -ALA-OMe	52	Boc-ALA-OMe
22	Boc-Ala-ALA-O(CH ₂) ₅ Me	53	acide 5-azidolévulinique (AzLA)
23	Boc-Ala-ALA-OEt	54	AzLA- O(CH ₂) ₅ Me
24	Boc-Ala-ALA-O(CH ₂) ₆	55	AzLA- O(CH ₂) ₃ O-AzLA
25	Boc-(Gly) ₂ -ALA-OEt	56	AzLA- O((CH ₂) ₂ O) ₂ -AzLA
26	Boc-Gly-Pro-ALA-OEt	57	(AzLA- OCH ₂) ₄ C
27	Boc-(Gly) ₃ -ALA-OEt	58	Z-(Gly) ₂ - AMC
28	Z-Phe-ALA-OMe	59	Z-(Gly) ₂ -4Me-β-NA
29	Z-Asp(OBz)-ALA-OMe	60	(Gly) ₂ - AMC
30	Z-Asp(<i>O</i> <i>t</i> Bu)-ALA-OMe	61	(Gly) ₂ -4Me-β-NA
31	Z-(Gly) ₂ -ALA-OMe	62	(Gly) ₂ -ALA-OMe

N°	Produit	N°	Produit
65	Boc-(Gly) ₂ -ALA-OMe	92	AzLA- Ophytol
66	Z-(Gly) ₂ -ALA	93	Boc-Arg(Boc) ₂ -Gly-Asp(OtBu) - ALA-OMe
67	Boc-Arg(Boc) ₂ -Gly-Asp(OtBu) (RGD)	94	Arg-Gly-Asp-ALA-OMe
69	ALA-OEt	100	porphobilinogène
70	Boc-Ala	101	hydroxyméthylbilane
71	Boc-Phe	102	uroporphyrinogène III
72	Boc-Asp(OtBu)	103	uroporphyrinogène I
73	Boc-Glu(OtBu)	104	coproporphyrinogène III
74	Boc-Lys(Boc)	105	protoporphyrinogène IX
75	Boc-Arg(Boc) ₂	106	protoporphyrine IX
76	Boc-(Gly) ₂	107	hème
77	Boc-Gly-Pro	108	pseudoporphobilinogène
78	Boc-(Gly) ₃	109	2,5-(β-carboxyethyl) dihydropyrazine (DHPY)
79	Z-Phe-ALA	110	2,5-(β-carboxyethyl)pyrazine (PY)
80	Z-Asp(OBz)-ALA	111	hematoporphyrine
81	Z-Asp(OtBu)-ALA	112	Photofrin
82	Z-(Gly) ₂ -ALA	113	verteporphyrin
83	(Boc) ₂ O	114	etiopurin d'étain
84	4-méthylcoumaryl-7-amine (AMC)	115	<i>m</i> -tetrahydroxylphenyle chlorine
85	4-méthoxy-β-naphtylamine (4Me-β-NA)	116	mono-aspartyle chlorine
86	Ala-OMe	117	Lutetium texaphyrine
88	Ala	118	chlorophylle a
89	ALA- O(CH ₂) ₃ Me	119	Dendrimère contenant ALA (protégé)
90	ALA-O(CH ₂) ₇ Me	120	Dendrimère contenant ALA
91	AzLA- Ogéranol		

1	PARTIE THEORIQUE	1
1.1	Introduction.....	1
1.1.1	La thérapie photodynamique (PDT)	1
1.1.1.1	Historique de la thérapie photodynamique.....	1
1.1.1.2	Les bases de la thérapie photodynamique	2
1.2	But.....	4
1.3	Description chimique et physique de la thérapie photodynamique	5
1.3.1	L'oxygène en PDT	5
1.3.1.1	L'oxygène singulet.....	5
1.3.1.2	La photochimie de la thérapie photodynamique	7
1.3.2	Les photosensibilisateurs	9
1.3.2.1	La photophysique des photosensibilisateurs	9
1.3.2.2	La Photofrin®	10
1.3.2.3	Les nouveaux photosensibilisateurs	10
1.3.2.4	Rapport entre l'activité et la structure du photosensibilisateur	13
1.3.3	La lumière utilisée en thérapie photodynamique	14
1.3.3.1	Dosage de la quantité de lumière pour la PDT.....	14
1.3.3.2	Pénétration de la lumière au sein des tissus	14
1.3.3.3	Sources lumineuses	17
1.3.3.4	Le photoblanchiment des photosensibilisateurs	18

1.4	Mécanisme biologique de l'action de la PDT.....	19
1.4.1	Les parties des cellules où se concentrent le photosensibilisateurs.....	19
1.4.2	Les effets directs sur les cellules.....	20
1.4.3	L'apoptose et la nécrose : deux types de mort cellulaire	20
1.4.4	Destruction du système vasculaire.....	22
1.5	Utilisation de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) en PDT.....	24
1.5.1	Introduction	24
1.5.2	Les porphyrines	24
1.5.3	La chlorophylle.....	25
1.5.4	L'hémoglobine et son rôle dans la vie.....	27
1.5.4.1	Introduction et généralités	27
1.5.4.2	Évolution des mécanismes de transport d'oxygène	29
1.5.4.3	Les pigments respiratoires.....	29
1.5.4.4	L'érythrocyte ou globule rouge	30
1.5.5	Biosynthèse du porphobilinogène et de l'hème.....	32
1.5.6	Utilisation de ALA en PDT.....	38
1.5.7	Sélectivité des tissus lors de traitement à l'aide de ALA	38
1.5.8	Choix de la source lumineuse lors du traitement par ALA.....	39
1.5.9	Diffusion de ALA au sein des tissus lors d'un traitement	41
1.5.10	Comportement pharmacologique de la protoporphyrine IX induite par ALA	42
1.5.11	Effets de la photosensibilisation induite par la protoporphyrine IX.....	43
1.5.12	Le photoblanchiment de la protoporphyrine IX.....	43

1.5.13	L'utilisation topique de ALA-PDT pour les troubles de la peau	45
1.5.14	Comparaison entre les traitements à base de photofrin® et ceux à base de ALA	46
1.5.15	Stabilité de l'acide δ-aminolévulinique en solution	47
1.5.16	La thérapie photodynamique avec des dérivés de ALA	48
1.5.17	Perspectives d'avenir pour l'utilisation de ALA en PDT	51
1.5.18	Les enzymes protéolytiques pouvant être ciblés avec des dérivés spécifiques de ALA (protéases).....	52
1.5.18.1	Les hydroxy protéases (Ser/Thr) et les thiol protéases (CySH)	52
1.5.18.2	Les protéases à aspartate	53
1.5.18.3	Les métalloprotéases	53
1.6	Discussion des résultats.....	54
1.6.1	Considérations générales sur l'acide δ-aminolévulinique	54
1.6.1.1	Généralités sur les acides aminés	54
1.6.1.2	Propriétés de l'acide δ -aminolévulinique.....	54
1.6.2	Résumé des travaux précédents sur la synthèse des dérivés de ALA.....	56
1.6.2.1	Synthèse peptidique avec ALA sur la phase solide.....	56
1.6.2.2	Etudes des paramètres influençant la production de PpIX à partir des esters de ALA	58
1.6.3	Application des dérivés esters de ALA en PDT.....	59
1.6.3.1	Synthèse des esters de ALA	59
1.6.3.2	Etudes de l'hydrolyse d'esters de ALA.....	60
1.6.3.3	Production de PpIX à partir des dérivés synthétiques de ALA à base d'éthylène glycol en culture cellulaire	63
1.6.3.4	Discussion des résultats obtenus à partir d'esters synthétiques d'éthylène glycol contenant ALA	67
1.6.4	Application des dérivés peptidiques de ALA en PDT.....	69

1.6.4.1	Description des réactifs et des mécanismes réactionnels du couplage.....	69
1.6.4.2	Synthèse de la première génération de dérivés peptidiques.....	75
1.6.4.3	Déprotection de la première génération de dérivés peptidiques	76
1.6.4.4	Tentative d'explication de l'instabilité de la première génération de dérivés peptidiques	78
1.6.4.5	Production de PpIX à partir des dérivés synthétiques de ALA à base d'acide aminé	80
1.6.4.6	Discussion des résultats obtenus à partir des dérivés synthétiques de ALA à base d'acide aminés.....	85
1.6.4.7	Synthèse de la deuxième génération de dérivés peptidiques : dipeptides de ALA	87
1.6.5	Déprotection de la deuxième génération de dérivés peptidiques	88
1.6.5.1	Déprotection du groupe protecteur Boc par acidolyse	88
1.6.5.2	Production de PpIX à partir des dérivés synthétiques de ALA de deuxième génération.....	91
1.6.5.3	Discussions des résultats obtenus à partir des dérivés synthétiques de ALA de deuxième génération	97

2 PARTIE EXPERIMENTALE 99

2.1	Méthodes analytiques et appareils	99
2.1.1	Chromatographie	99
2.1.2	Chromatographie en phase gazeuse (GC).....	99
2.1.3	Chromatographie en phase liquide (HPLC).....	99
2.1.4	Spectroscopie infrarouge (FT-IR).....	99
2.1.5	Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)	100
2.1.6	Spectroscopie de masse (MS)	100

2.1.7	Indice de réfraction	100
2.1.8	Analyse élémentaire (AE)	101
2.1.9	Point de fusion (PF)	101
2.1.10	Verreries, systèmes de chauffage et de refroidissement	101
2.1.11	Hydrogénation à haute pression	101
2.1.12	Appareillage pour le pH-stat	101
2.1.13	Spectrophotométrie UV-visible	101
2.1.14	Lignées de cellules	102
2.1.15	Inhibiteurs des aminopeptidases considérés dans ce travail	102
2.1.16	Détection de la fluorescence	103
2.1.17	Protocole pour l'expérimentation sur culture de cellules	103
2.1.18	Test de viabilité des cellules	104
2.2	Solvants et produits	105
2.2.1	Solvants standards	105
2.2.2	Solvants pour réactions	105
2.2.3	Produits chimiques et gaz	106
2.3	Synthèses	109
2.3.1	Synthèse de l'acide 5-aminolévulinique (ALA)	109
2.3.1.1	Synthèse du 3- et du 5-bromolévulinate de méthyle (2 et 3)	109
2.3.1.2	Synthèse du 5-(<i>N</i> -Phthalimido)-lévulinate de méthyle (6)	111
2.3.1.3	Synthèse de l'acide 5-aminolévulinique (7)	112
2.3.2	Synthèses de dérivés de l'acide 5-aminolévulinique	113
2.3.2.1	Synthèses de chlorhydrates d'esters de l'acide 5-aminolévulinique	113

2.3.2.2	Synthèses de dipeptides contenant l'acide 5-aminolévulinique.....	121
2.3.2.3	Déprotection de pseudo peptidiques protégés Boc contenant l'acide 5-aminolévulinique.....	142
2.3.2.4	Déprotection enzymatique de l'ester méthylique.....	154
2.3.2.5	Synthèse de H-[Gly-Gly-(ALA)]-OMe (62).....	158

3 Annexes 160

3.1 Partie théorique.....160

3.1.1 Synthèse de Boc-Arg(Boc)₂-Gly-Asp(OtBu)-ALA-OMe (RGD-ALA-Ome) (93) 160

3.1.2 Synthèse de dérivés contenant la séquence Gly-Gly comme substrats pour l'élucidation par histoenzymographie (4Me-β-NA) ou par fluorescence (AMC) ou des activités protéolytiques cellulaires 164

3.1.2.1 Couplage de marqueurs sur Z-Gly-Gly-OH..... 164

3.1.2.2 Déprotection des marqueurs fixés sur Z-Gly-Gly-OH par hydrogénolyse 165

3.1.2.3 Discussion des résultats obtenus avec les dérivés à base 4-méthylcoumaryl-7-amine (AMC) 166

3.1.3 Synthèse de dérivés de l'acide 5-azidolévulinique 170

3.1.3.1 Synthèse du 5-azidolévulinate de méthyle..... 171

3.1.3.2 Synthèse de Boc-(ALA)-OMe 172

3.1.3.3 Synthèse de l'acide 5-azidolévulinique 172

3.1.3.4 Estérification de l'acide 5-azidolévulinique..... 173

3.1.3.5 Déprotection des dérivés de l'acide 5-azidolévulinique 173

3.2 Partie expérimentale.....175

3.2.1	Synthèse d'un dérivé de ALA contenant une séquence RGD	175
3.2.1.1	Synthèse de Boc-Arg(Boc) ₂ -Gly-Asp(OtBu)-ALA-OMe.....	175
3.2.1.2	Synthèse de H-Arg-Gly-Asp-ALA-OMe	176
3.2.2	Synthèses de dérivés de l'acide 5-azidolévulinique.....	176
3.2.2.1	Synthèse du 5-azidolévulinate de méthyle (51)	176
3.2.2.2	Synthèse de Boc-(ALA)-OMe (52).....	177
3.2.2.3	Synthèse de l'acide 5-azidolévulinique (53).....	178
3.2.2.4	Estérification de l'acide 5-azidolévulinique.....	179
3.2.2.5	Déprotection des dérivés de l'acide 5-azidolévulinique	186
3.2.3	Synthèse de dérivés contenant la séquence Gly-Gly comme substrats pour l'élucidation par histoenzymographie (4Me-β-NA) ou par fluorescence (AMC) des activités protéolytiques cellulaires	189
3.2.3.1	Synthèse du ({[4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylcarbamoyle]-méthyl]-carbamoyle}-méthyl)-carbamic acid benzyl ester (58).....	189
3.2.3.2	Synthèse du ({[4-méthoxy-naphtalène-2-ylcarbamoyle]-méthyl]-carbamoyle}-méthyl)-carbamic acid benzyl ester (59).....	190
3.2.4	Déprotection des Synthèse de dérivés contenant la séquence Gly-Gly comme substrats pour l'élucidation par histoenzymographie (4Me-β-NA) ou par fluorescence (AMC) des activités protéolytiques cellulaires	192
3.2.4.1	Mode opératoire - Type VIII.....	192
3.2.4.2	Synthèse du 2-ammonium-[(4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylcarbamoyle)-méthyl]-acétamide chlorid (60).....	192
3.2.4.3	Synthèse du 2-ammonium-N-[(4-méthoxy-naphtalène-2-ylcarbamoyle)-méthyl]-carbamoyle]-acétamide chlorid (61).....	193

4 Bibliographie 195

1 PARTIE THEORIQUE

1.1 Introduction

1.1.1 La thérapie photodynamique (PDT)

1.1.1.1 Historique de la thérapie photodynamique

L'utilisation thérapeutique de la lumière, telle que nous la connaissons, débute en 1900, lorsque Raab a observé que l'utilisation combinée d'acridine orange et de lumière pouvait détruire des organismes vivants (paramecium) [1]. Dans les années 1920, Policard [2] a observé que les tissus cancéreux étaient naturellement plus fluorescents que les tissus sains. Dans les années 1950, Ronchese [3] a tenté d'activer les molécules endogènes responsables de la fluorescence dans les tissus cancéreux, afin de délimiter plus précisément les contours des tumeurs.

L'ère actuelle de la thérapie photodynamique (PDT) a véritablement démarré avec les études de Lipson et de Schwartz. Ils ont observé que l'injection de préparations brutes d'hématoporphyrines extraites directement du sang conduisait à la fluorescence des tumeurs. Afin d'obtenir un mélange permettant une localisation optimale de la lésion, Schwartz isola un mélange porphyrique qu'il appela dérivé "hématoporphyrine" (HpD) [4]. Dans les années 1970, Dougherty observa que la fluorescéine diacétate pouvait détruire photodynamiquement les cellules TA-3 in vitro [5]. Par la suite, il traita des tumeurs animales avec la fluorescéine, ce qui prouva que cette molécule pouvait être utilisée comme photosensibilisateur [6]. Dans les années qui suivirent, Weishaupt et al. identifièrent l'entité cytotoxique de la réaction photochimique comme étant l'oxygène singulet [7]. Cette découverte déclassa la fluorescéine comme photosensibilisateur, puisque cette substance possède un faible rendement quantique en oxygène singulet, ainsi qu'une absorption importante dans la partie verte du spectre électromagnétique. Les recherches de photosensibilisateurs se tournèrent vers des produits possédant un bon rendement quantique d'oxygène singulet, ainsi qu'une absorption maximale dans le rouge.

Quelques années plus tard, les fractions actives de HpD, obtenues après le traitement de l'hématoporphyrine (**18**) avec de l'acide acétique et de l'acide sulfurique furent isolées et identifiées. Le mélange (appelé également "stage I") est en fait constitué de deutéroporphyrines 3,8-disubstituées au sein desquelles les substitutions sont des combinaisons de groupes vinyle, 2-acétoxyéthyle et 2-hydroxyéthyle. Le composant principal de ce mélange HpD est le dérivé diacétoxy (Figure 1). Afin de rendre ce mélange assimilable par le corps, il est dissout dans un milieu alcalin (appelé "stage II"). Cette opération provoque l'hydrolyse ou l'élimination des groupes acétoxy et conduit au complexe appelé "witches brew", composé de porphyrines monomériques, dimériques et oligomériques [8]. Seuls les dimères et oligomères sont connus pour leur activité PDT in vivo.

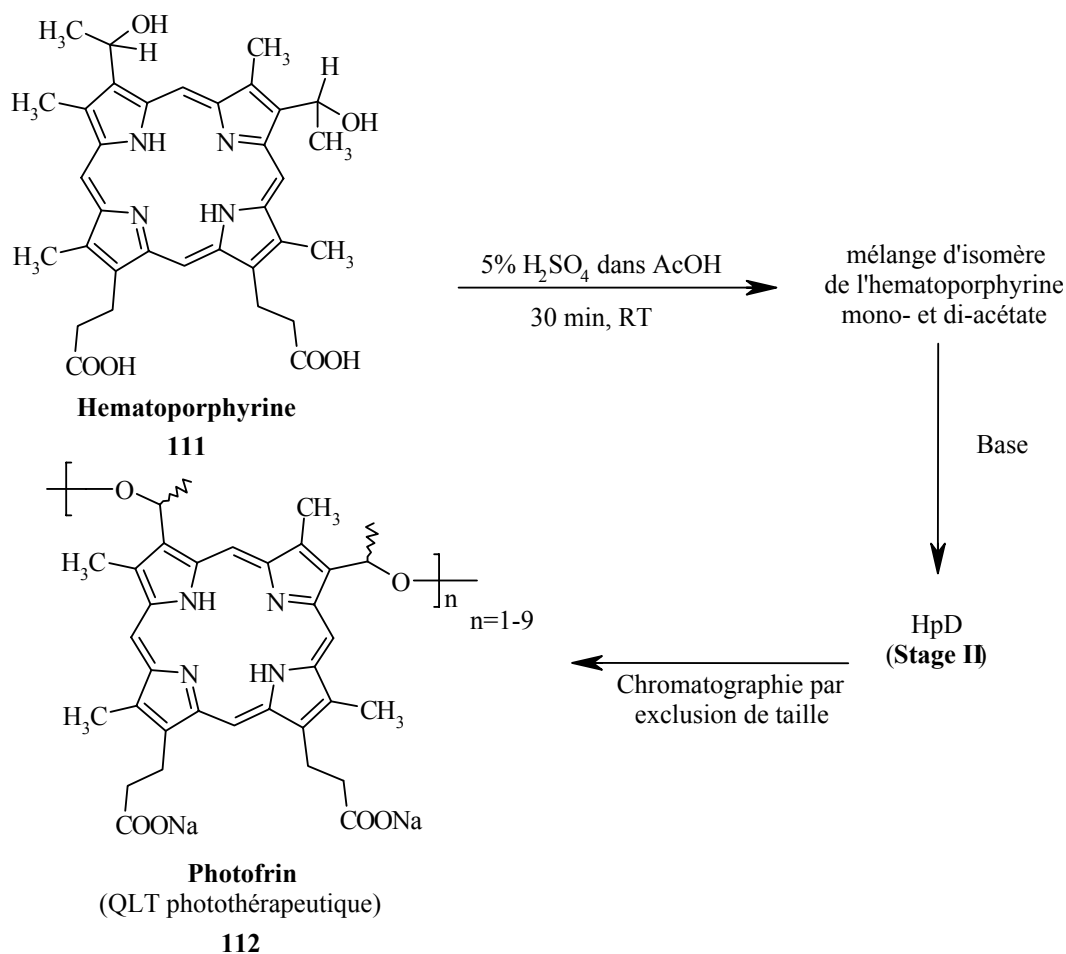


Figure 1: Synthèses de la photofrin®

Le mélange de produits a été commercialisé sous le nom de Photofrin®. Depuis sa commercialisation comme médicament, de nombreux mécanismes expliquant le fonctionnement de la PDT ont été élucidés, de nouveaux sensibilisateurs sont apparus et la recherche et le développement se poursuivent sur l'amélioration des molécules et des méthodes de traitement.

1.1.1.2 Les bases de la thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique est basée sur la photooxydation de la matière induite par un colorant au sein des tissus ciblés (Foote 1990). Ce traitement exige, afin d'être efficace, la présence d'un colorant (photosensibilisateur) qui devra s'être accumulé préférentiellement au sein des lésions à traiter. Lors d'un traitement PDT, les photosensibilisateurs sont administrés aux patients en quantités importantes lors de la première étape du traitement. Lors de la seconde étape, les tissus où est localisé le photosensibilisateur sont exposés à une source lumineuse dont la longueur d'onde est appropriée, afin de permettre une absorption optimale de la lumière par le colorant. L'excitation du photosensibilisateur va permettre à toute une série de réactions photochimiques d'avoir lieu, impliquant aussi bien de l'oxygène moléculaire, que des produits nuisibles au bon fonctionnement de la cellule, issus de la réaction entre les molécules se trouvant au sein de la cellule et l'oxygène.

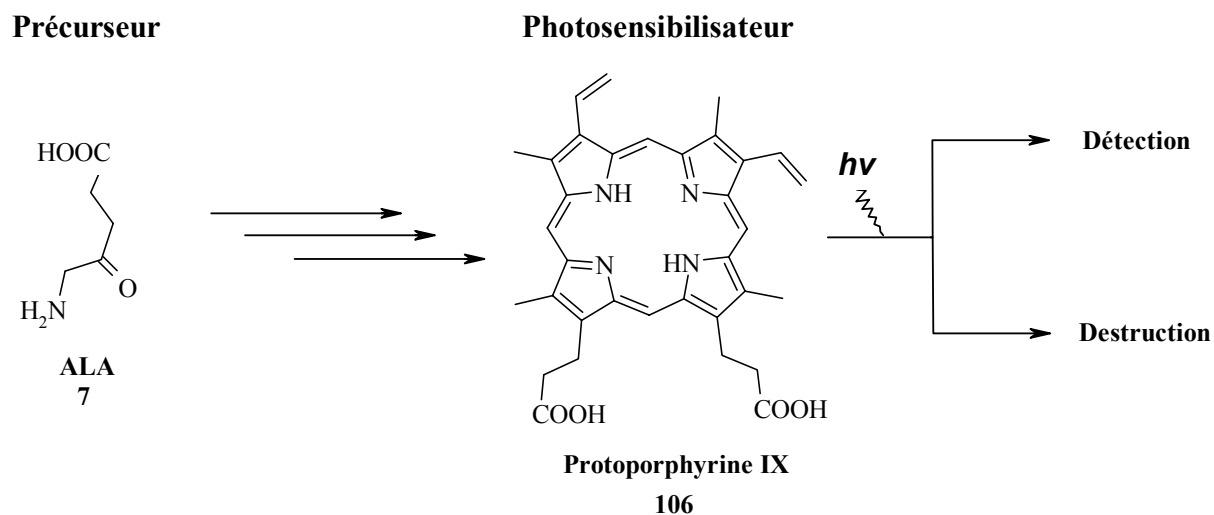


Figure 2 : porphyrine endogène pouvant être utilisée comme photosensibilisateur

Depuis le début de ce siècle, il est connu que certaines porphyrines sont accumulées au sein des tissus tumoraux en grandes quantités durant de longues périodes [9]. Il a été démontré plus tard [10] que la haute affinité des porphyrines pour les tumeurs est en fait due à leur affinité pour les lipoprotéines du sérum, telle que les LDLs. Les porphyrines se concentrent de façon préférentielle au sein des tumeurs solides [11], plus particulièrement celles caractérisées par une vitesse de prolifération cellulaire élevée. C'est pourquoi la PDT impliquant l'emploi de porphyrines ou de photosensibilisateurs de la deuxième génération (Figure 2) est appliquée de nos jours pour le traitement de tumeurs d'un grand nombre de sites anatomiques. Les résultats récoltés à partir d'une série d'études cliniques et précliniques au cours des 25 dernières années ont permis de considérer la thérapie photodynamique comme traitement de base pour certains types de cancers. Depuis 1993, en effet, cette technique est régulièrement appliquée aux cancers de la peau et aux cancers des organes creux (vessie [12], prostate, tube digestif, etc.) dans un grand nombre de pays (Canada, Pays-Bas, France, Allemagne, Japon, Suisse et Etats-Unis principalement) [5;13].

Les éléments indispensables pour un traitement thérapeutique PDT sont

- Un photosensibilisateur s'accumulant préférentiellement au sein des tumeurs
- Une source lumineuse capable d'exciter le photosensibilisateur
- Un milieu riche en oxygène

1.2 But

Le but de ce travail de thèse est la synthèse de dérivés de ALA, afin d'obtenir de nouveaux dérivés utilisables en PDT. Le premier type de modification effectuée a consisté à synthétiser une série d'ester contenant ALA. La deuxième série de dérivés a été synthétisée, en couplant différents acides aminés sur ALA. Tous ces produits ont été testés sur différentes lignées de cellules, afin de déterminer leur potentiel en tant que prodrug.

Toutes ces modifications ont été réalisées dans le but de mettre au point une prodrug¹ capable d'adresser spécifiquement ALA aux cellules endothéliales liées aux tumeurs ou directement aux cellules tumorales, ayant une cytotoxicité la plus faible possible en absence de lumière.

¹ Médicaments qui s'activent au contact de la cible pour éviter des effets secondaires

1.3 Description chimique et physique de la thérapie photodynamique

1.3.1 L'oxygène en PDT

1.3.1.1 L'oxygène singulet

L'oxygène singulet, l'agent cytotoxique principal produit lors de la PDT [7] est une forme hautement réactive de l'oxygène qui est produit par inversion du spin d'un des électrons de la couche extérieure. Normalement, l'oxygène dans son état stable a deux électrons non appariés, résidant séparément dans les orbitales antiliantes extérieures (Figure 3). La configuration triplet est un état triplement dégénéré en absence de champ magnétique. En présence d'un champ magnétique (B) l'état dégénéré des spins est levé. On peut ainsi observer trois états différents : les deux spins alignés vers le haut, dans ce cas la molécule sera déviée vers le bas du champ magnétique, les deux spins alignés vers le bas, dans ce cas la molécule sera déviée vers le haut du champ magnétique et lorsque les deux spins sont antiparallèles, la molécule traverse le champ sans être perturbée. A cause de ces trois possibilités de placement des électrons, l'état fondamental de l'oxygène est appelé état triplet. Toutes les molécules avec une telle configuration des électrons de valence sont considérées comme étant dans un état triplet [14].

La réactivité extrême de l'oxygène singulet provient des deux électrons appariés dans une des deux orbitales antiliantes (Π_{2p}^*) (Figure 3). Dans l'état fondamental, les électrons de valence sont distribués en accord avec la règle de Hund, dans les orbitales antiliantes π_x^* et π_y^* . Lorsque les orbitales sont dégénérées et que les électrons ont aligné leur spins, les nombres quantiques de chaque électron sont identiques et cela les oblige à occuper des orbitales séparées afin de respecter le principe d'exclusion de Pauli [15]. Durant une interaction avec le photosensibilisateur excité, le spin d'un des électrons s'inverse sur l'oxygène, ce qui permet aux électrons de se regrouper dans une seule orbitale antiliante. Cette forme déstabilise la molécule d'oxygène (1O_2). Bien que l'oxygène singulet soit souvent décrit comme un diradical, c'est en fait un Zwitterion hautement polarisé (Figure 3 bas) [15].

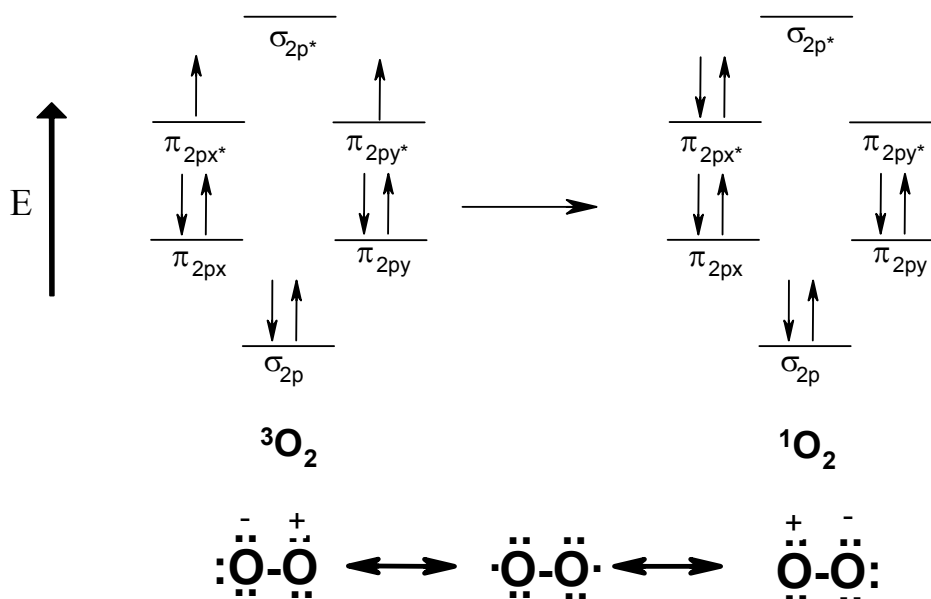


Figure 3: Diagramme des orbitales moléculaires, montrant la distribution des électrons pour l'oxygène triplet et singlet (dessus). Structure de Lewis montrant le caractère zwitterionique de l'oxygène singlet (bas).

L'oxygène singlet est si réactif qu'il a un temps de vie de l'ordre de 10-100 μs dans des solvants organiques. Cela restreint son activité à une sphère d'action ayant un diamètre de 10nm, centrée sur son point de production. Dans un environnement aqueux, le temps de vie de l'oxygène singlet est réduit approximativement à 2ns, puisque l'énergie d'étirement de la liaison oxygène-hydrogène (O-H) dans une molécule d'eau est à peu près égale à l'énergie de nécessaire pour exciter l'oxygène. L'énergie est donc dissipée comme chaleur par les mouvements d'étirement et les vibrations des molécules d'eau.

Comme l'oxygène singlet réagit rapidement, les dommages oxydatifs induits par la PDT sont confinés à une région qui n'est pas plus large en diamètre que l'épaisseur d'une membrane cellulaire. Les dommages photodynamiques sont probablement limités par le fait que le photosensibilisateur va cibler de préférence les régions hydrophobes de la cellule, puisque que la majorité des photosensibilisateurs ont un caractère lipophile. L'importance de l'oxygénation des tissus en PDT a été démontrée par de nombreuses études [16]. Les cellules pauvres en oxygène, celles qui ont un taux d'oxygène de l'ordre de 5% se sont avérées résistantes à la PDT.

1.3.1.2 La photochimie de la thérapie photodynamique

L'agent cytotoxique de la PDT est l'oxygène singulet [7]. La réaction photochimique qui génère l'oxygène singulet à partir de l'oxygène se trouvant dans son état fondamental est représenté par le diagramme de Jablonski (Figure 4) [14].

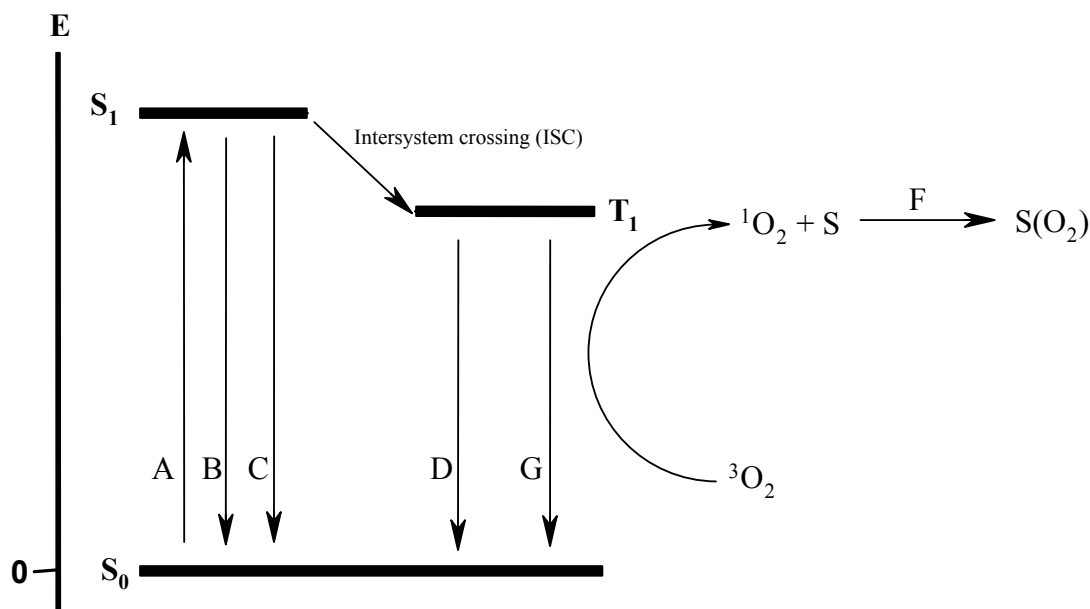


Figure 4: Diagramme de Jablonski montrant les différentes possibilités d'excitation et de relaxation. (A) Excitation du photosensibilisateur. (B) émission d'un photon fluorescent. (C) Conversion interne (IC). (D) émission d'un photon phosphorescent. (G) Perte d'énergie au travers de conversion interne lors de transition non radiative ou lors de collisions avec d'autres molécules.

Suite à l'application d'un photosensibilisateur, les tissus cancéreux sont exposés à la source lumineuse. La longueur d'onde du laser est choisie avec un soin particulier, de manière à assurer l'activation de l'agent. Il faut tenir compte du fait que, lorsqu'un rayon lumineux traverse un objet, par exemple une cellule, plusieurs phénomènes optiques sont possibles : la réflexion, la transmission, la dispersion, l'absorption ou une combinaison des quatre. Dans le cas de la PDT, le phénomène exploité est l'absorption ; il est donc impératif d'optimiser ce paramètre en sélectionnant précisément la longueur d'onde du laser. En illuminant le chromophore avec une source lumineuse (laser) ayant la longueur d'onde appropriée, il passe de son état fondamental à un état singulet excité (A). Le chromophore peut revenir à son état fondamental en émettant un photon fluorescent (B) ou passer à un état triplet excité par intersystem crossing (ISC)¹, le chromophore peut revenir à son état fondamental soit en émettant un photon phosphorescent (D), soit en transférant l'énergie à une autre molécule via un transfert d'énergie.

Dans le cas de l'approximation de premier ordre des états excités, les transitions radiatives entre triplet et singulet sont "interdites" par la mécanique quantique, car un changement de

¹ Pour avoir un bon rendement, les processus en concurrence avec l'ISC doivent être les plus faibles possibles, de manière à ce que le maximum de molécules passent à l'état triplet excité ($^3P^*$)

spin électronique est requis. Toutefois, cette transition a quand même lieu dans des proportions très faibles [17]. De plus, le chromophore peut aussi perdre son énergie au travers de conversion interne lors de transition non radiative ou lors de collisions avec d'autres molécules [14] (G). Dans un milieu oxygéné, le chromophore transfère facilement son énergie à une molécule d'oxygène qui se trouve dans son état fondamentale ($^3\text{O}_2$ oxygène triplet), afin de produire de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Cette molécule va facilement attaquer des substrats organiques [$\text{S}(\text{O}_2)$] (F), vu son état énergétique élevé. Le photosensibilisateur et l'oxygène interagissent au travers de l'état triplet, car l'oxygène est une des rares molécules à posséder un état triplet fondamental stable. L'énergie requise pour la transition de l'état triplet ou singulet de l'oxygène est de 22 kcal mol^{-1} , ce qui correspond à une longueur d'onde de 1274 nm (lumière infrarouge) [15]. Cette énergie, relativement faible, est nécessaire afin de produire l'oxygène singulet.

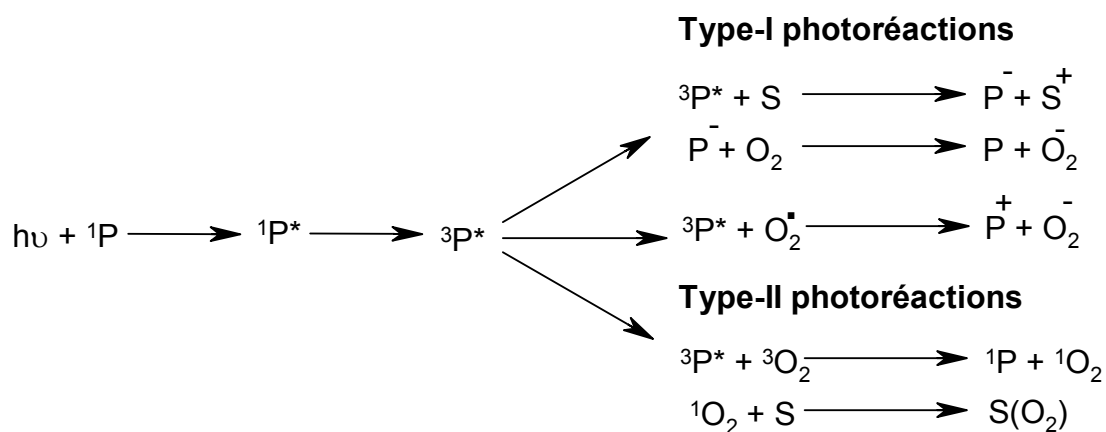


Figure 5: Phtoréactions de type-I et de type-II, où ^1P est un photosensibilisateur dans son état fondamental (singulet), $^1\text{P}^*$ est un photosensibilisateur dans son état excité (triplet), S est une molécule substrat, P^- est un photosensibilisateur réduit, S^+ une molécule substrat oxydée, O_2 est une molécule d'oxygène (état triplet), O_2^- est l'anion superoxyde, O_2^\bullet le radical superoxyde, P^+ est le photosensibilisateur oxydé, ${}^3\text{O}_2$ est l'oxygène dans l'état triplet, ${}^1\text{O}_2$ est l'oxygène excité (état singulet), et $\text{S}(\text{O}_2)$ est un substrat oxydé.

Les réactions photochimiques de ce type sont connues comme des photoréactions de type-II et sont caractérisées par une dépendance envers la concentration de l'oxygène (O_2) (Figure 5) [18]. Bien que les photoréactions de type-II soient communément associées avec la production d'oxygène singulet, d'autres produits peuvent être impliqués dans des photoréactions de type-II, parmi eux, on peut citer la vitamine A et l'oxyde nitrique [19]. On résume donc sous le terme photoréaction de type II, non seulement les réactions avec ${}^1\text{O}_2$, mais aussi d'autres molécules. Dans le cas des photoréactions de type-I du substrat ciblé (Figure 5) [19], lorsque l'environnement est privé d'oxygène le photosensibilisateur excité (${}^3\text{P}^*$) peut réagir directement avec des substrats organiques (S) par échange d'électron, produisant un substrat oxydé (S^+) et un photosensibilisateur réduit (P^-). En présence d'une faible quantité d'oxygène le photosensibilisateur réduit réagit de préférence avec de l'oxygène pour produire un anion superoxyde (O_2^-) qui peut ensuite former le radical hydroxyl (OH^\bullet) [19]. Bien que les réactions de type-II prédominent durant la PDT [20], Foote a suggéré que les réactions de type-I pouvaient devenir plus importantes lorsque les photosensibilisateurs sont en haute concentration et spécialement lors de condition pauvre en oxygène [19].

1.3.2 Les photosensibilisateurs

1.3.2.1 La photophysique des photosensibilisateurs

Les porphyrines [21], les chlorines et les bactériochlorines (Figure 6) sont parmi les photosensibilisateurs les plus utilisés pour la PDT *in vivo*, bien que d'autres classes de porphyrines comme les phtalocyanines et les texaphyrines sont aussi utilisées. Les porphyrines, les chlorines et les bactériochlorines ont une absorption maximale dans la partie rouge du spectre électromagnétique Cette absorption dans le rouge permet à ces molécules d'avoir une production efficace d'oxygène singulet. Le fait d'avoir une absorption maximale dans le rouge permet d'utiliser une source lumineuse qui va pénétrer plus profondément dans les tissus. Ce sont en général des molécules aromatiques planaires composées de quatre unités pyrroles liées par des liaisons méthines. Bien que les texaphyrines (Figure 7_F) aient trois unités pyrroliques et que les phtalocyanines sont liées par des ponts à base d'azote, ces deux molécules sont planaires et aromatiques. Elles ont également les mêmes propriétés que la famille des tétrapyrroles. Les porphyrines, les chlorines et les bactériochlorines sont des molécules avec une conjugaison cyclique non interrompue. Il faut toutefois être attentif que les chlorines ont une double liaison pyrrolique réduite et que les bactériochlorines ont deux doubles liaisons pyrroliques réduites. C'est grâce à leur conjugaison cyclique non interrompue que ces molécules absorbent la lumière du spectre visible [34].

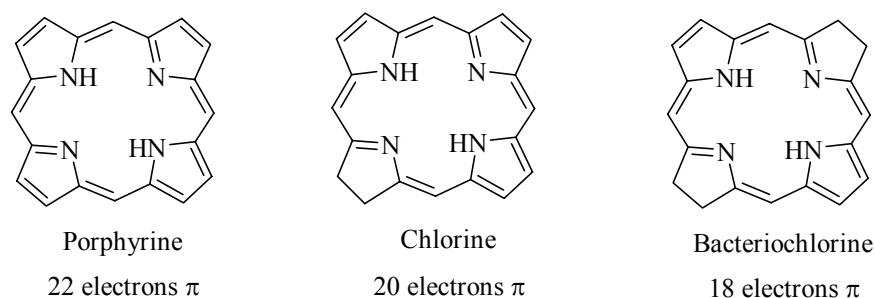


Figure 6 : Structure chimique de base des porphyrines, des chlorines et des bactériochlorine

Tous les dérivés porphyriques ont une forte bande d'absorption autour de 400 nm appelée bande de Soret. Malheureusement, cette bande n'est pas vraiment utile pour la PDT, puisque le bleu ne pénètre pas profondément au sein des tissus; par conséquent, seules les bandes d'absorption plus faibles (Q-bands) se situant entre 600 nm et 800 nm ($\epsilon = 30000$ et 300000 en fonction du type de porphyrine) peuvent être utilisées pour les traitements, afin d'obtenir une bonne pénétration de la lumière. Les porphyrines [22;23] ont une absorption maximale faible vers 630 nm tandis que les chlorines [24;25] et les bactériochlorines ont une absorption maximale forte vers 650 nm et 710 nm. Les dérivés des porphyrines (dérivé hématoporphyrique (HpD) et dihématoporphyrines éther (DHE)) ont donc un spectre d'absorption avec une bande large à 405 nm et des bandes secondaires d'amplitude décroissante jusqu'à 630 nm [26]. La fluorescence obtenue lorsqu'on éclaire avec une lumière de longueur d'onde de 405 nm a permis d'utiliser ces agents comme marqueur de tumeur [27]. Par contre, dans la mesure où cette longueur d'onde est pratiquement complètement absorbée par le tissu bien avant une profondeur d'un millimètre, une longueur d'onde plus élevée est utilisée pour l'intervention thérapeutique. En effet, l'absorption tissulaire de la

lumière, liée à la présence de chromophore endogène et principalement à l'hémoglobine, est minimale au-delà de 600 nm, ce qui permet un effet thérapeutique en profondeur dans le tissu [28]. A 630 nm, la longueur d'onde choisie pour le traitement clinique avec la DHE, la profondeur de pénétration efficace est de l'ordre de 1 à 5 mm [29] [30]. La pénétration tissulaire est plus élevée encore pour des longueurs d'onde supérieures, de l'ordre de 800 nm [28], ce qui explique le souci de développement des nouveaux agents photosensible ayant ces caractéristiques d'absorption spectrales.

1.3.2.2 La Photofrin®

Le photosensibilisateur le plus communément utilisé et étudié à ce jour est la Photofrin®, qui est disponible commercialement [13]. La Photofrin® est facilement synthétisée en faisant réagir l'hématoporphyrine dans un mélange d'acide sulfurique et d'acide acétique, afin de former l'hématoporphyrine-IX (di- and mono-) acétate. Après un traitement avec une solution aqueuse basique, un mélange brut est obtenu, il est communément appelé dérivé d'hématoporphyrine (HpD) [20]. La Photofrin® qui est commercialisée est obtenue par élimination des produits ayant un poids moléculaire faible (Figure 1).

La fraction purifiée est la plus active contre les tissus tumoraux et est composée de monomères, dimères, trimères et de grands oligomères de huit ou neuf unités de porphyrines. Cliniquement Photofrin® n'a montré aucune toxicité systémique¹ et ne semble ni cancérigène, ni mutagène aux doses utilisées [31]. Le seul problème qui est lié avec la majorité des photosensibilisateurs est l'accumulation du produit dans la peau, ce qui peut amener une sensibilité envers la lumière du soleil, entraînant de sévères brûlures ou des photoréactions. Le patient peut être amené à porter des vêtements de protection et des lunettes de soleil durant 5 semaines après le traitement. L'absorption de la Photofrin® dans la bande rouge du spectre électromagnétique est un pic relativement faible ($\epsilon_{630} \sim 3000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Une source lumineuse peut activer de façon adéquate à cette longueur d'onde jusqu'à une profondeur d'environ 5mm dans les tissus. Le fait que la Photofrin® n'ait pas une forte absorption dans le rouge et qu'il engendre une photosensibilité généralisée a amené les chercheurs à se pencher sur l'utilisation de nouveaux sensibilisateurs.

1.3.2.3 Les nouveaux photosensibilisateurs

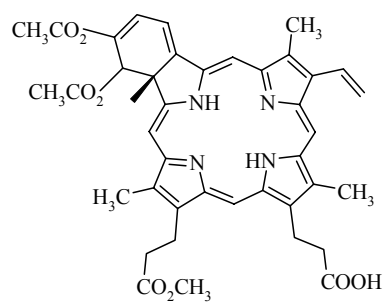
De nombreux nouveaux produits ont été synthétisés avec l'intention de créer un meilleur photosensibilisateur que la Photofrin®. Les chercheurs tentent de mettre au point des nouveaux chromophores ayant les avantages de la Photofrin®, tout en évitant ses défauts. Il faut donc trouver des molécules possédant une absorption importante à une longueur d'onde supérieure à 630nm, afin d'éviter d'avoir, comme pour la Photofrin®, une absorption relativement faible aux longueurs d'onde qui permettent une pénétration optimale de la lumière. Après purification, les chromophores intéressants sont testés *in vitro* et *in vivo*, afin de déterminer leurs activités pour la PDT. Les propriétés pharmacologiques de ces nouveaux

¹ On emploie le terme systémique lorsqu'un médicament est administré par voie orale ou par injection.

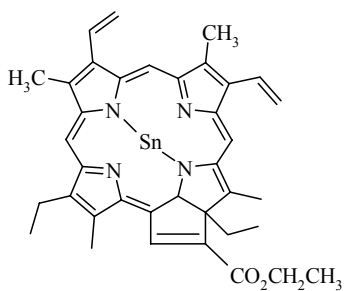
composés sont également testées. Idéalement, un photosensibilisateur devrait être non toxique, retenu sélectivement dans les tissus cancéreux à haute concentration, soluble dans l'eau et éliminé du corps dans un laps de temps raisonnable, ainsi que de la peau afin d'éviter des photoréactions indésirables.

Plusieurs dérivés de benzoporphyrine (BPDS : benzoporphyrin derivatives) ont été synthétisés à partir de la protoporphyrine [32]. Les chromophores BPD ont une absorption maximale aux environs de 690nm. Une étude comparative de plusieurs analogues BPD a montré que le dérivé monoacide avec un cycle benzo attaché au cycle A (BPD-MA) (Figure 7_A) était plus actif pour la PDT que les versions diacide ou diméthyle ester [32]. Les propriétés pharmacologiques de BPD-MA sont défavorables pour le traitement de certains cancers, car il est trop rapidement éliminé du sérum et des tissus, y compris des lésions cancéreuses [33]. Trois heures après l'injection, la concentration est maximale dans les tumeurs. Malheureusement après ce temps, la concentration diminue et cela n'est pas suffisant pour avoir une bonne sélectivité. Tous ces problèmes liés à la PDT s'avèrent être des atouts pour le traitement d'une autre maladie tel que le développement de petits vaisseaux sanguins dans les yeux. Ce médicament a été commercialisé sous le nom de Visudyne[®] (verteporfine pour injection) (Figure 7_A), il permet de détruire la néovascularisation qui se développe sur la rétine par un traitement PDT.

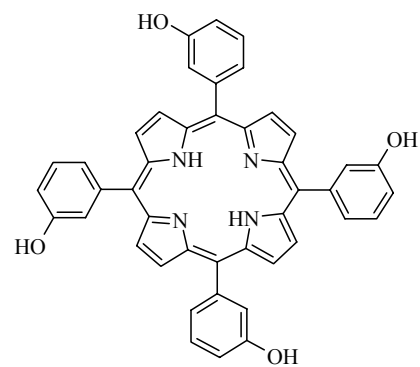
D'autres photosensibilisateurs peuvent être cités : meta-tetrahydroxyphényle chlorine (m-THPC), commercialisé sous le nom de Foscan (Figure 7_C). Ce produit peut induire une photosensibilité 20 jours après l'administration [34]. Ses propriétés photodynamiques sont tellement importantes qu'il est souvent utilisé à faible dose et traité avec une source lumineuse qui pénètre moins profondément comme le vert. Les produits suivants sont aussi utilisés en PDT : l'étiopurine d'étain (SnEt₂) dont le nom commercial est Purtytin[®] (Figure 7_B), monoaspartyl chlorine e₆ (Npe₆) (Figure 7_D) [35] qui a des propriétés pharmacologiques proches de la visudyne. Ce composé est aussi testé afin de détruire la néovascularisation de la rétine. Et pour finir le lutetium texaphyrine, commercialisé sous le nom de Lutex (Figure 7_F) est un photosensibilisateur non porphyrique qui est utilisé pour traiter les mélanomes malins, il est actuellement en test clinique. L'action de ces photosensibilisateurs peut être combinée avec toute une série d'autres molécules, tels que des inhibiteurs [36], des facteurs de croissance, etc.



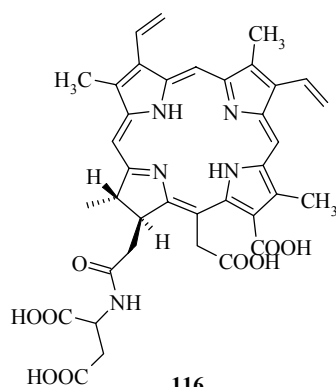
113
(A) Dérivé benzoporphyrine
(Verteporfine)
QLT Photothérapeutiques



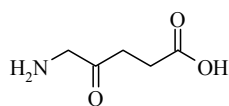
114
(B) Etiopurine d'étain
(Purlytine)
Miravant



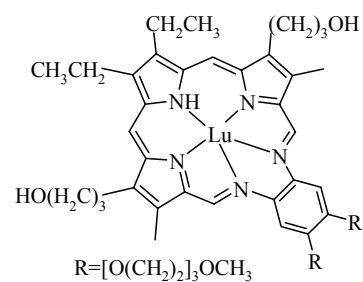
115
(C) *m*-tetrahydroxyphenyle chlorine
(Foscan)
Scotia



116
(D) Mono-aspartyle chlorine ϵ_6
(NP ϵ_6)
Nippon Petrochemicals



7
(E) Acide 5-aminolevulinique
(Levulan)
DUSA



118
(F) Lutetium texaphyrine
(Lutex)
Pharmacyclics

Figure 7 : Photosensibilisateurs candidats pour une utilisation en thérapie photodynamique

1.3.2.4 Rapport entre l'activité et la structure du photosensibilisateur

Le rapport entre la structure et l'activité a été étudié pour toute une série de molécules analogues [31]. Le rapport structure/activité a été mis au point afin d'identifier les caractéristiques structurales qui affectent l'activité biologique d'un composé [37]. La plupart des produits présentés dans le paragraphe (1.3.2.3 p.10) ont été obtenus après des études qui ont permis d'optimiser leur structure.

La structure, la charge et l'hydrophobicité des photosensibilisateurs influencent la façon dont ils sont accumulés au sein des cellules. *In vivo*, on trouve de nombreuses protéines, du sérum et des cellules sanguines avec lesquelles les composés peuvent interagir sur des sites spécifiques. Ce paramètre peut donc également influencer l'activité du colorant. A l'intérieur des tissus cancéreux, les gradients de pH, les irrégularités de la vascularisation et les anomalies du flux sanguin contribuent à sélectionner l'endroit où le photosensibilisateur se localisera, mais influencera également sa concentration et son entrée dans les cellules à traiter. Théoriquement, les photosensibilisateurs peuvent être mis au point par l'étude des structures, mais dans la réalité, ils sont découverts lors du test de bibliothèques de composés. Habituellement lorsqu'une molécule, possédant des propriétés photophysiques intéressantes, est découverte, la structure chimique du produit est modifiée, afin d'améliorer ses caractéristiques pharmacologiques. Récemment, des règles (ou conditions) ont été émises [38] pour la constitution d'un bon agent photosensibilisateur en PDT :

1. L'agent doit être un composé pur caractérisé par une synthèse reproductible.
2. Il doit pouvoir être activé à des longueurs d'onde supérieures à 650 nm, de manière à assurer une meilleure absorption de la lumière rouge qui pénètre plus profondément dans les tissus, et ainsi une meilleure sensibilisation par une source lumineuse externe.
3. Il doit être non toxique en absence de lumière.
4. Ses états excités (en particulier l'état excité triplet) doivent être de durée de vie suffisamment longue pour lui permettre de photocatalyser la production d'oxygène singulet (responsable de l'effet PDT).
5. Il doit être en mesure de se localiser de manière spécifique dans la tumeur.
6. Il doit pouvoir être éliminé rapidement du corps après son action.
7. Il doit être soluble dans les fluides tissulaires du corps, de manière à ce qu'il puisse être injecté et qu'il puisse être transporté à travers le corps jusqu'à l'emplacement de la tumeur.

1.3.3 La lumière utilisée en thérapie photodynamique

1.3.3.1 Dosage de la quantité de lumière pour la PDT

La destruction sélective d'une tumeur ne peut être obtenue que si la quantité de photosensibilisateur accumulée dans les tissus cancéreux est plus élevée que celle contenue dans les tissus sains entourant la lésion. La sélectivité peut être améliorée en illuminant sélectivement la tumeur et en épargnant ainsi au maximum les tissus sains. Star *et al.* et Svaasand *et al.* ont développé mathématiquement le concept de "PDT dose". La PDT dose est une mesure de l'énergie absorbée par le photosensibilisateur dans un volume déterminé de tissu. L'équation mathématique de la "PDT dose" (Équation 1) est le produit de l'irradiance [$\Psi(\lambda, q, t)$], du coefficient d'extinction molaire du photosensibilisateur [$\varepsilon(\lambda)$], et de la concentration du photosensibilisateur dans la région du traitement [$C(q, t)$].

$$D_{PDT} = \int_0 \int_q \varepsilon(\lambda) \cdot c(q, t) \cdot \psi(\lambda, q, t) dt dq$$

Équation 1 : Détermination mathématique de la "PDT dose". t est le temps d'exposition à la lumière, q est une coordonnée spatiale générale, et λ est la longueur d'onde de la lumière utilisée pour le traitement.

Théoriquement, la "PDT dose" pourrait être calculée précisément si le taux de pénétration, la concentration du médicament et le coefficient d'extinction étaient connus à chaque point et à chaque instant lors de la durée de l'irradiation. L'Équation 1 est générale, si bien que la concentration ciblée [$C(q, t)$] peut déterminer la concentration d'un photosensibilisateur dans un volume de tissu ou dans une plus petite région telle qu'une cellule, des organelles¹ à l'intérieur des cellules, ou même de protéines spécifiques. L'Équation 1 montre que si un photosensibilisateur se trouve dans une région ciblée avec une concentration (C_c) et dans la région entourant la cible avec une concentration (C), la "PDT dose" sera modifiée par un facteur égal au rapport des deux concentrations (C_c/C). En réalité, la concentration du photosensibilisateur ne diffère que légèrement entre les tissus sains et les tissus tumoraux lors de traitement avec la Photofrin[®]. Par conséquent, en absence d'un traitement permettant d'avoir une distribution sélective du photosensibilisateur, la lumière doit être administrée le plus sélectivement possible avec des fibres optiques et des lentilles spécifiques.

1.3.3.2 Pénétration de la lumière au sein des tissus

Svaasand [39], Wilson et al [40] et d'autres chercheurs ont démontré que la lumière avec une longueur d'onde proche de 800 nm (Figure 8) traverse plus facilement les divers tissus. Cela peut facilement être observé en plaçant une lampe de poche sur une joue et en observant la lumière rouge à l'intérieur de la bouche. Cette petite expérience permet d'illustrer le fait

¹ Éléments prenant place à l'intérieur du cytoplasme, il s'agit des constituants de la cellule, appelés également organites.

qu'une lumière rouge pénètre plus profondément dans les tissus et ce n'est en aucun cas dû au sang, comme on pourrait le penser.

La longueur d'onde et la fréquence sont reliées par la vitesse à laquelle se propage l'onde. Pour la lumière cette vitesse est une constante absolue de la nature, symbolisée par la lettre c et qui vaut très exactement $c = 2,99792 \times 10^8 \text{ ms}^{-1}$, soit environ 300.000 Km parcourus en une seconde. Un aperçu de ce que l'on nomme le spectre électromagnétique est reporté dans le Tableau 1.

Type de rayon	Longueur d'onde ¹	Description
Rayons cosmiques	$\lambda < 1 \text{ fm}$ ($E > 1 \text{ GeV}$)	Particules élémentaires
Rayons γ	$\lambda < 1 \text{ pm}$ ($E > 1 \text{ MeV}$)	Excitation des noyaux atomiques
Rayons X	$\lambda < 10 \text{ nm}$ ($E > 100 \text{ eV}$)	Excitation des atomes
Ultraviolets (UV)	$\lambda < 400 \text{ nm}$ ($E > 3 \text{ eV}$)	Excitation des petites molécules
Lumière visible	$\lambda < 700 \text{ nm}$ ($E > 1,8 \text{ eV}$)	Excitation des grosses molécules
Infrarouge	$\lambda < 1 \text{ mm}$ ($E > 1 \text{ meV}$)	Vibrations moléculaires
Ondes radar	$\lambda < 1 \text{ cm}$ ($E > 0,1 \text{ meV}$)	Rotations moléculaires
Ondes FM TV	$\lambda < 1 \text{ m}$ ($E > 1 \text{ } \mu\text{eV}$)	Retournement des spins
Ondes SW	$\lambda < 100 \text{ m}$ ($E > 10 \text{ neV}$)	Petites ondes radio
Ondes MW	$\lambda < 1 \text{ Km}$ ($E > 1 \text{ neV}$)	Ondes radio moyennes
Ondes LW	$\lambda < 10 \text{ Km}$ ($E > 0,1 \text{ neV}$)	Grandes ondes radio
Courant alternatif	$\lambda \rightarrow +\infty$ ($E \rightarrow 0$)	Courant continu si $\lambda = 0$

Tableau 1: Aperçu du spectre électromagnétique

La lumière visible et colorée occupe donc dans le spectre électromagnétique un domaine très étroit de longueur d'onde ($400 \text{ nm} \leq \lambda \leq 700 \text{ nm}$), correspondant à une bande d'énergie très fine voisine de 1 eV. La raison pour laquelle ce domaine est si étroit est lié au fait que notre organisme (et donc notre oeil qui nous permet de voir) est bâti à partir de molécules. Comme on peut le constater, si la longueur d'onde est très grande, la lumière traverse de part en part l'organisme, car son énergie est beaucoup trop faible ($E < 0,1 \text{ meV}$) pour interagir avec les molécules. A l'inverse si la longueur d'onde est très courte ($E > 3 \text{ eV}$), les électrons responsables de la cohésion des molécules peuvent être arrachés, provoquant des dégâts absolument irréparables. C'est le fameux coup de soleil des vacances qui fait si mal, ou encore le rayonnement d'une bombe atomique qui engendre des conséquences désastreuses sur les êtres vivants. Le domaine intermédiaire ($1 \text{ meV} < E < 3 \text{ eV}$) est celui où l'on peut se rendre compte que l'on vient de rencontrer une onde électromagnétique. Deux sens sont concernés par cette rencontre entre la lumière et la matière corporelle. Le sens du toucher par le biais de la peau et de la sensation de chaleur qu'elle transmet (ondes infrarouge avec $E < 2 \text{ eV}$). Et bien sûr le sens de la vue par le biais de l'oeil et des images qu'il transmet (ondes optiques avec $2 \text{ eV} < E < 3 \text{ eV}$). Entre un simple chatouillement ($E < 1 \text{ eV}$) et véritable torture ($E > 3$

¹ On passe de la longueur d'onde L à l'énergie lumineuse associée au moyen de la relation: $E \text{ (eV)} = 1240/L \text{ (nm)}$.

eV), la plage de longueur d'onde pouvant être utilisée en PDT n'est forcément que très limitée.

La profondeur de pénétration de la lumière est dépendante des propriétés optiques du tissu traversé ainsi que de la longueur d'onde de la source lumineuse [39-42]. Lorsque des photons pénètrent, une partie d'entre eux sont réfléchis par la surface du tissu et les autres sont éparpillés au sein du tissu jusqu'à ce qu'ils soient éjectés ou qu'ils soient absorbés par un colorant tel que des chromophores endogènes ou encore des molécules exogènes telles qu'un photosensibilisateur [39-41;43;44]. Théoriquement quelques photons peuvent passer complètement au travers des tissus, mais leur nombre est très faible [41]. Les longueurs d'onde en dessous de 800 nm sont dispersées avec une efficacité accrue par les macromolécules puisqu'elles sont de taille égale ou plus faible que les particules [41] (Tableau 1).

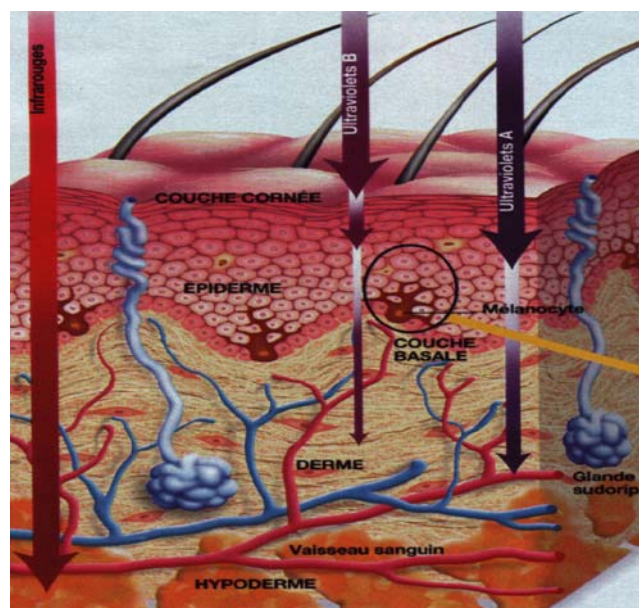


Figure 8 : Profondeur de pénétration de la lumière en fonction de sa longueur d'onde. On voit que les infrarouges qui ont une longueur d'onde plus grande que les ultraviolets pénètrent plus profondément. Les Ultraviolets quand à eux ont une énergie plus grande que les infrarouges, c'est pour cette raison qu'ils sont capables d'endommager le génome et de provoquer des cancers de la peau.

Le coefficient d'atténuation [$\alpha(\text{cm}^{-1})$] décrit la décroissance exponentielle d'une longueur d'onde spécifique d'un faisceau lumineux lorsqu'il traverse un tissu. Ce coefficient est différent pour chaque type de tissu [39-42]. L'irradiance Ψ à une profondeur (r) est donné par l'Équation 2 [43]. Elle est déterminée à partir d'un point d'une source lumineuse dans un volume de dispersion moyen avec un coefficient d'atténuation (α). Cette équation est dérivée de la théorie de diffusion

$$\Psi = \Psi_0 \frac{e^{-\alpha r}}{r}$$

Équation 2 : Equation mathématique décrivant l'irradiance. r profondeur, α coefficient d'atténuation.

Le taux de pénétration décroît exponentiellement avec la profondeur. Par conséquent, un changement minimal du coefficient d'atténuation entraîne des changements importants du taux de pénétration de la lumière en fonction de la profondeur. De ce fait, il est avantageux de posséder des photosensibilisateurs qui absorbent près de 800 nm, afin d'obtenir un traitement en profondeur dans une grande variété de tissus. L'inverse du coefficient d'atténuation est la profondeur de l'atténuation [$\delta(\text{cm})$] qui décrit la profondeur à laquelle la lumière entrant dans le tissu est réduite de $1/\alpha$ (approximativement 37%) de son intensité initiale. Des valeurs typiques de la profondeur d'atténuation se situent entre 1 et 3 mm pour des tissus non pigmentés [39-42]. Dougherty a décrit que les effets destructifs de la PDT pouvaient s'étendre à deux fois la profondeur d'atténuation ou environ 5 à 6 mm, en tenant compte de ces informations, dix pour cent de la lumière initiale serait donc nécessaire afin de pouvoir observer un effet photodynamique [45].

Vers 800 nm, on observe une fenêtre où la lumière pénètre plus profondément au sein des tissus. En première approche il serait donc intéressant d'utiliser des chromophores absorbants à cette longueur d'onde. Cependant aux longueurs d'onde supérieures à 800nm, les molécules d'eau commencent à absorber la lumière et à convertir cette énergie en chaleur, cela peut réduire considérablement l'efficacité du traitement. Les tissus hautement pigmentés peuvent également diminuer dramatiquement la profondeur à laquelle la lumière peut pénétrer au sein des tissus. Cela a été démontré en traitant des groupes séparés de cochons d'Inde noirs et blancs (cobayes) avec des doses précises de dihématoporphyrines éther (DHE)-PDT jusqu'à l'obtention d'une réponse similaire. Les cochons blancs ont pu être traités avec 26 J cm^{-2} de lumière verte, afin d'obtenir une réponse au traitement, alors que les cochons noirs ont demandé une exposition de 58 J cm^{-2} , à cause de la grande absorption de la mélanine [46]. Dougherty et al ont aussi décrit que le photosensibilisateur pouvait diminuer la profondeur d'atténuation, si il possédait un grand coefficient d'extinction et s'il était présent à haute concentration dans la tumeur.

1.3.3.3 Sources lumineuses

La lumière nécessaire à l'activation des photosensibilisateurs est le plus souvent générée par des lasers ou dans certains cas par des lampes à arc ou des sources lumineuses fluorescentes. Les lasers sont le plus fréquemment utilisés parce qu'ils produisent une lumière monochromatique hautement cohérente qui peut être facilement conduite au travers de fibres de quartz, afin d'acheminer la lumière vers le lieu de traitement. Les systèmes produisant le laser ne se trouvent généralement pas en salle de traitement, car leurs alimentations et leurs systèmes de refroidissement sont souvent bruyants, encombrants et volumineux.

Puisqu'ils ne peuvent généralement pas être utilisés directement dans la chambre d'opération, la lumière est acheminée au travers de fibres optiques jusqu'au site de traitement, souvent à l'aide d'un endoscope. Les fibres peuvent être équipées avec une grande variété de lentilles et de diffuseurs, ce qui permet une illumination optimale des zones à traiter. Par exemple : pour le traitement des organes sphériques comme la vessie, ils sont illuminés avec un diffuseur sphérique en forme de bulle, alors que des régions tubulaires comme l'œsophage, peuvent être éclairées avec des diffuseurs cylindriques de différente longueur. Pratiquement, les fibres optiques les plus fines peuvent aussi être insérées au travers d'orifice existant à l'aide de bronchoscopes ou encore d'endoscopes, ce qui permet d'éviter des opérations chirurgicales trop lourdes. Dans le futur, de nouvelles méthodes vont voir le jour pour rendre l'exposition

lumineuse plus performante. Actuellement, des diodes lasers bon marché sont utilisées, supplantant par la même occasion les problèmes cités plus haut liés à l'utilisation de laser à l'argon.

1.3.3.4 Le photoblanchiment des photosensibilisateurs

Le photoblanchiment est la destruction du photosensibilisateur par des processus générés par la lumière. Il a été observé que la lumière dégradait les photosensibilisateurs en solution. Généralement, le photoblanchiment est mesuré par une diminution de la fluorescence durant le temps, puisque la concentration du photosensibilisateur et l'intensité de la fluorescence émise sont proportionnelles [47]. Il existe d'autres mécanismes qui peuvent diminuer la fluorescence, tels que les agrégats, les mécanismes d'élimination ou encore les changements des propriétés optiques des tissus [45;46]. Il a été observé que le photoblanchissement du photosensibilisateur peut être induit par l'oxygène singulet [48;49], mais peut être également indépendamment de l'oxygène [49;50].

En solution aqueuse la Photofrin[®] photoblanchit très lentement probablement parce que le produit est fortement agrégé. Puisque dans un état agrégé la Photofrin[®] a un faible rendement quantique d'oxygène singulet, on a supposé en première approche que la Photofrin[®] était photoblanchie par un mécanisme dépendant de l'oxygène [45]. La photodestruction du photosensibilisateur entraînée par l'oxygène a été démontrée théoriquement et expérimentalement [45].

Des études complémentaires ont démontré que le type I de photodégradation prédomine. Ainsi la Photofrin[®] peut photoblanchir rapidement dans des solutions désoxygénées, suggérant par là qu'un mécanisme de type I de photoréaction pourrait entraîner sa photodestruction. Lors de la première expérience, l'agrégation a probablement inhibé le photoblanchiment par inhibition de la photoréaction de type I. Dougherty a suggéré que dans les systèmes biologiques, les protéines et autres composants cellulaires interagissent la Photofrin[®], cela pourrait être également un facteur important dans l'efficacité de la PDT [45]. Expérimentalement, il a été déterminé que 60% de la Photofrin[®] était photoblanchie après un traitement *in vivo* standard.

Bien que l'impact du photoblanchiment a été étudié pour plusieurs porphyrines, *in vitro* et *in vivo*, il entraîne pas de problème sur l'activité PDT [47;48]. Il est probable que le photoblanchiment détruit rapidement une grande quantité du médicament qui se trouve dans les lésions mais également dans les tissus sains autour de la tumeur. Si cela se passe rapidement, les tissus normaux devraient être épargnés par les dommages photodynamiques, puisque l'uptake et l'utilisation du photosensibilisateur y sont moindres, alors que les tissus malades ayant une concentration importante du photosensibilisateur seront détruits.

Le photoblanchiment permet par une illumination faible ou contrôlée des patients d'éliminer la Photofrin[®] de la peau [51;52]. En conclusion, le photoblanchiment ne pose pas de problème lors des traitements PDT, car au sein des tumeurs, malgré une destruction d'une partie du photosensibilisateur, la concentration importante du médicaments permet un traitement efficace. Le photoblanchiment est même un avantage car il permet d'éliminer le photosensibilisateur des tissus sains, évitant ainsi des effets secondaires dus à une photosensibilisation.

1.4 Mécanisme biologique de l'action de la PDT

1.4.1 Les parties des cellules où se concentrent le photosensibilisateurs

Au cours du développement de nouveaux photosensibilisateurs, des études sur la localisation tissulaire et cellulaire peuvent être effectuées. Les mitochondries, les lysosomes, les membranes, ainsi que les noyaux des cellules tumorales ont été évalués en tant que cibles potentielles de la PDT. Du fait de la migration limitée de l'oxygène singulet à partir du lieu de sa formation, les sites du dommage cellulaire/tissulaire causé par la PDT sont en relation directe avec l'emplacement du sensibilisateur [8]. Les sensibilisateurs les plus hautement sélectifs sont la porphyrine monocationique pour les membranes [53] et le monomère porphycène pour les mitochondries¹ [54]. Les sensibilisateurs qui ne sont pas assimilés par les cellules, comme par exemple l'uroporphyrine, sont extrêmement peu actifs, malgré le fait que certains d'entre eux sont caractérisés par un rendement élevé en oxygène singulet.

En outre, puisque la plupart des sensibilisateurs ne s'accumulent pas dans le noyau cellulaire, la PDT a généralement peu de probabilités de causer des dégâts au niveau de l'ADN, et de provoquer ainsi des mutations [55]. Les sensibilisateurs situés dans les mitochondries, comme le Photofrin[®], ou alors produits au sein des mitochondries, comme la protoporphyrine IX (PpIX) dérivée de l'acide δ -aminolévulinique (ALA), sont en mesure de déclencher le phénomène d'apoptose (1.4.3 p.20) [56], alors que les sensibilisateurs localisés au sein de la membrane plasmique sont susceptibles de provoquer une nécrose (1.4.3) lors de l'exposition à la lumière. Les photosensibilisateurs hydrophiles, pour leur part, sont susceptibles d'être absorbés par endocytose, raison pour laquelle ils se situent préférentiellement dans les lysosomes. L'exposition à la lumière est donc en mesure de provoquer une perméabilité de ces derniers qui permet ainsi aux sensibilisateurs et aux hydrolases lysosomales d'être libérés au sein du cytosol. Des colorants présents dans ce dernier sont alors en mesure de rendre la tubuline sensible aux dommages provoqués par la PDT [57]. Ce phénomène conduit à l'accumulation de cellules au stade de la mitose, et peut mener à la mort cellulaire [58]. A noter que la probabilité d'inactivation cellulaire en fonction de la quantité de lumière absorbée varie selon le sensibilisateur PDT considéré [59].

Les dommages causés par la PDT à la membrane plasmique peuvent être observés quelques minutes seulement après l'exposition à la lumière. Ce type de dégât se traduit, entre autre, par

¹ Il est admis parmi le corps scientifique que les mitochondries descendent de bactéries qui aurait envahi les cellules de nos ancêtres lointains. En effet les mitochondries ressemblent énormément à un groupe particulier de bactéries que l'on appelle phylum des bactéries pourpres. Mitochondrie signifie fil, c'est pour cette raison qu'elles sont habituellement représentées comme de minuscules organites filiformes. Les mitochondries sont le siège de l'énergie cellulaire. À ce niveau se produit la plus grande partie de l'ATP cellulaire c'est pour cette raison que leur nombre est plus important dans les zones de la cellule où l'activité est la plus importante. Les mitochondries sont délimitées par deux membranes possédant la même nature que la membrane cytoplasmique elle-même. Si la membrane externe est lisse la membrane interne quant à elle, présente de nombreux replis appelés crêtes mitochondriales ressemblant à des étagères. À l'intérieur même de la mitochondrie se situe la matrice dans laquelle les crêtes plongent. Il s'agit d'une substance gélatineuse où les nutriments comme l'acide pyruvique qui provient du glucose et des acides gras (éléments constituant les protéines) sont métabolisés (traités) est dégradés en eau et en gaz carbonique grâce à l'intervention de certaines enzymes dont une partie est dissoute dans la matrice de la mitochondrie et l'autre partie appartient à la membrane interne à l'origine des crêtes dont nous venons de parler.

un gonflement de la cellule [60], par une réduction sensible du transport actif [61], par une dépolarisation de la membrane plasmique [62], par l'assimilation marquée d'un photosensibilisateur dû à la dégradation de la membrane [18], par l'inhibition de l'activité de certains enzymes présents dans la membrane [63], par la peroxydation de lipides [64] pouvant mener à la réticulation des protéines [65].

1.4.2 Les effets directs sur les cellules

Le principe de base de la PDT est de permettre la destruction des cellules ayant accumulé un photosensibilisateur après exposition à la lumière et formation d'une quantité létale d'oxygène singulet. Cela a été effectivement démontré *in vitro* par Chaistenser et al [73], Berns et al [74] et également par d'autres études. Comme cela a été expliqué dans la section (1.4.4 p.22), un grand pourcentage des cellules tumorales meurent *in vivo*, non à la suite de dégâts engendré à leur structure par l'oxygène singulet après un traitement PDT, mais à la suite de la destruction du système vasculaire de la tumeur. En effet ces dommages les privent d'oxygène et des éléments nutritifs qui leur sont essentiels. Cependant, il serait faux de croire que la destruction directe des cellules cancéreuses ne joue aucun rôle. Il faut cependant être conscient que la destruction directe des cellules cancéreuses n'est pas la seule voie qui amène à la destruction des tumeurs par apoptose ou par nécrose.

1.4.3 L'apoptose et la nécrose : deux types de mort cellulaire

Nos cellules et tissus peuvent être soumis à une grande variété d'agressions, physiques (irradiations, hyper ou hypothermie), infectieuses, chimiques (acidose), métaboliques (exposition à des xénobiotiques, privation d'un facteur hormonal ou facteur de croissance). La plupart de ces agressions débouchent sur une réaction commune appelée stress oxydatif. Il en résulte une production de radicaux dérivés de l'oxygène. Ces radicaux qui sont extrêmement réactifs vont réagir avec des substrats organiques engendrant des dégâts plus ou moins importants aux cellules. Soumises à une agression quelconque susceptible d'altérer leur intégrité, les cellules répondent en développant des systèmes de défenses et de réparation tels que le système immunitaire, les systèmes de contrôle de qualité des protéines biosynthétisées ou encore les systèmes contrôlant l'intégrité de la structure de la cellule. En cas d'anomalie, la cellule stoppe toute division cellulaire supplémentaire, de façon à laisser le temps aux enzymes de réparation d'accomplir leur travail. Lorsque les dégâts constatés sont trop importants ou que le signal de mort est impératif, un processus de suicide cellulaire est enclenché, l'apoptose.

La nécrose survient accidentellement lorsque la cellule est grandement malmenée, par exemple lors de brûlures ou de fortes compressions. La cellule meurt alors en éclatant. Son contenu se retrouve dans le milieu environnant et provoque une réaction inflammatoire. Les traitements à base de photosensibilisateurs sont capables d'entraîner ces deux types de mort cellulaire, il est par conséquent important de pouvoir les différencier après un traitement PDT.

L'apoptose

L'apoptose [66] tire son nom de la chute programmée des feuilles. Elle représente une forme de mort cellulaire résultant de l'activation d'une machinerie interne à la cellule. Elle s'oppose à la mort nécrotique qui suppose une destruction d'origine exogène produisant une rupture membranaire et la dispersion du contenu cellulaire dans l'environnement (exemple d'une agression cellulaire par des toxines microbiennes générant des trous dans la membrane). Le suicide cellulaire (apoptose) est déclenché par un programme génétique que la cellule utilisera par défaut à moins de recevoir les signaux appropriés de survie issus de son environnement. L'apoptose est un mécanisme universel des êtres vivants, uni ou pluricellulaires. Chez les métazoaires, l'apoptose représente le mécanisme fondamental, qui de façon permanente, contrôle la taille et les fonctions des sociétés de cellules qui constituent nos tissus et nos organes. Ainsi, l'apoptose intervient lors de l'embryogenèse pour sculpter les différents organes, elle permet également le renouvellement des tissus en croissance, l'évolution cyclique des tissus soumis à des cycles hormonaux (muqueuse utérine), elle élimine les cellules sénescents ou malades, enfin elle constitue un mécanisme fondamental du fonctionnement du système immunitaire. On prend conscience depuis ces dix dernières années que l'apoptose est impliquée dans de nombreux processus pathologiques, soit par activation excessive comme dans les maladies neurodégénératives (sclérose latérale amyotrophique, maladie de Huntington, maladie d'Alzheimer après dégradation des neurones par fibrillation d'une protéine), soit une diminution pathologique de l'apoptose comme dans les cancers, les fibroses, etc.

La mort apoptotique [56;67] est constituée d'un ensemble de processus de digestions internes affectant d'abord le cytoplasme puis le noyau. La dégradation du cytosquelette fait perdre à la cellule sa polarité, la détache de ses voisines, l'arrondit et diminue son volume. De nombreuses protubérances apparaissent à sa surface. La membrane cytoplasmique qui entoure les corps apoptotiques est comme un chandail mis à l'envers : elle exhibe le phospholipide phosphoserine à la vue des cellules avoisinantes, alors que ce phospholipide est normalement exposé à l'intérieur de la cellule. La polarité phospholipidique de la membrane cellulaire est perdue, avec passage de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe. A un stade ultérieur, irréversible, le noyau va être également atteint. Il se condense et son ADN se sectionne. Le responsable de cette dernière fragmentation de l'ADN n'est pas un broyeur qui dégrade l'ADN de façon non spécifique, mais plutôt un ciseau précis. Au début, l'ADN est sectionné en gros morceaux de grandeur identique, lesquels sont ensuite coupés en de plus petits morceaux qui constituent différents multiples d'une même unité. La séparation par ordre de grandeur des fragments de l'ADN apoptotique forme une échelle où chaque barreau est équidistant des barreaux voisins.

Le point important est que, lors de l'apoptose, la membrane cellulaire reste intacte. Le phénomène se signale, par l'exposition de lipides et de sucres normalement situés à la face interne, à l'attention des phagocytes qui ingèrent avec une efficacité remarquable soit la cellule entière soit des fragments de celle-ci mais restant toujours limités par une membrane. L'intégrité membranaire, la rapidité de l'élimination cellulaire font que l'apoptose, même massive, n'induit aucune inflammation contrairement à ce qui peut se produire dans un phénomène nécrotique, où les différents compartiments cellulaires se rompant, déversent leur contenu au sein même des tissus. Si la nécrose ressemble à une explosion, l'apoptose s'apparente plutôt à une implosion. A partir de ces données, on présente brièvement les techniques qui permettent d'établir si une cellule est en train de mourir d'apoptose ou de nécrose. L'apoptose peut être mise en évidence soit en mesurant le contenu en ADN du noyau cellulaire par cytométrie de flux, soit en mettant en évidence les ruptures survenues dans la

chaîne nucléotidique, par immunomarquage ou par migration électrophorétique visualisant des fragments d'ADN de tailles variables.

La nécrose

C'est l'arrêt pathologique (anormal, dû à une maladie ou à un facteur extérieur) de fonctionnement d'une cellule. La nécrose [68;69] peut également toucher un ensemble de cellules ou un tissu alors que les autres parties du voisinage restent vivantes. La transformation qui en résulte est une mortification des cellules ou des tissus. La nécrose doit être différenciée de l'apoptose (mort cellulaire naturelle) qui elle est programmée génétiquement. Autrement dit, la nécrose se définit par des modifications morphologiques survenant lorsqu'une cellule arrive en fin de vie à la suite d'événements tels qu'un traumatisme important comme un arrêt ou une diminution de la circulation sanguine au niveau d'un organe, l'hyperthermie (élévation importante de la température), une intoxication par un produit chimique, etc.

C'est la membrane de la cellule qui est la plus touchée, entraînant une absence de régularisation des pressions régnant à l'intérieur de celle-ci, à l'origine la rupture de la cellule et au déversement (la cellule se vide) de son contenu dans les tissus de voisinage. La nécrose est à l'origine du processus inflammatoire. Une des nécroses les plus connues est celle du myocarde lors de l'infarctus (arrêt d'apport circulatoire au niveau du muscle cardiaque) due à une oblitération (obstruction) d'une artère coronaire. Les fibres musculaires sont alors détruites puis remplacées par un tissu inerte, c'est-à-dire ne possédant pas les capacités de se contracter en réponse à la transmission de l'influx nerveux.

1.4.4 Destruction du système vasculaire

Bien qu'il ait été démontré que l'HpD-PDT pouvait détruire les cellules cancéreuses *in vitro*, Menderson et al ont décrit que, lors de tests *in vivo*, ils avaient observé une destruction du système vasculaire des tumeurs dans une grande proportion. Les destructions observées (hémorragie et interruption du flux sanguin) privent la tumeur des nutriments et de l'oxygène dont elle a besoin pour sa survie. Cela a été confirmé par le traitement avec une source lumineuse de tumeurs animales. Quelques minutes après avoir injecté de la Photofrin®, les dommages causés par la PDT sont confinés dans le système vasculaire. Des amas de cellules tumorales nécrotiques provenant des vaisseaux endommagés ont été observés. Des mesures du taux d'oxygène dans les tissus tumoraux ont montré que la privation d'oxygène avait tué un grand nombre de cellules après le traitement par PDT.

Korbelik et al ont décrit que la destruction vasculaire, observée après la PDT, est similaire aux réponses inflammatoires observées après une infection ou une blessure des tissus [70]. Ainsi les effets d'agents inflammatoires ont été comparés aux effets induits par les photosensibilisateurs. Les cellules endothéliales produisent normalement une proportion équilibrée de substances vasoconstrictrices et vasorelaxantes qui maintiennent une circulation vasculaire normale. Par exemple, la prostacycline et le facteur de croissance de l'endothélium sont vasodilatateurs et inhibent l'agrégation des plaquettes. Ils sont produits simultanément avec l'endothéline-1, un agent qui va produire un stimulus de vasoconstriction des cellules endothéliales [71]. Lorsque l'on agit avec un facteur extérieur, dans notre cas la PDT [72], des réactions en cascade font basculer le système vers la vasoconstriction. Dans les régions où les vaisseaux ont été endommagés par la vasoconstriction, les plaquettes ainsi que les

neutrophiles adhérant aux parois des vaisseaux, se déplacent vers les zones où la constriction a eu lieu et forment des agrégats. L'effet sur la vascularisation dépend du type de photosensibilisateur. Il peut varier en forme et en intensité en fonction du produit utilisé. La destruction des vaisseaux est généralement considérée comme étant un des plus importants effets de destruction des tumeurs.

En résumé, la PDT induit principalement :

- La mort direct des cellules tumorales par apoptose ou par nécrose
- La destruction du système vasculaire de la tumeur

Les mitochondries sont également une cible potentielle pour un traitement PDT, car elles contiennent un taux élevé en oxygène, puisqu'elles sont le siège du métabolisme énergétique. Leur destruction par un traitement PDT entraîne la mort de la cellule par apoptose. Ainsi l'utilisation d'un photosensibilisateur capable d'être accumulé au sein des mitochondries permettrait d'éliminer efficacement les cellules tumorales. Cette approche est d'autant plus intéressante que les mitochondries sont l'endroit de la cellule où a lieu la biosynthèse de porphyrines naturelles. Il est donc envisageable d'utiliser ces photosensibilisateurs naturels pour un traitement PDT. Mais pour cela il faut développer une méthode permettant à la cellule d'obtenir une surproduction de molécules pouvant être utilisées comme photosensibilisateur.

1.5 Utilisation de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) en PDT

1.5.1 Introduction

La plupart des traitements photodynamiques (PDT) nécessitent l'administration de molécules photosensibilisatrices qui possèdent déjà les caractéristiques des photosensibilisateurs. De nombreux photosensibilisateurs artificiels ont tendance à être partiellement retenus, pour une période pouvant aller jusqu'à plusieurs semaines, au sein des tissus normaux. Par conséquent, des patients traités par PDT doivent éviter une exposition prolongée à la lumière vive pendant plusieurs semaines après le traitement. Il est donc normal que la recherche se soit penchée sur ces problèmes, afin de trouver des solutions permettant d'éviter ces effets secondaires. Les deux points importants que l'on a tenté d'améliorer sont :

- une augmentation de l'efficacité des photosensibilisateurs (sélectivités et efficacités)
- une diminution des effets secondaires (p. ex. photosensibilité généralisée).

Une alternative, au fait d'utiliser des sensibilisateurs préformés, consiste à employer des composés qui sont synthétisés au sein de l'organisme à partir de produits ne possédant pas de propriétés de photosensibilisation. Dès le début de la recherche sur la PDT, il a été constaté que les tumeurs étaient naturellement plus fluorescentes que les tissus sains. En effet, les cellules tumorales ayant un métabolisme particulier par rapport aux cellules saines accumulent une plus grande quantité de porphyrine. Une des approches envisagées a donc été de favoriser la surproduction d'une porphyrine ayant des propriétés fluorescentes. On a donc commencé à s'intéresser à la protoporphyrine IX (PpIX) qui est le précurseur immédiat de l'hème (Figure 22, p. 36). Cette molécule peut être utilisée comme photosensibilisateur endogène [75].

Comme les cellules des mammifères ont besoin d'enzymes à base d'hème, afin de mener à bien la production d'énergie lors du métabolisme aérobie, les cellules ont une capacité minimum leur permettant de produire de l'hème. La biosynthèse de l'hème étant extrêmement bien contrôlée pour éviter toute surproduction des précurseurs de l'hème, on n'observe que de quantités faibles de PpIX dans les cellules saines. Par contre, lors de condition anormale, comme par exemple lors de maladies génétiques telles les porphyries, la concentration d'un ou de plusieurs des précurseurs de l'hème peut augmenter. Il était donc nécessaire de trouver une méthode permettant d'augmenter la production de PpIX au sein des cellules cancéreuses, mais pour cela, il faut avant tout comprendre la voie biosynthétique qui amène à la production de PpIX

1.5.2 Les porphyrines

Les porphyrines [76] sont des pigments (colorants) qui jouent un rôle essentiel dans la vie sur la terre. La couleur verte des végétaux et la couleur rouge du sang dérivent tous les deux d'une seule et unique famille de pigments ayant comme base un macrocycle constitué d'atomes de carbone et d'azote. La particularité des porphyrines est le fait que de petites variations au niveau de la structure du macrocycle tétrapyrrolique sont en mesure de générer

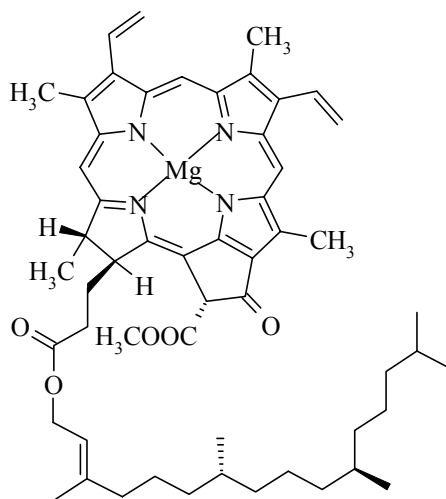
une grande diversité dans leurs fonctions biologiques. Les exemples les plus connus de ce type de macromolécules sont les porphyrines rouges contenant un atome de fer (hème ou hémoglobine) et les porphyrines réduites (chlorines) contenant un atome de magnésium trouvées dans la chlorophylle, le pigment responsable de la couleur verte chez les plantes.

La fonction principale des porphyrines et de leurs dérivés dans la nature est de se lier à des atomes métalliques qui agissent en tant que centre pour un grand nombre de réactions biochimiques. A première vue, il n'est pas évident que la chlorophylle et l'hème fassent partie de la même famille de composés. Toutefois ces deux molécules suivent durant une bonne partie de leur biosynthèse la même voie et ce n'est que vers les dernières étapes que des différences ont lieu. Il est encore important de noter qu'il existe d'autres types d'hémoprotéines, comme la vitamine B₁₂, les *dismutases*, les *peroxydases* et les *catalases*. Des hémoprotéines sont également impliquées dans la régulation des gènes, le métabolisme du fer, ainsi que dans la synthèse des hormones.

1.5.3 La chlorophylle

Les plantes se servent de la chlorophylle pour collecter l'énergie photonique émise par le soleil ; cette énergie permet la conversion du dioxyde de carbone et de l'eau en hydrate de carbone. Ce processus photosynthétique est vital dans l'écosystème du monde vivant, car les plantes ont besoin d'hydrates de carbone pour croître, des animaux se nourrissent avec ces plantes, puis d'autres animaux mangent ces animaux, etc. Plus simplement, on pourrait écrire : pas de chlorophylle, pas de photosynthèse, pas de vie (exception faite de certaines bactéries qui tirent leur énergie de sources chimiques uniquement).

La chlorophylle [77] représente le principal pigment assimilateur de la lumière chez les végétaux supérieurs. Les molécules de chlorophylle [78] sont exprimées au niveau des membranes internes des chloroplastes chez la majorité des végétaux, au niveau de diverticules internes de la membrane cytoplasmique chez les Cyanophycées et, en partie au moins, de vésicules cytoplasmiques chez les bactéries photosynthétiques. Les molécules chlorophylliennes ressemblent par leur structure aux molécules sanguines des globules rouges: amphipolaires, avec une «tête» polaire (soluble dans l'eau) et une «queue» apolaire (soluble dans les lipides). Cette tête comporte une couronne de porphyrine (noyau tétrapyrrolique) avec un atome de magnésium au centre. Le phytol, alcool à longue chaîne, constitue la queue de la chlorophylle.



Chlorophylle a
117

Figure 9 : Structure de la chlorophylle a

L'ensemble des pigments chlorophylliens est vert. Leurs spectres d'absorption des radiations visibles montrent des valeurs maximales dans le rouge et le bleu, et minimales dans le vert. La différence sensible entre les chlorophylles *a* et *b* permet l'absorption d'une plus large portion du spectre lumineux, complétée par l'action des pigments rouge, jaune et orange, appelés caroténoïdes et xanthophylles. Les caroténoïdes et les xanthophylles transmettent aux chlorophylles l'énergie lumineuse pour la convertir en énergie chimique.

Le mécanisme de la photosynthèse se divise en deux phases: absorption des rayons solaires ultraviolets et fixation du carbone de l'atmosphère. Elles sont qualifiées respectivement de *phase claire* et de *phase obscure*. Cette dernière, contrairement à ce qu'on pourrait croire, ne se déroule pas nécessairement dans l'obscurité, elle n'a en fait pas besoin de lumière pour se réaliser.

Ce sont les molécules de chlorophylle (pigment photorécepteur) contenues dans les chloroplastes (organites spécialisés localisés dans les cellules des tissus verts des végétaux) qui fixent ou absorbent les rayons ultraviolets. L'excitation des molécules de chlorophylle par la lumière déclenche un processus de transfert d'électrons qui aboutit à la formation de deux molécules de haut niveau d'énergie, lesquelles interviennent dans toutes les réactions bioénergétiques: le NADPH (nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, dans sa forme réduite) et l'ATP (adénosine triphosphate). Photosynthèse et respiration sont des phénomènes fondamentalement complémentaires, puisque le premier fixe le gaz carbonique produit par le second.

La respiration peut se résumer par la réaction suivante (Figure 10) :

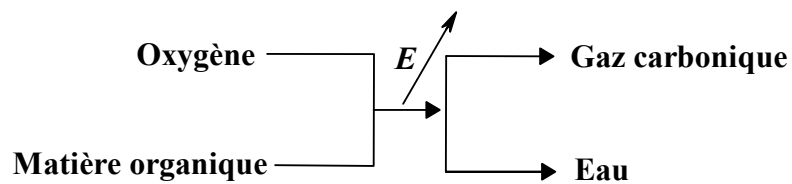


Figure 10 : Effets de la respiration

Et la photosynthèse ainsi (Figure 11) :

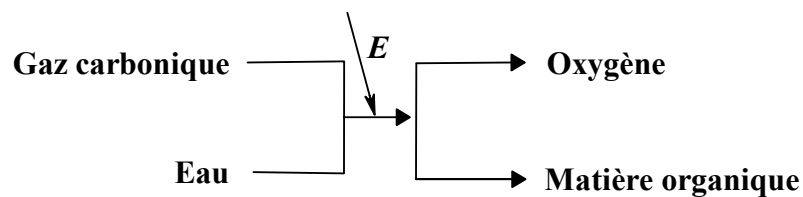


Figure 11: Effets de la photosynthèse

1.5.4 L'hémoglobine et son rôle dans la vie

1.5.4.1 Introduction et généralités

C'est en 1862 que le physiologiste allemand Hoppe-Seyler a utilisé pour la première fois le terme "hémoglobine" [79] pour désigner le pigment respiratoire contenu dans les globules rouges et servant au transport de l'oxygène. Les hémoglobines constituent une famille très ancienne de molécules, apparue simultanément à la vie aérobie¹ dans l'évolution des espèces (Figure 12).

¹ Se dit de micro-organismes qui ne peuvent se développer qu'en présence d'air ou d'oxygène

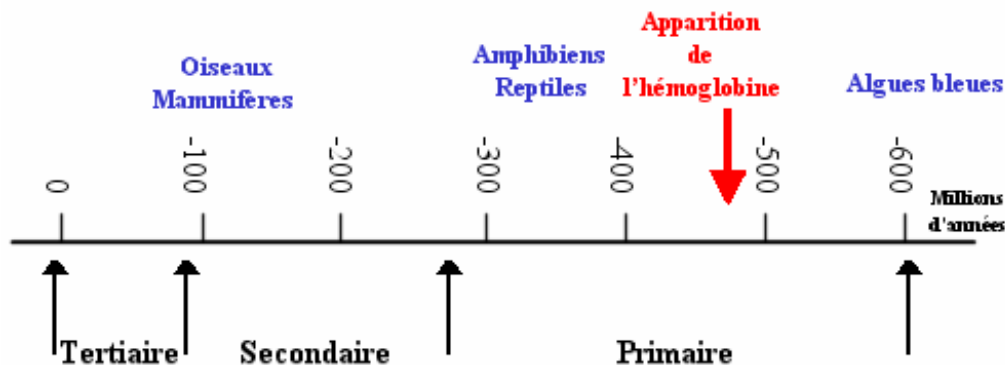


Figure 12 : Apparition de l'hémoglobine durant l'évolution de la vie

C'est ainsi qu'il y a quelques 500 millions d'années, la duplication d'un gène ancestral, déjà vieux de plus de 200 millions d'années, et codant pour une hémoprotéine transporteuse d'oxygène a donné naissance à deux molécules :

- D'une part la myoglobine, destinée au stockage de l'oxygène dans les organes, comme les muscles qui le consomment en abondance.
- Et d'autre part l'hémoglobine, spécialisée dans le transport de l'oxygène de la périphérie vers les tissus.

La vie repose sur un apport permanent d'énergie. Depuis les travaux de Lavoisier, en 1791, on sait qu'il est assuré par la combustion des aliments ou de leurs dérivés. Dans la nature, deux types de métabolismes oxydatifs générateurs d'énergie sont connus : le premier, anaérobie, s'effectue en l'absence d'oxygène et donne 2 moles d'ATP par molécule de glucose et conduit à la formation de l'acide pyruvique. Le second, aérobie, fournit 36 moles d'ATP à partir d'une même molécule de glucose et libère du CO_2 et de l'eau.

La présence d'une relativement forte pression partielle d'oxygène dans l'atmosphère terrestre a permis le développement de processus respiratoires conduisant à la dégradation oxydative complète des composés hydrogénés riches en énergie. Ceci a permis à la vie de dépasser le stade unicellulaire et de donner naissance à des espèces à besoins énergétiques élevés.

A l'intérieur de toutes les cellules d'un organisme, c'est au sein de la mitochondrie que l'oxygène est utilisé comme accepteur final d'électrons. Le transfert d'électrons s'effectue par l'intermédiaire d'une chaîne de transporteurs dont les derniers maillons sont les cytochromes A et A_3 . Seul le cytochrome A_3 est capable de céder directement l'électron à l'oxygène. Dans la mitochondrie, la $p\text{O}_2$ est comprise entre 1 et 2 mm de mercure. Pour assurer le fonctionnement correct des systèmes enzymatiques d'oxydoréduction, la nature a imaginé un ensemble de mécanismes complexes (1.5.4.2 p.29) destinés à maintenir la valeur de cette $p\text{O}_2$ mitochondriale quelles que soient les conditions d'environnement.

1.5.4.2 Évolution des mécanismes de transport d'oxygène

Par simple diffusion passive, l'oxygène peut parvenir du milieu externe aux systèmes enzymatiques capables de l'utiliser. Sa solubilité, relativement faible dans l'eau, dépend de la pO_2 atmosphérique et de la température. Dans les conditions habituelles, elle est à peine égale à 0,5 ml pour 100 ml d'eau. Sa vitesse de diffusion dans ce milieu est également très lente, un million de fois moindre que dans l'air. Un tel mécanisme de diffusion peut certainement à lui seul assurer de bonnes conditions d'oxygénation à un organisme de très petite taille, de l'ordre du millimètre, vivant au contact d'une phase aqueuse bien oxygénée, en renouvellement rapide et permanent. Des organismes de taille plus importante, présentant au milieu ambiant une large surface d'échange, peuvent également puiser l'oxygène nécessaire par diffusion passive. Ce processus est cependant bien trop lent pour permettre le développement d'organismes à besoins énergétiques élevés tels que les mammifères. Le succès des êtres pluricellulaires a, en réalité, été conditionné par l'apparition et le progrès de structures biologiques permettant d'assurer à toutes les cellules un apport d'oxygène à la fois suffisant et modulable selon la demande.

Pour transporter l'oxygène du milieu externe vers les tissus, plusieurs systèmes situés à divers niveaux ont évolué parallèlement au cours de l'émergence des espèces. Ces divers systèmes de transport sont :

- L'interface anatomique d'échange avec le milieu externe (membranes ou tubes trachéaux chez les invertébrés, branchies pour les animaux aquatique, puis poumons chez les vertébrés), adaptée au mieux aux conditions de l'environnement.
- L'appareil circulatoire interne dont la complexité va en croissant avec l'évolution ;
- Les cellules transporteuses de pigments respiratoires (cellules cœlomiques ou hématies) dont la flexibilité, le métabolisme et la charge en pigment varient d'une espèce à l'autre ;
- Les pigments respiratoires eux-mêmes

1.5.4.3 Les pigments respiratoires

Les pigments respiratoires sont des macromolécules protéiques fixant de façon réversible l'oxygène. Ils se sont développés aussi bien chez les invertébrés que chez les vertébrés et peuvent être intracellulaires ou extracellulaires. Les formes intracellulaires se trouvent essentiellement dans les cellules du milieu circulant (sang, liquide cœlomique (insecte), etc.), mais également dans certains tissus où la consommation en oxygène est importante (muscles, tissu nerveux, etc.). Pour assumer cette fonction à travers les diverses espèces animales, la nature a sélectionné trois familles de molécules structurellement très différentes : les hémocyanines, les hémérythrine et les hémoglobines (Figure 13).

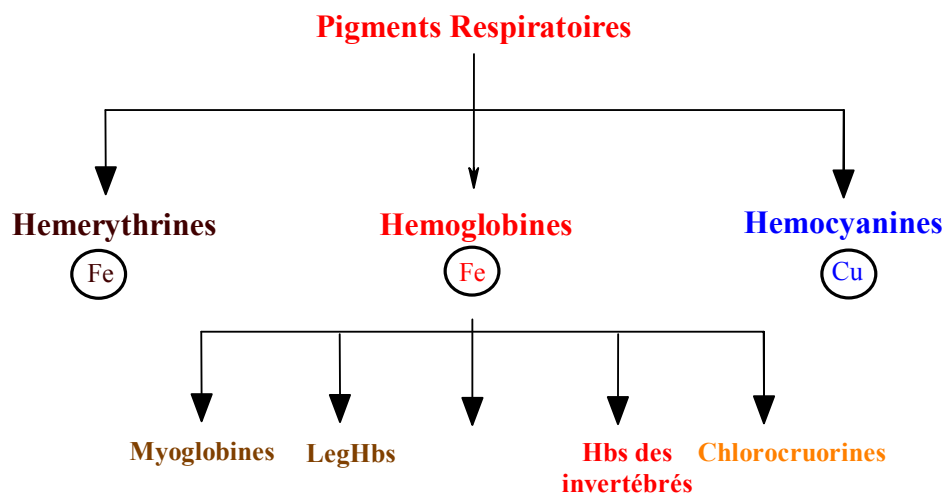


Figure 13 : Familles des pigments de la respiration

Le poids moléculaire de l'hémoglobine a été déterminé dès le début du siècle : d'après le contenu en fer (0,33 %), il ne pouvait être qu'un multiple de 16 600 daltons. La valeur de 67000 daltons, obtenue par mesure de la pression osmotique imposait une structure tétramérique. Dans les années 1956-58, les analyses de la structure protéique ont démontré qu'il s'agissait en réalité d'un hétéro-tétramère composé de deux types de chaînes polypeptidiques inéquivalentes. L'enchaînement linéaire des acides aminés a été déterminé pour les diverses chaînes polypeptidiques des hémoglobines adultes et fœtales dans les années 60.

- Les hémocyanines sont des métalloprotéines à cuivre, utilisées par certains mollusques et arthropodes. C'est en effet le pigment respiratoire des poulpes, des crustacés ou encore des scorpions.
- L'hémérythrine est une métalloprotéine à fer qui n'existe que dans quatre embranchements de vers marins.
- Les hémoglobines se rencontrent dans pratiquement toutes les autres espèces animales, et également dans le règne végétal (racines de légumineuses). Elle transporte l'oxygène nécessaire lors du cycle de la fixation de l'azote, dans le cadre d'une symbiose entre la plante et une bactérie.

1.5.4.4 L'érythrocyte ou globule rouge

Il existe une évolution phylogénique du globule rouge : volumineux et nucléé chez les poissons, les amphibiens, les reptiles et les oiseaux, il est anucléé et plus petit chez les mammifères. L'érythrocyte n'est alors plus qu'un sac rempli d'hémoglobine, hautement déformable. Chez l'homme un litre de sang contient $5 \cdot 10^{12}$ globules rouges ce qui correspond à 145g d'hémoglobine. Plasticité et capacité à se déformer sont deux propriétés essentielles à cette cellule. En effet le globule rouge doit parvenir à délivrer l'oxygène dans les capillaires les plus fins des tissus et, d'autre part, il doit être en mesure de traverser rapidement le filtre

splénique¹ où toute cellule qui traîne dans les sinusoides risque d'être capturée et détruite par les macrophages.

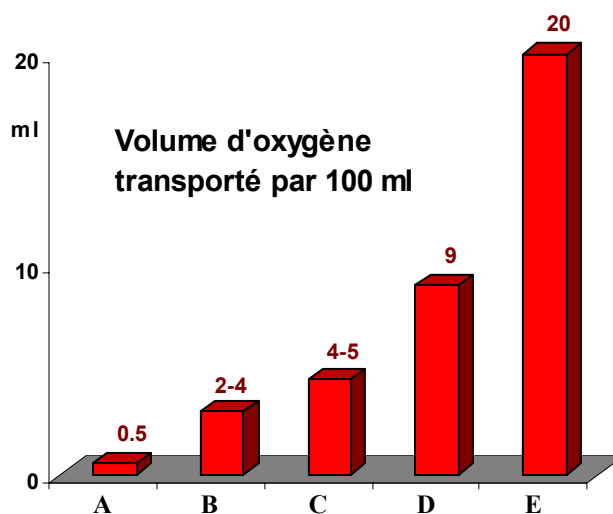


Figure 14 : Capacité de transport de différents mélanges biologiques avec **A** : plasma, **B** : fluide coelomique (hémoglobine d'insecte), **C** : hemolymph (hémocyanine), **D** : sang de reptile (Hb=9g/dl), **E** : sang humain (Hb=14g/dl).

La présence d'un pigment respiratoire modifie considérablement la capacité de transport en oxygène : alors que 100 ml de plasma peuvent transporter sous forme dissoute 0,5 ml d'oxygène, la capacité de transport de ce même volume de sang, chez un homme ayant un hématoците² de 45 % (et donc un taux d'hémoglobine de 15 g/dl) est d'environ 20 ml d'oxygène (Figure 14). Toutefois, comme nous le verrons plus loin, il faut distinguer la quantité d'oxygène transportée de celle qui peut être physiologiquement libérée. Ces différences de capacité de transport en oxygène répondent aux besoins énergétiques variables d'une espèce à l'autre. Chez les homéothermes qui maintiennent constante leur température interne, ces derniers sont dix à vingt fois plus élevés que chez les poïkilothermes où la température interne est en équilibre thermique avec le milieu externe. Au cours de l'activité maximale, les besoins peuvent être multipliés par quinze chez certains mammifères et par trente chez les oiseaux. Le globule rouge assure le transport de l'oxygène grâce à l'hémoglobine mais il assure également celui du gaz carbonique en le ramenant vers les poumons, où il va libérer le CO₂ et se recharger en O₂.

¹ Qui appartient à la rate

² Test sanguin mesurant le pourcentage de globules rouges dans l'organisme. Sa valeur normale est de 40-50% chez l'homme et 37-40% chez la femme. Une diminution de la quantité des globules rouges peut entraîner l'anémie.

1.5.5 Biosynthèse du porphobilinogène et de l'hème

Dans les tissus des mammifères, la biosynthèse de l'hème [80] se déroule en huit étapes distinctes catalysées par un enzyme. Ces étapes se déroulent dans deux parties distinctes de la cellule : la mitochondrie, où la plupart des réactions métaboliques ont lieu, et le cytosol, qui est la phase aqueuse se trouvant au sein du cytoplasme.

La première étape, appelée voie Shemin [80] de la biosynthèse de l'hème est la condensation d'un intermédiaire participant au cycle de l'acide citrique, le succinyl coenzyme A (CoA) avec l'acide aminé le plus simple, la glycine. Cette première réaction de condensation catalysée par l'enzyme *ALA synthase* amène à la formation de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) (Figure 15). Cette réaction est l'étape qui limite la production de l'hème par biosynthèse car c'est l'étape la plus contrôlée. La formation de ALA se déroule au sein de la matrice de la mitochondrie.

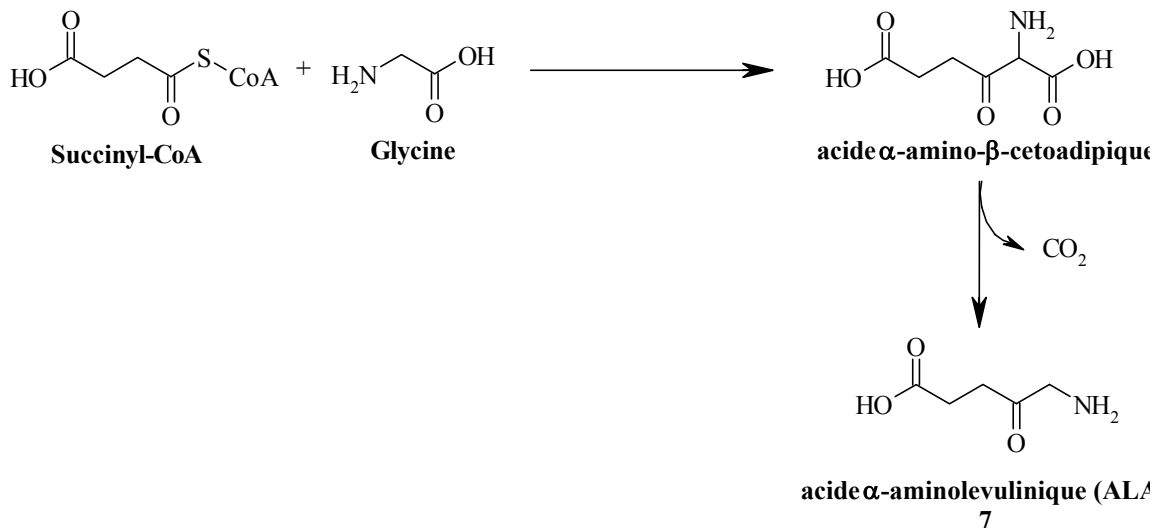
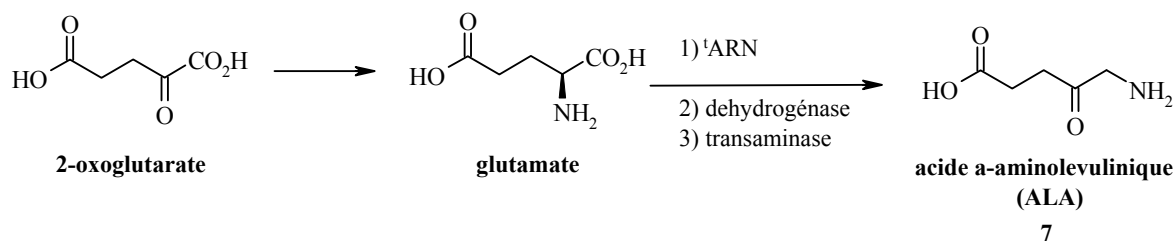


Figure 15: Biosynthèse menant à ALA selon la voie Shemin

Le premier contrôle de cette étape est exercé sur l'enzyme *ALA synthase*. Le produit de l'oxydation de Fe^{2+} de l'hème en Fe^{3+} est appelé hémine. L'hémine agit comme inhibiteur par retrocontrôle sur l'*ALA synthase*. En plus de contrôler la synthèse de cet enzyme, l'hémine inhibe aussi le transport de l'*ALA synthase* du cytosol qui est le lieu de production vers la mitochondrie qui est son lieu d'action. Toutefois, il a été mis en évidence que les plantes, les algues, ainsi que les bactéries anaérobiques fabriquent ALA par une autre voie : directement à partir d'acide glutamique [81], via le 2-oxoglutarate selon un chemin baptisé voie C₅ (Figure 16).

Figure 16: Biosynthèse menant à ALA selon le chemin C₅

Pour la seconde étape, ALA est transporté de la mitochondrie vers le cytosol, où *ALA dehydratase* (aussi appelée *porphobilinogène synthase* ou *hydroxyméthylbilane synthase*) dimérise deux molécules de ALA, afin de former le dérivé pyrrole nommé porphobilinogène (ou PBG) (Figure 17).

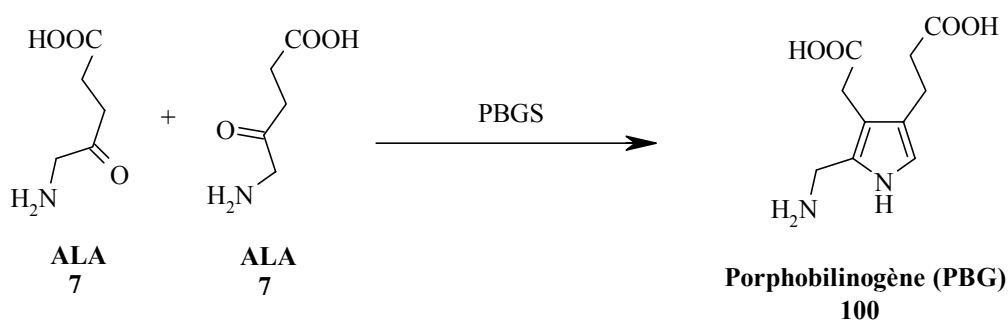


Figure 17: Formation de la porphobilinogène

L'étape suivante [80] implique une condensation de type tête-queue de quatre molécules de porphobilinogène, afin de produire l'intermédiaire linéaire tetrapyrrolique, appelé hydroxyméthylbilane. L'enzyme, qui catalyse cette réaction est le *porphobilinogène déaminase* (*PBG déaminase* ou *uroporphyrinogène I synthase*) (Figure 18).

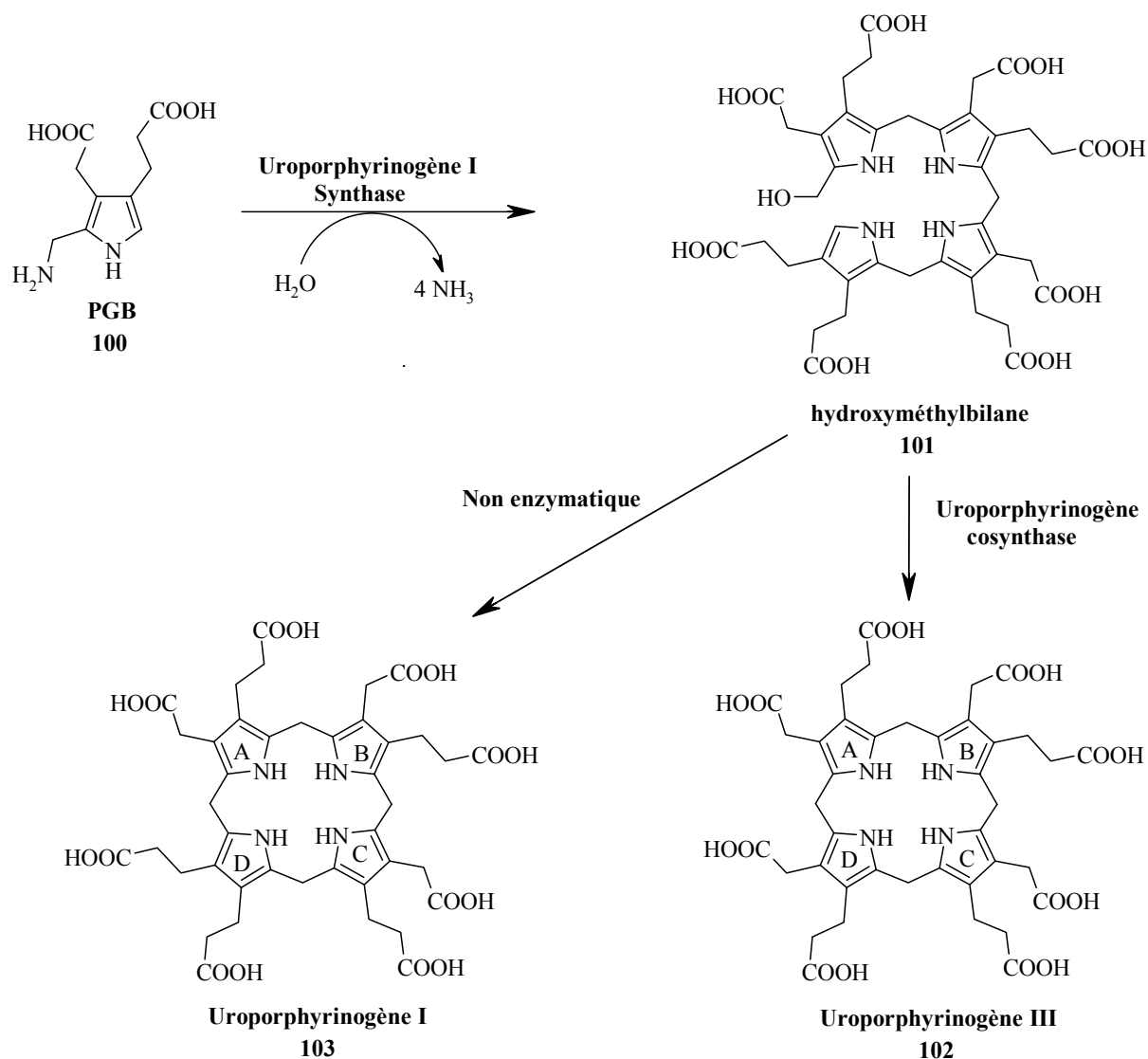


Figure 18: Cyclisation du tetrapyrrole

L'hydroxyméthylbilane peut être transformé en deux produits distincts [80]. Le plus important des deux l'uroporphyrinogène III, qui est l'intermédiaire suivant dans la biosynthèse de l'hème, est produit par une conversion enzymatique. Cette étape est menée à bien par deux enzymes, le premier étant l'*uroporphyrinogène I synthase*, et le deuxième l'*uroporphyrinogène III cosynthase*.

Les déficiences génétiques qui amènent une augmentation de l'activité d'*ALA synthase* ou une diminution de l'activité de l'*uroporphyrinogène I synthase*, provoquent une série de maladies connues sous le nom général de porphyries. Les maladies génétiques qui engendrent une déficience lors de la production des enzymes agissant après l'étape qui voit la formation de l'hydroxyméthylbilane, entraînent une accumulation de ce produit. Ce problème conduit à une cyclisation non enzymatique. Dans le cas d'une uroporphyrinogène III cosynthase est seulement présente à 30% de son niveau normal, ce qui entraîne une surproduction d'uroporphyrinogène I. Les produits d'oxydation de cette molécule étant très colorés, on les retrouve dans l'urine qui prend une couleur noire, mais ils se déposent également dans une grande variété de tissus, y compris les dents et les os qui sont alors également colorés.

Dans le cytosol, les chaînes acide acétiques de l'uroporphyrinogène (aussi bien le I que le III) sont décarboxylés par l'enzyme *uroporphyrinogène décarboxylase* [80].

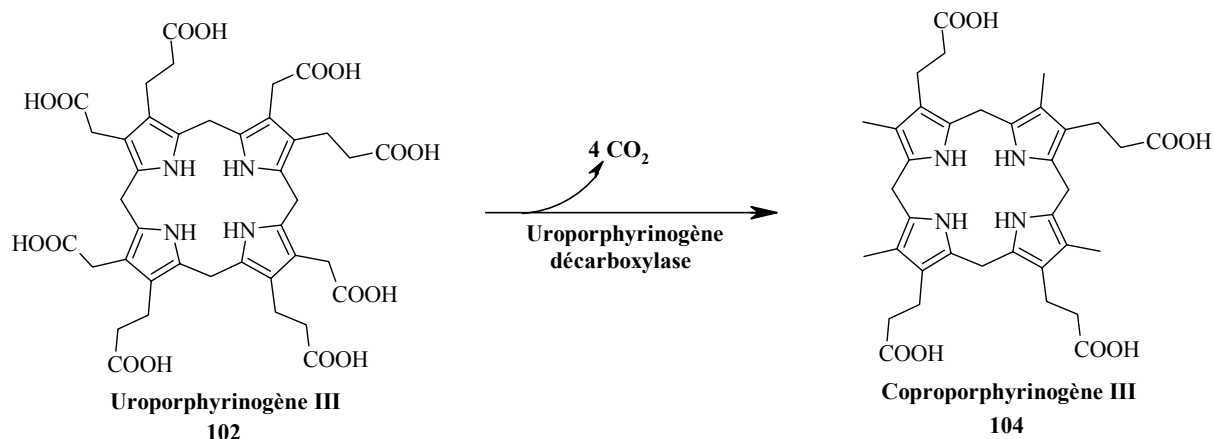


Figure 19: Formation du coproporphyrinogène III

Les chaînes acide acétiques des produits obtenus sont devenu des groupes méthyles, cette nouvelle famille de composés est appelée coproporphyrinogène. Le plus important étant le coproporphyrinogène III (Figure 19), car c'est l'intermédiaire suivant de la biosynthèse de l'hème. Le coproporphyrinogène III est transporté à l'intérieur de la mitochondrie, où deux résidus propionates sont décarboxylés par la *coproporphyrinogène III oxidase*, ce qui amène à la formation de deux substituants vinylyls sur deux des pyrroles [80].

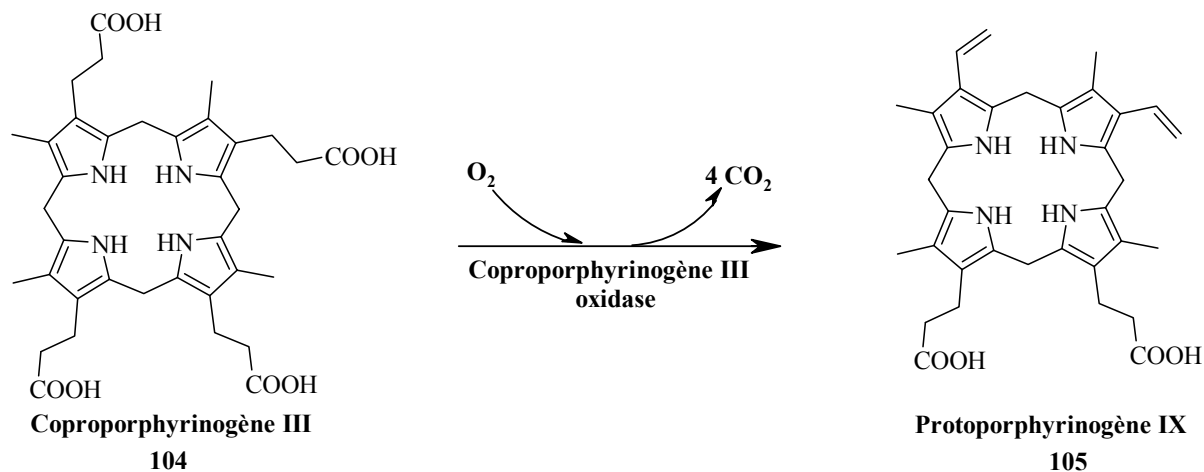


Figure 20: Formation du protoporphyrinogène IX

Le produit obtenu, la protoporphyrinogène IX (Figure 20), n'est pas coloré. Au sein des mitochondries, il est converti en protoporphyrine IX (Figure 21) par la *protoporphyrinogène oxidase* [80].

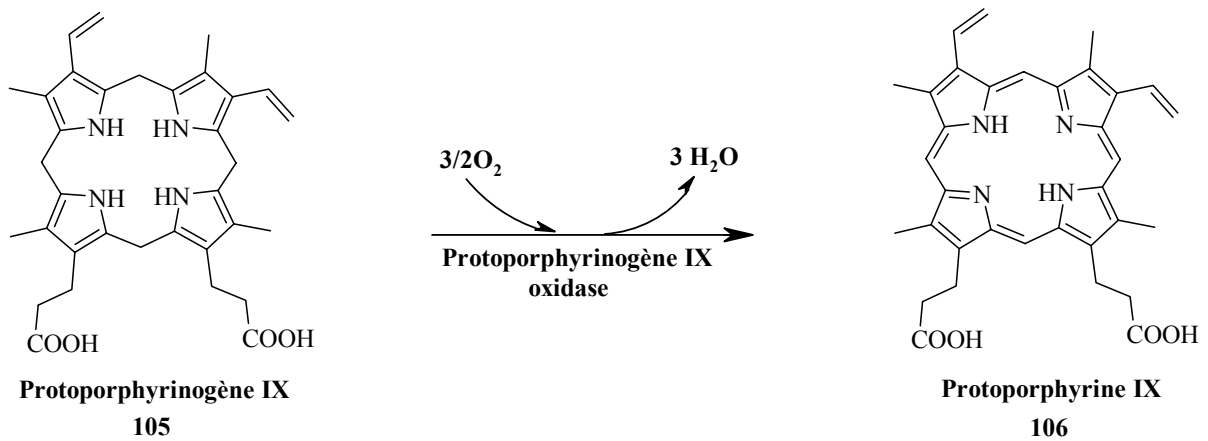


Figure 21: Formation de la protoporphyrine IX qui est la molécule utilisée en PDT

Cette réaction requiert de l'oxygène et entraîne la perte de 6 électrons et de 6 protons, amenant à la formation d'un système conjugué cyclique continu, qui est responsable de la couleur rouge caractéristique de l'hème [80].

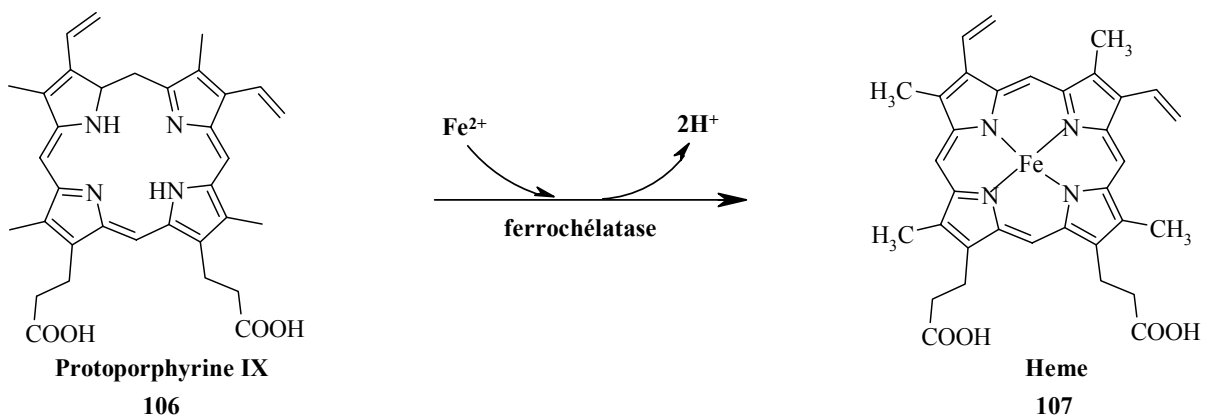


Figure 22: Complexation de l'atome de fer entraînant la formation de l'hème

La réaction finale lors de la synthèse de l'hème [82-85] a aussi lieu dans la mitochondrie et nécessite l'insertion d'un atome de fer au sein du tétrapyrrole, générant ainsi l'hème (Figure 22). L'enzyme qui catalyse cette réaction est la ferrochelatase. De toutes les enzymes intervenants dans la voie biosynthétique, *ALA synthase* possède l'activité la plus faible, donc elle contrôle la vitesse globale de la chaîne biosynthétique. Elle est suivie par la *PBG deaminase (PBGD)*. Alors que les autres enzymes ont une activité plus élevée. Un des pas de réglage les plus importants lors de la biosynthèse de l'hème, est la régulation de l'activité de *ALA synthase*. L'hème inhibe directement l'enzyme (Figure 23) [86], mais est également capable de bloquer la transcription, la translation ainsi que le transport de la protéine au sein de la mitochondrie. L'inhibition directe de l'enzyme a lieu à partir d'une concentration d'hème de 10^{-5} M, alors que le contrôle de la formation par transcription de *l'ALA synthase* a lieu à partir d'une concentration d'hème de 10^{-7} M. La ferrochelatase, *ALA synthase* et *ALA déshydratase* sont hautement sensibles aux inhibitions consécutives à un empoisonnement aux métaux lourds. Par exemple une des caractéristiques d'un empoisonnement au plomb est une augmentation de ALA dans la circulation sanguine, alors qu'aucune augmentation de la concentration de porphobilinogène n'est observée. Un des intermédiaires L'enzyme *ALA déshydratase* (ALAD) possède 28 groupements sulfures et utilise l'ion Zn^{2+} au sein de sa

structure. Pb^{2+} peut se fixer sur les sulfures (d'autant plus facilement que certains d'entre eux sont spatialement très proches), et ainsi déformer l'enzyme. Il peut également remplacer l'ion Zn^{2+} qu'utilise *ALA déshydratase*. Dans son état normal, cette enzyme s'en sert notamment comme "antioxydant". Zn^{2+} n'est pas un réducteur, mais il se fixe sur deux sulfures voisins, empêchant ainsi une oxydation en pont disulfure. Le plomb, en remplaçant Zn^{2+} , désactive complètement l'enzyme, en modifiant profondément sa structure.

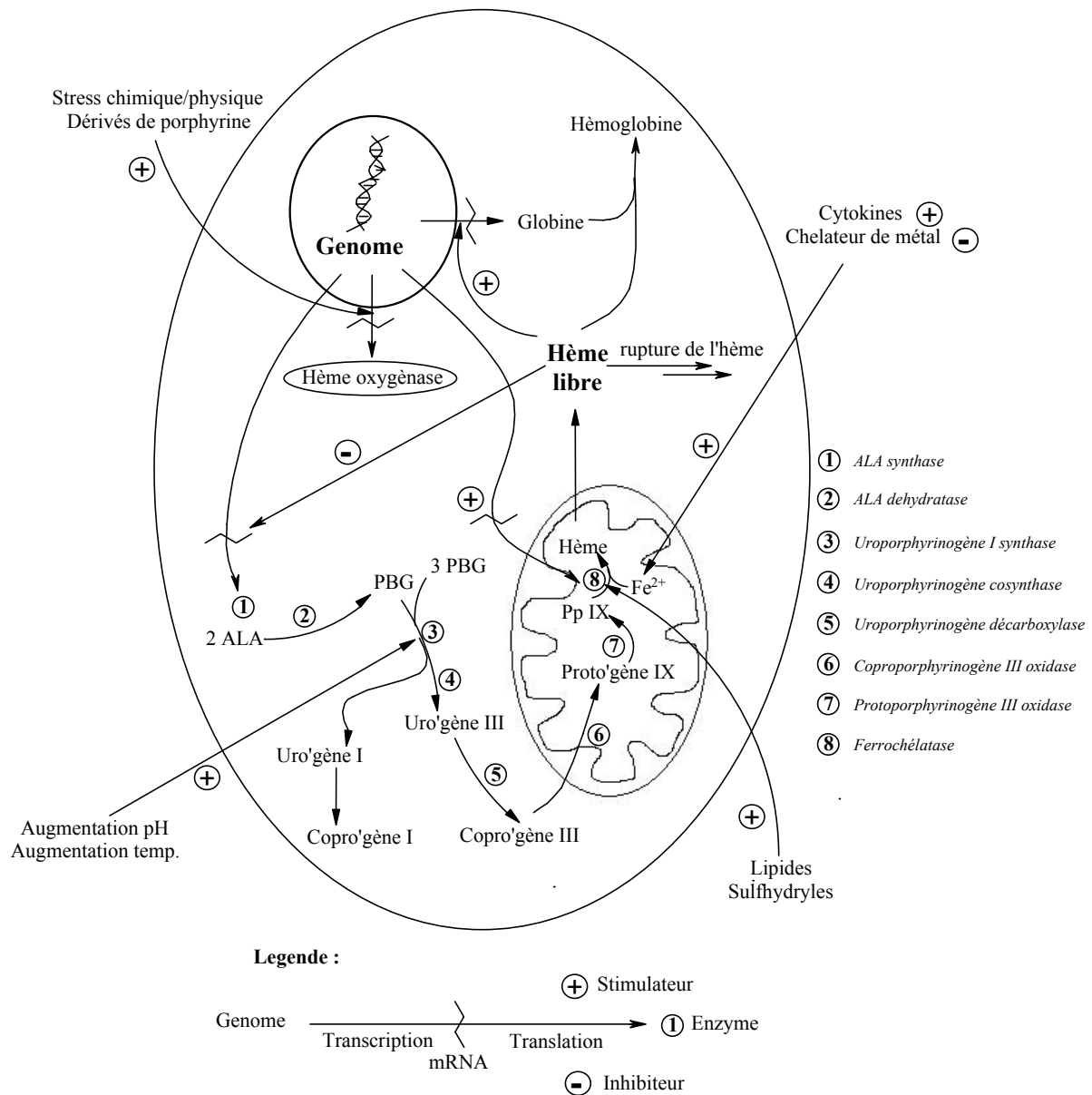


Figure 23: schéma montrant les inhibitions et les facteurs extérieurs réglant la biosynthèse de l'hème formée à partir de ALA. Certains facteurs et mécanismes (tel que cytokines et la rupture de l'hème) s'appliquent principalement à certains types de cellules. Les trois facteurs clés pour une surproduction de PpIX lors d'apport de ALA exogène sont la *PBG déaminase* qui doit augmenter (enzyme3), la *ferrochélatase* qui doit diminuer (enzyme8) et la disponibilité des atomes de fer.

1.5.6 Utilisation de ALA en PDT

C'est donc grâce aux propriétés fluorescentes [87] de la PpIX que ALA a commencé à être utilisé dans le traitement clinique de divers types de tumeurs, principalement celles affectant la vessie. Vers la fin des années 80, les premiers tests faisant intervenir ALA ont été développés. Le potentiel d'entraîner une augmentation de la production de PpIX en ajoutant ALA à des cellules a alors été mis en évidence [88].

Dans les cellules cancéreuses, la concentration élevée de l'enzyme *porphobilinogène déaminase* (PBGD), une concentration faible de la *ferrochélatase* (FC), ainsi que du fer entraîne une surproduction de PpIX lors de la biosynthèse de l'hème [41;87;89-91]. Kondo *et al* [92] ont étudié l'activité enzymatique des différents enzymes participants à la biosynthèse de l'hème. Ces études ont été effectuées sur cinq lignées de cellule épithéliale normale provenant de rats, ainsi que sur cinq lignées de cellule dérivées des ascites hepatoma de Yoshida. Ils ont déterminé que l'activité de *ALA synthase* et de la *ferrochélatase* était plus faible dans les cellules tumorales que dans les cellules normales, alors que l'activité d'*ALA déhydratase*, de la *porphobilinogène déaminase* et de l'*uroporphyrinogène decarboxylase* est plus importante [92]. C'est cette propriété qui a permis d'envisager l'utilisation de l'acide 5-aminolévulinique (ALA) [75;93] comme précurseur de photosensibilisateurs endogènes [4;94-96].

1.5.7 Sélectivité des tissus lors de traitement à l'aide de ALA

L'administration systémique d'une dose adéquate de ALA lors d'expériences animales conduit à l'obtention d'une fluorescence qui varie en fonction du type de tissus [97]. Ce qui montre que ALA s'accumule de préférence dans certains types de tissus. Dans la souris, une forte fluorescence se développe dans la peau, dans les muqueuses orales et vaginales, dans les glandes salivaires, dans la vésicule biliaire, dans l'épiderme, l'endomètre¹ et l'urothélium² de la vessie [98] et les vésicules séminales. Alors qu'elle était faible dans le derme, le myomètre³ ou les muscles de la vessie [99]. Mais aucune fluorescence n'a pu être détectée dans le squelette ou dans le muscle cardiaque [100-102]. L'application topique⁴ sur les patients atteints de cancer de la peau, d'une dose adéquate de ALA peut induire une forte fluorescence des tumeurs se situant dans l'épiderme (carcinome des cellules basales⁵ [103], carcinome des

¹ Muqueuse tapissant l'intérieur de la cavité utérine.

² Muqueuse qui tapisse l'intérieur de la vessie, des uretères et des cavités rénales

³ Tunique musculaire de l'utérus

⁴ On emploie le terme topique lorsqu'un médicament est appliqué sur ou sous la peau sous forme de solution ou d'émulsion ou lorsqu'il est utilisé pour traiter les organes creux, en les remplissant avec une solution du produit actif.

⁵ Les cellules basales caractérisent tous les épithéliums pseudostratifiés. Les cellules basales se divisent et assurent le renouvellement des autres populations cellulaires.

cellules squameuses¹, adénocarcinome des glandes sébacées²), dans les bronches (carcinome des cellules squameuses des poumons, dans les tissus mammaires, adénocarcinome du sein et dans les glandes salivaires, carcinome des cellules squameuses) [104;105].

Sur la base de ces observations, il apparaît que la PpIX induite par ALA, s'accumule principalement dans les tissus se trouvant à la surface (épiderme, conjonctif, muqueuse orale, respiratoire et rectale, endomètre, urothélium [85]) ou dans les glandes possédant des canaux qui communiquent avec leur surface (foie, glandes sébacées, mammaires et salivaires, vésicule séminale). Ce qui contraste avec la majeure partie des tissus du type mésoderme (muscles, tissu conjonctif, cartilage, moelle osseuse et sang) qui ne développent aucune fluorescence significative après un traitement avec ALA *in vivo* [106]. Les résultats obtenus en culture cellulaire peuvent être différents et l'on peut observer de la fluorescence chez des cellules qui n'en produisent pas ou peu *in vivo* [107-111].

1.5.8 Choix de la source lumineuse lors du traitement par ALA

Différentes sources lumineuses sont utilisées en traitement clinique ou expérimental par PDT. On emploie aussi bien des lasers que des sources lumineuses classiques, comme des diodes, des tubes fluorescents ou des lampes à incandescence. L'avantage de l'utilisation du laser est de permettre un bon rendement lors de l'utilisation de fibre optique. Toutefois, l'utilisation thérapeutique de ALA est, pour l'instant, réservé au traitement des surfaces des organes, tels que la vessie, la peau ou encore le système digestif. Dans ce cas, l'utilisation de sources lumineuses classiques est souvent privilégiée par rapport au laser. En effet, les sources lumineuses standard sont une source non négligeable d'infrarouge, entraînant un échauffement des tissus (40-42°C) qui agit en complément ou de façon synergique avec le traitement PDT. La Figure 24 montre le spectre d'émission d'une lampe halogène, comparé avec le spectre d'absorption de la PpIX et de ses photoproduits (photoporphyrine).

¹ Les cellules squameuses sont des cellules flexibles, qui tapissent divers organes (par ex. l'estomac). Elles assurent, dans le cas du système digestif d'une part une protection contre les attaques externes et, d'autre part un transport des aliments vers les intestins.

² Glandes sécrétant le sébum (substance grasse dont le rôle est de protéger et de lubrifier la peau).

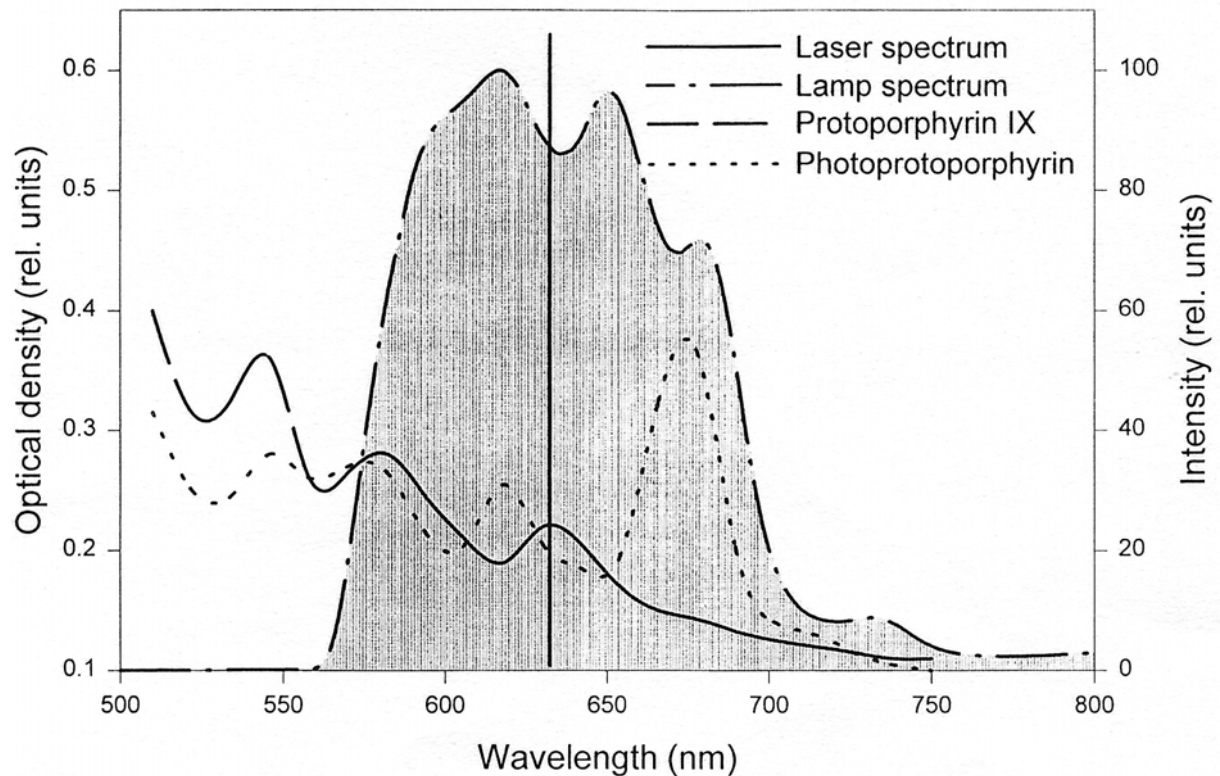


Figure 24: Absorption de la PpIX et de la photoporphyrine (produits de la porphyrine) dans une solution 10% de sérum humain dans un tampon phosphate, ainsi que le spectre d'un laser et d'une lampe halogène construite pour les traitements à base de ALA

Dans la plupart des cas, lors de l'utilisation de ALA en PDT, les zones à traiter sont exposées à une longueur d'onde de 630nm. L'utilisation de la bande de Soret (410nm dans ce cas) ne permet pas d'obtenir de bons résultats, puisque lors de l'exposition à cette longueur d'onde, les cellules se trouvant 2mm en dessous de la surface de la lésion ne sont que peu touchées par la lumière. Afin de dépasser cette limite de profondeur, il faut travailler à des longueurs d'onde plus élevées, la longueur d'onde idéale serait de 635nm (Figure 25) [112]. Idéalement, le choix de la longueur d'onde optimale devrait être fait en fonction du spectre d'absorption du produit.

Il est également important de connaître le comportement du colorant durant le traitement. En effet, le photosensibilisateur est modifié par photoblanchiment, ce phénomène est observé lors de la production de l'oxygène singulet. Ce type de réaction engendre la formation de "nouveaux" photosensibilisateurs issus du colorant utilisé. Lors d'un traitement par ALA, les produits formés par photoblanchiment ont un pic d'absorption vers 670nm, il est donc avantageux d'utiliser une source lumineuse qui recouvre tout le spectre d'action des produits formés par photoréaction.

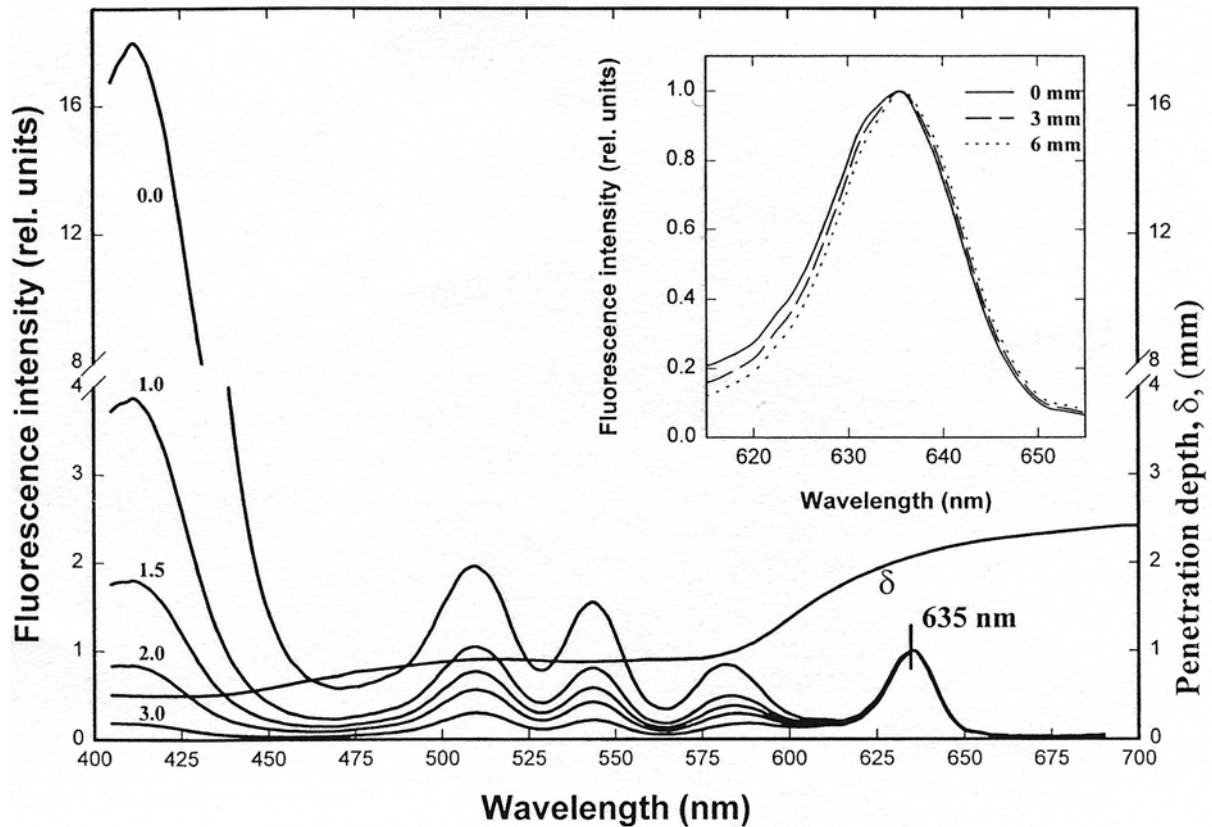


Figure 25: Profondeur de pénétration δ de la lumière au travers d'une main humaine en fonction de la longueur d'onde, ainsi que le spectre de fluorescence de PpIX ($\lambda_{em}=690nm$) à différentes profondeurs (0 à 3mm sur le graphe principale et de 0 à 6 sur l'agrandissement). Ces valeurs ont été déterminées sur des cellules in vivo par photo incidence en mesurant le spectre de fluorescence de la PpIX excitée.

1.5.9 Diffusion de ALA au sein des tissus lors d'un traitement

Un inconvénient de l'utilisation de ALA en PDT est sa faible disponibilité biologique. Si l'on veut obtenir une concentration de PpIX suffisante pour avoir un résultat clinique, il est nécessaire d'utiliser des doses importantes de ALA exogène [113-116]. Un autre problème lié à l'utilisation de ALA, c'est que le traitement est limité en surface, puisque le produit ne pénètre que peu profondément au sein des tissus [94;117;118]. Ainsi lors de traitement profond par injection intraveineuse [119-121], ALA est distribué de façon non spécifique dans tous les types de cellules, engendrant par là même une sensibilisation à la lumière généralisée. La raison de ces complications est due au fait que ALA est une molécule hydrophile. De plus, au pH physiologique, elle se trouve sous forme de Zwitterion, portant un ammonium et un carboxylate. Les composés hydrophiles traversent difficilement les barrières biologiques, telles que les membranes cellulaires, la couche cornée de la peau et les parois des intestins. Cependant, la traversée des barrières biologiques est une condition nécessaire, afin que ALA puisse être converti en PpIX et donc se trouver sous une forme thérapeutique active en PDT. Les techniques qui permettent d'améliorer ces problèmes sont développées dans la partie (1.5.16 p.48).

Lorsqu'une petite quantité d'une solution de ALA est injectée de façon subcutanée au milieu de la queue d'un rat (application topique¹), la diffusion de ALA depuis ce site est si lente que les cellules épidermiques à proximité du site d'injection sont exposées à ALA durant une longue période. La production de fluorescence induite par la PpIX est par conséquent limitée à une zone proche de l'endroit de l'injection [100]. Des expériences analogues qui ont consisté en des injections intradermiques de ALA à des volontaires humains ont amené aux mêmes observations [122]. L'application topique de ALA à des cellules basales de surface et à des carcinomes de cellules squameuses a également induit une fluorescence et une photosensibilisation localisée. L'application topique permet donc d'utiliser des quantités faibles de ALA, puisque l'on n'a pas de diffusion du produit dans tout l'organisme, cela permet également d'éviter des effets secondaires dus à une photosensibilisation non désirée d'autres tissus. L'application topique permet de réaliser un traitement sur une zone précise

Si l'administration se fait de manière systémique², des quantités importantes de ALA sont converties en PpIX dans le foie pour être excrétées via la bile. On observe également une diffusion de ALA dans tout l'organisme ce qui engendre des problèmes de photosensibilité non désirée. Les doses systémiques doivent par conséquent être bien plus importantes que les doses appliquées localement, vu les pertes occasionnées par sa diffusion dans l'organisme afin d'obtenir le même degré de photosensibilisation.

Lors de ces expériences d'application de ALA servant de modèle, aucune photosensibilisation généralisée n'a été observée, la fluorescence se cantonnant à une zone proche de l'endroit où ALA avait été appliqué. L'hypothèse que lorsque ALA est appliqué de façon topique ou systémique, ALA serait absorbé dans le système sanguin, métabolisé en PpIX dans le foie, puis relâché dans la circulation sanguine peut donc être écartée sans équivoque. Ainsi, on a démontré que la biosynthèse de la PpIX induite par ALA a lieu *in situ* dans l'épiderme normal, dans une grande variété de tumeurs malignes et bénignes de l'épiderme et d'ailleurs (vessie), dans les carcinomes des glandes mammaires et des glandes parotides³ ainsi que dans la muqueuse des bronches.

1.5.10 Comportement pharmacologique de la protoporphyrine IX induite par ALA

Des injections intrapéritonéales ou subcutanées de ALA aux souris induisent comme cela a été expliqué précédemment la formation de PpIX dans de nombreux organes et tissus. Comme l'utilisation de ALA en PDT est une méthode non invasive, cela a permis de réaliser des études détaillées pharmacocinétique de la fluorescence induite de la PpIX. Ces mesures ont

¹ On emploie le terme topique lorsqu'un médicament est appliqué sur ou sous la peau sous forme de solution ou d'émulsion ou lorsqu'il est utilisé pour traiter les organes creux, en les remplissant avec une solution du produit actif.

² On emploie le terme systémique lorsqu'un traitement est appliqué par injection intraveineuse ou par absorption orale

³ Glandes salivaires les plus volumineuses, situées derrière la branche montante de la mandibule (maxillaire inférieure), sous l'oreille. Le canal de Sténon est le canal qui permet l'évacuation des sécrétions fabriquées au niveau de cette glande.

été réalisées sur des souris auxquelles on a injecté différentes doses de ALA [101]. La PpIX est éliminée de la peau 24 heures après l'injection. Les mêmes constatations ont été faites sur l'homme, la photosensibilisation obtenue par l'application de ALA sur différents types de lésions ou par injections interdermiques disparaît après 24 heures dans de la peau normale [102]. Malgré le fait que des traces de PpIX ont été retrouvées 24 heures après l'injection dans certains organes, il est clair que la majeure partie de la PpIX est totalement éliminée du corps et cela quelque soit la méthode employée pour administrer ALA.

Il n'est toutefois pas encore définitivement clair s'il n'existe pas d'effets secondaires [123] dans l'administration systémique de ALA. Il semble pourtant que ni l'administration orale de ALA (< 60 mg/kg) ni l'injection par voie intraveineuse (< 30 mg/kg) ne conduit à des symptômes neurotoxiques irréversibles, bien que certains patients présentent des nausées passagères et/ou des troubles de fonctionnement du foie [123;124], mais actuellement les informations sur la toxicité de ALA sont encore succinctes

1.5.11 Effets de la photosensibilisation induite par la protoporphyrine IX

L'exposition à la lumière blanche de souris albinos traitées par ALA, entraîne la perte temporaire des poils, des dommages microscopiques des glandes pilo-sébacées¹, ainsi que des cellules basales de la peau. Le traitement ne produit aucune nécrose importante de la peau ni aucun autre dégât majeur. Cependant, il faut signaler que le nombre de glandes pilo-sébacées de la peau a été réduit de façon permanente après le traitement [99]. L'exposition de tumeurs traitées avec ALA à la lumière rouge, provoque des nécroses [125;126] très importantes de la tumeur. La peau recouvrant la tumeur a été également endommagée, mais celle qui se trouve dans l'environnement immédiat de la tumeur n'a subi que très peu de dégâts [102]. Les mêmes observations ont été faites sur l'homme.

Après des injections intradermiques, l'exposition de la peau à la lumière du soleil provoque une hyper pigmentation suivie d'une desquamation², mais les dommages ne sont pas trop importants. Aucune formation de cloque due aux brûlures ou de nécrose de la peau n'a été observée. Certains tissus ou organes, en présence de ALA endogène, produisent des quantités de PpIX suffisantes pour provoquer des lésions qui peuvent être décelées. Cependant ces dommages sont négligeables comparés à ceux observés sur les tissus cancéreux

1.5.12 Le photoblanchiment de la protoporphyrine IX

Comme cela a été expliqué précédemment lorsque le photosensibilisateur est excité (PpIX dans ce cas), il peut perdre l'énergie qu'il a accumulée de différentes façons (Figure 26). Le photoblanchiment de la PpIX est une photoréaction du colorant qui va transformer sa structure

¹ Glandes situées dans l'épiderme à la base du poil, à l'origine de la sécrétion du sébum qui est un corps gras (essentiellement composé de triglycérides).

² La desquamation est l'élimination des couches cornées superficielles de l'épiderme. Ce phénomène normal peut devenir excessif en cas d'agression de la peau, (Coup de soleil) ou dans certaines maladies, (Psoriasis et Mycose).

de façon irréversible. Le photosensibilisateur va donc, après réaction perdre ses propriétés de photosensibilisation. La PpIX est photoblanchie très facilement *in vivo*. Si une dose adéquate de lumière est utilisée, au terme d'un traitement, aucune fluorescence induite par la PpIX ne devrait être observée dans la zone traitée à la fin de l'exposition. Cependant, des traces de ALA, peuvent rester au sein des cellules exposées au traitement, entraînant par sa transformation en PpIX, une faible fluorescence durant les minutes ou les heures qui suivent.

La facilité avec laquelle la PpIX est photoblanchie a une conséquence clinique très importante. En effet, aucun photosensibilisateur n'étant parfaitement spécifique pour les tissus cancéreux, il y a toujours une petite quantité de PpIX dans les tissus sains qui se trouvent dans la région du traitement. La méthode appliquée actuellement lors de traitement PDT est telle qu'à la fin de l'exposition, on n'observe plus de fluorescence évitant ainsi de causer des dommages aux cellules saines. Le photoblanchiment entraîne donc une diminution de la concentration du chromophore au sein des cellules cancéreuses et au sein des cellules saines. Comme la concentration du photosensibilisateur est importante dans le cas des cellules cancéreuses, le traitement permet malgré le photoblanchiment une détection ou une destruction des cellules. Alors que dans les cellules saines ayant une faible concentration de chromophores, le photoblanchiment permet d'éviter des effets secondaires en détruisant le photosensibilisateur.

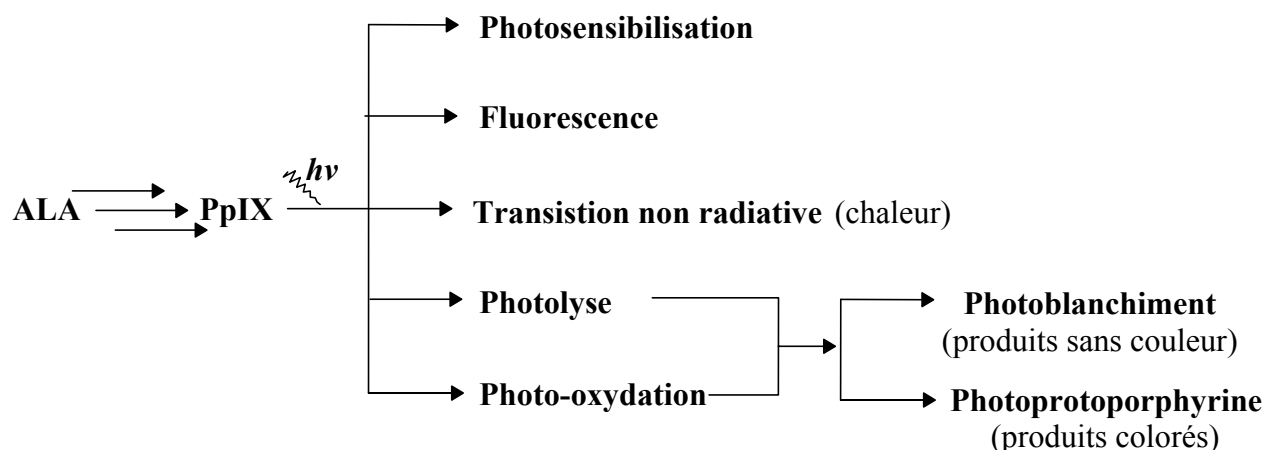


Figure 26 : Schéma représentant les différents chemins conduisant à la désactivation de la PpIX biosynthétisée à partir ALA, après sa photoactivation.

En pratique, cela signifie que dans la plupart des traitements cliniques, il est possible d'utiliser pour les tissus adjacents à la lésion une surdose de lumière. Un autre avantage possible du photoblanchiment est qu'il permet le traitement efficace de tumeurs plus profondes. En effet, le processus se déroule tout d'abord aux abords de la surface tissulaire, endroit où l'intensité lumineuse est la plus intense. Or, en retirant cette "couche absorbante" à la surface de la peau, la lumière activante pourrait ainsi pénétrer plus profondément dans le tissu et exciter la PpIX à des niveaux plus bas, sans toutefois causer des dégâts ultérieurs aux tissus superficiels [127].

Le partage des doses de lumière activante est également une stratégie à mettre en relation avec le processus de photoblanchiment. En effet, lorsque ALA est appliqué localement, la production de PpIX se poursuit jusqu'à ce que la cellule soit détruite ou jusqu'à ce que la source de ALA soit épuisée. Par conséquent, une application intermittente de lumière activante permet d'améliorer l'efficacité finale de la technique ALA-PDT. Ce type

d'expérience a été testé récemment [128] et s'est avéré concluant. Il est important de noter, à ce sujet, que le temps de régénération de l'oxygène au sein des tissus irradiés est un facteur important de régulation. Dans le cas où la peau se trouve adjacente à la zone cancéreuse se met à produire trop de PpIX, la dose de lumière est réduite et les zones adjacentes peuvent être protégées à l'aide d'aluminium. Malgré le fait que la PpIX produite à partir de ALA ne produit aucune brûlure de deuxième ou de troisième degré, il faut prendre des précautions lors de traitement des zones présentant de sévères dégâts provoqués, par l'acné, des inflammations ou des atrophies. Car dans ces conditions, certaines parties des tissus peuvent produire plus de PpIX que normal.

Lorsque la PpIX est exposée à la lumière, quelques photoproduits de type chlorine sont formés [129-133]. Lorsque des protéines sont présentes, il se peut qu'un certain nombre de photoproduits dérivés de ces molécules réagissent avec la PpIX, afin de produire d'autres photoproduits secondaires. Ces composés formés sont nommés photoporphyrines qui sont eux-mêmes de bons sensibilisateurs, mais également des molécules photolabiles [134-136]. Comme ces molécules font partie de la famille des chlorines, elles ont une forte absorption vers 690 nm [105;112;134]. C'est pourquoi la plupart des lampes fabriquées pour la PDT couvrent cette zone.

1.5.13 L'utilisation topique de ALA-PDT pour les troubles de la peau

Le traitement avec ALA est la méthode privilégiée pour les patients avec les lésions de la peau suivantes :

- les lésions dont la résection chirurgicale, engendreraient des séquelles esthétiques ou fonctionnelles (lésions au visage, nez, oreille, etc.)
- les lésions présentant plusieurs foyers
- Les lésions pour lesquelles les autres thérapies ont échoué
- les lésions ne pouvant être traités par chirurgie (p. ex. infarctus du myocarde récent)

Bien que l'on utilise déjà cette méthode en clinique, la technique de l'application topique de ALA sur la peau n'a pas encore été parfaitement optimisée. En particulier, lors du traitement de tumeurs nodulaires ou de celles qui s'infiltrent sous la peau, on assiste à une distribution inhomogène ou à un manque de sélectivité de l'accumulation de la PpIX. Il est donc indispensable de revoir le mode d'application de ALA lors du traitement de ce type de lésions afin d'obtenir de bons résultats.

L'efficacité du traitement PDT par ALA peut être amélioré par les approches suivantes :

- Certains agents peuvent aider à la pénétration de ALA en application topique à l'intérieur des lésions profondes sans pour autant réduire la sélectivité. Le choix du solvant peut être un facteur important permettant une meilleure diffusion de ALA. Quelques méthodes physiques permettent également une meilleure pénétration, tel que curetage partiel de la lésion, ultrason, irradiation avec des micros ondes, etc.

- De puissants inhibiteurs de la *ferrochelatase* et *protoporphyrinogène oxydase*, ainsi que des modulateurs du chemin biosynthétique de l'hème et des chélatants du fer [137] peuvent être utilisés afin d'augmenter la production des porphyrines dérivées de ALA [138]. Des études précliniques ont montré que des composés tels que le DMSO, 2-allyl-2-isopropylacetamide, 1,10-phenanthroline [139], et 1,2-diethyl-3-hydroxypyridin-4-one, ont le potentiel de favoriser la production de porphyrines. En complément, certains stimulateurs de cellules tels que des lectines peuvent favoriser l'accumulation sélective de la PpIX.
- La détermination de la durée de l'exposition optimale pour l'application topique de ALA, afin que sa pénétration, ainsi que la production de porphyrines soient suffisantes dans toute la lésion.
- Des injections directement au sein de la tumeur peuvent être administrées dans certains cas.
- L'administration systémique (orale/intraveineuse) pourrait conduire à une accumulation plus homogène de la PpIX.
- Le système de production de la lumière pourrait être amélioré afin d'être plus efficace et de couvrir le spectre d'absorption de la PpIX et de ses dérivés issus de photoréaction.
- Les propriétés de photoblanchiment de la PpIX peuvent être utilisées afin d'augmenter la sélectivité des effets de la PDT par ALA.
- Une application intermittente de la lumière activante pourrait augmenter l'efficacité de la PDT par ALA.
- Une meilleure compréhension de la distribution de la lumière dans les tissus et des procédures dosimétriques améliorées.

1.5.14 Comparaison entre les traitements à base de photofrin[®] et ceux à base de ALA

Les avantages et les désavantages d'une application topique de ALA et d'une utilisation systémique de HpD/photofrin[®] sont résumés dans le tableau suivant (Tableau 2).

PDT à base de HpD/photofrin [®]	PDT à base de ALA
Le patient doit rester à l'hôpital durant plusieurs jours	Le patient n'a pas besoin d'une hospitalisation prolongée
Coût élevé (on utilise un laser dans la majorité des cas)	Faible coût (ALA est meilleur marché que la photofrin [®] et une lampe standard suffit)
Sélectivité permettent d'épargner les tissus aux alentours de la lésion	Haute sélectivité permettant d'épargner les tissus aux alentours de la lésion
Risque de photosensibilisation durant 4 à 6 semaines	Aucun risque de photosensibilité au delà de 24 heures
Plus efficace que ALA pour les traitements des lésions nodulaires	Efficace pour les lésions de surface
Les résultats cosmétiques sont égaux ou supérieurs aux traitements conventionnels	Les résultats cosmétiques sont supérieurs aux traitements conventionnels

Tableau 2: Comparaison entre l'utilisation topique de ALA et l'utilisation systémique de HpD/photofrin[®] en PDT pour le traitement de cancer de la peau.

1.5.15 Stabilité de l'acide δ -aminolévulinique en solution

Lors de l'utilisation médicale de ALA ou lors des tests enzymatiques de ses dérivés, ALA se trouve en solution à des pH plus ou moins variés. Il est donc intéressant de connaître ses réactions lorsqu'il se trouve dans ces conditions [140;141]. Pendant la préparation de solutions aqueuses de ALA dans les conditions utilisées pour l'instiller dans une vessie humaine, les solutions passent de l'incolore au jaune en quelques minutes, si elles sont tamponnées à pH neutre. De plus, la couleur des solutions devient moins intense avec le temps et le pH décroît de manière significative même en présence d'un tampon phosphate. Ces changements révèlent la présence de réactions chimiques impliquant ALA et qui ne sont pas désirées. Ces produits peuvent être très gênants lors d'une utilisation clinique, car il est très difficile de déterminer leur quantité, le rôle qu'ils jouent, ainsi que leur toxicité.

Il est bien connu que lors de la biosynthèse en présence de *Porphobilinogène Synthase*, ALA dimérise pour donner la porphobilinogène (Figure 15). Lors de de réaction chimique, en l'absence des enzymes nécessaires, il y a une dimérisation spontanée de ALA qui donne le 2,5-(β -carboxyethyl) dihydropyrazine (DHPY) (Figure 27). Granick et Mauzerall [142] ont décrit la dimérisation de ALA en DHPY en solution alcaline. La condensation de deux molécules de ALA donne deux produits dans les proportions (1:10), ils ont proposé le porphobilinogène comme structure pour le produit minoritaire et la DHPY pour le produit majoritaire, composé instable et difficile à identifier.

Récemment, ces études ont été reprises avec des méthodes modernes d'analyses spectroscopiques. Butler et George [90] ont identifié trois produits de la condensation de ALA en solution aqueuse et dépendants des conditions de réaction : la DHPY, qui est formée à un pH modéré et sous des conditions anaérobiques, le 2,5-(β -carboxyethyl)pyrazine (PY) par oxydation et finalement le pseudo-Porphobilinogène qui est obtenu dans des conditions très alcalines (Figure 27), en même temps que la dihydropyrazine. Par contre, ils n'ont pas observé, dans le cadre de leurs mesures la formation de pophobilinogène dans la dimérisation non enzymatique de ALA.

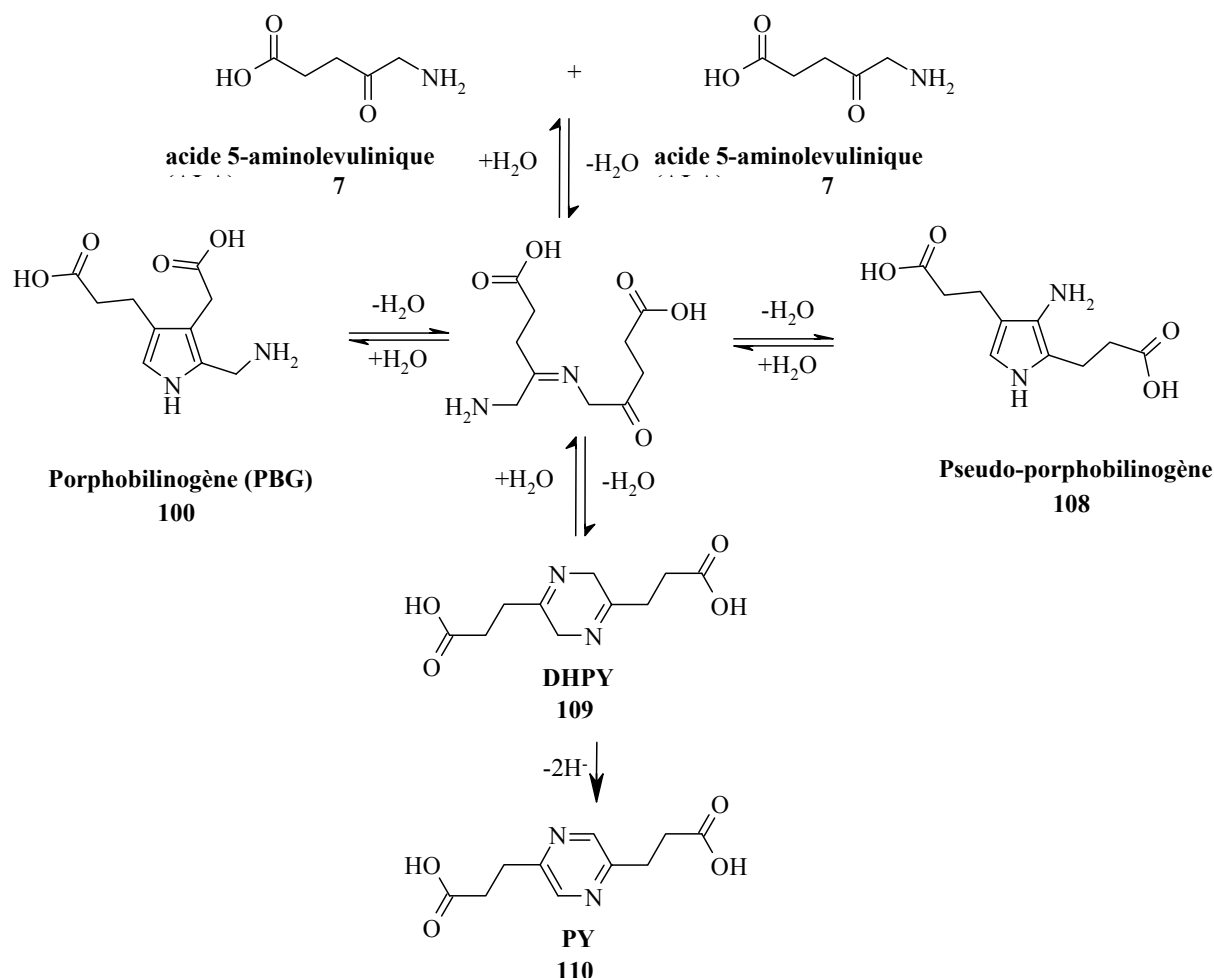


Figure 27: Cyclisation enzymatique et non enzymatique de ALA.

La solution de ALA est stable uniquement à un pH acide où la forme anionique n'existe pas (à pH 5.2 la concentration anionique est seulement de 0.07% de la concentration totale de ALA). Il est donc très important de maîtriser le pH des solutions pour éviter des réactions parasites et cela aussi bien pour des solutions cliniques que pour des solutions utilisées dans le cadre de synthèses.

1.5.16 La thérapie photodynamique avec des dérivés de ALA

L'utilisation topique de ALA est, dans un sens, restreinte par le caractère hydrophile de ALA envers les cellules néoplasiques et/ou par sa faible diffusion au travers des lésions de la peau, particulièrement dans le cas de tumeurs épaisses. Comme il l'a été expliqué précédemment, ALA rencontre des difficultés, à cause de son caractère hydrophile, pour traverser les membranes cellulaires. Afin d'obtenir une production de PpIX suffisante, il est nécessaire d'utiliser des concentrations d'ALA importante. Il est donc indispensable de remédier à ce problème : une solution est représentée par l'utilisation de "prodrugs" [143].

Une "prodrug" est un précurseur chimique d'un médicament possédant des propriétés pharmacologiques plus favorables que ce dernier. La "prodrug" est en fait lui-même pharmacologiquement parlant inactif, mais il est converti en médicament par des enzymes ou

par d'autres facteurs sur le lieu de son action. Dans le cas du développement de "prodrugs" de ALA, la voie de synthèse conduisant à la PpIX reste inchangée, exception faite d'une étape initiale supplémentaire pour la transformation du précurseur.

Les "prodrugs" peuvent être synthétisés pour différentes raisons : par exemple, pour aboutir à une meilleure stabilité du produit [144], ou afin de faciliter l'accès de la zone à traiter à la substance active. Dans le cadre d'une application en dermatologie, le but est d'obtenir un composé caractérisé par un meilleur taux de pénétration dans les tissus. Pour ALA, il est donc nécessaire de développer un composé moins hydrophile.

L'intérêt de considérer une "prodrug" [145] en lieu et place d'ALA est toutefois limité par deux facteurs : la vitesse de diffusion du composé dérivé d'ALA à travers les membranes cellulaires et la vitesse à laquelle ce même composé est converti par les enzymes en produit actif. Il est en fait très important de définir lequel de ces deux facteurs contribue le plus à obtenir une concentration élevée de PpIX dans les cellules tumorales, de manière à pouvoir prévoir le comportement chimique de nouveaux dérivés d'ALA. En effet, il existe actuellement aussi bien des "prodrugs" nécessitant une hydrolyse enzymatique rapide pour une meilleure action thérapeutique que des dérivés devant être convertis plus lentement pour favoriser la réaction.

Une série d'esters aliphatiques de ALA ont déjà été synthétisés et testés [146-148] (Figure 28). Des mesures de fluorescence *in vitro* (culture des cellules) et *in vivo* ont été effectuées afin de déterminer leur potentiel en tant qu'agent photosensibilisateur [123;145;146;149]. Les dérivés esters de ALA ont montré une meilleure affinité biologique dans les lésions cutanées due à leur caractère lipophile. Le dérivé estérifié va franchir plus facilement les membranes cellulaires, il est ensuite déestérifié au sein des cellules et des tissus par des estérases. De nombreuses études ont été menées sur les esters de ALA, les premiers esters synthétisés ont été faits avec la série des alcools aliphatique C₁-C₈. Les meilleurs résultats ont été obtenus sur des cultures de cellules *in vitro* (lignées cellulaires WiDr et VHIK de carcinome du colon humain) avec les esters à longue chaîne (C₆-C₈) [145;150].

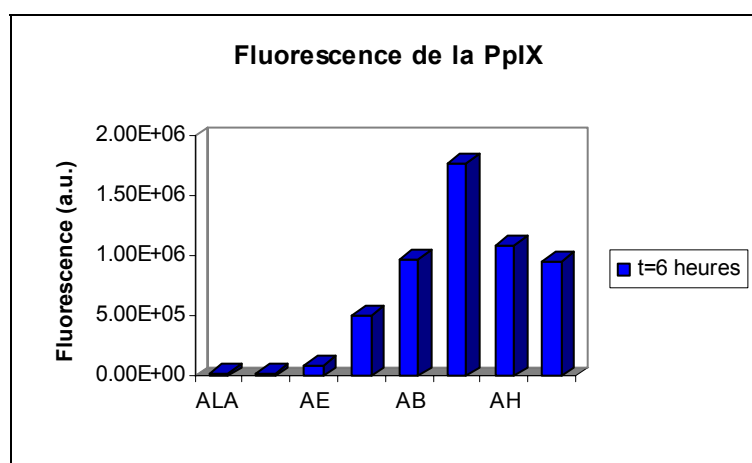


Figure 28: Mesure de la fluorescence des esters aliphatiques de ALA (C₁-C₈) après 6 heure d'incubation. Avec : AM=ALA-OMe, AE= ALA-OEt, APr= ALA-OPr, AB= ALA-OBu, APt= ALA-O(CH₂)₄Me, AH= ALA-O(CH₂)₅Me et AO= ALA-O(CH₂)₇Me.

Il a été clairement démontré que les dérivés esters avec des chaînes alkyle longues produisaient de façon plus efficace de la PpIX, alors que deux chaînes courtes (C₁-C₃)

produisent moins de fluorescence que ALA par formation de PpIX [143]. L'allongement de la chaîne aliphatique entraîne également des problèmes de solubilité lorsque l'on dépasse C₈, ce qui rend inintéressant l'utilisation d'esters plus longs, comme il est nécessaire pour envisager une utilisation thérapeutique du produit, d'avoir une bonne solubilité dans un milieu aqueux. Lors des études sur les animaux, il a été démontré que les esters de ALA avec des chaînes courtes sont déestérifiés et convertis en porphyrine dans la peau saine des souris. La fluorescence des porphyrines induite par ALA estérifié était similaire ou plus forte que celle produite par ALA (en contraste avec les résultats *in vitro*). De plus, les études préliminaires ont démontré que l'application topique du méthyle ester aboutissait à une meilleure inhibition de croissance des tumeurs (WiDr) xénogreffées *in vivo* que l'application topique de ALA. Lors des essais cliniques avec des lésions nodulaires (BCC), la fluorescence des porphyrines produites à partir de ALA avec les esters à longues et courtes chaînes a été plus importante et surtout répartie de façon plus homogène au sein de la tumeur, une augmentation de la sélectivité, a également été observée. Il est étonnant de constater que l'utilisation topique des esters de ALA engendre moins de problèmes durant et après l'exposition à la lumière, les raisons de ce phénomène ne sont pas encore complètement comprises. Puisque l'utilisation de ALA-OMe entraîne moins d'effets secondaires et que sa sélectivité est meilleure envers les cellules tumorales, cette molécule est employée préférentiellement au Norwegian Radium Hospital, il faut également signaler que l'hexylester d'ALA est également fréquemment utilisé pour le traitement des tumeurs de la vessie [149]. D'autres expériences ont également été réalisées afin de vérifier si les alcools, libérés suite à l'hydrolyse enzymatique de l'ester correspondant, avaient une influence sur la quantité de PpIX produite dans les cellules. Mais les résultats obtenus n'ont pas permis de démontrer que l'alcool relâché durant l'hydrolyse de l'ester augmentait l'efficacité du traitement en favorisant la production de PpIX. La modification de ALA par estérification, a amené de nombreuses améliorations, lors de traitements topiques par rapport à ALA. Cependant la pharmacocinétique et la toxicité des esters sont encore relativement méconnues.

Toujours dans le concept des prodrugs, une autre approche de modification de ALA a été développée. L'utilisation de système avec une structure de dendrimère [151] contenant une substance thérapeutique active est une méthode attractive, afin d'amener le médicament sur les tissus ciblés, particulièrement dans le cas de la chimiothérapie [152]. Dans le passé, la plupart des polymères étudiés pour le transport des médicaments étaient soit linéaires soit hautement ramifiés. Les avancées récentes dans le domaine des polymères permettent de nos jours de synthétiser des polymères fortement ramifiés dont la structure est parfaitement contrôlée tels que les dendrimères (Figure 29). Ce type de structure permet d'envisager de greffer sur le polymère une substance utilisée pour des traitements médicaux [153]. Le médicament peut être fixé soit sur un dendrimère déjà formé [91;154;155], dans ce cas il n'est pas facile de contrôler précisément la fixation de la substance, soit la molécule est incorporée à la structure du dendrimère durant la synthèse. La deuxième méthode présente l'avantage de permettre la réalisation d'un "prodrug" polymérique dont la structure est bien définie, la taille et la quantité de substance active fixée sur le polymère sont connues.

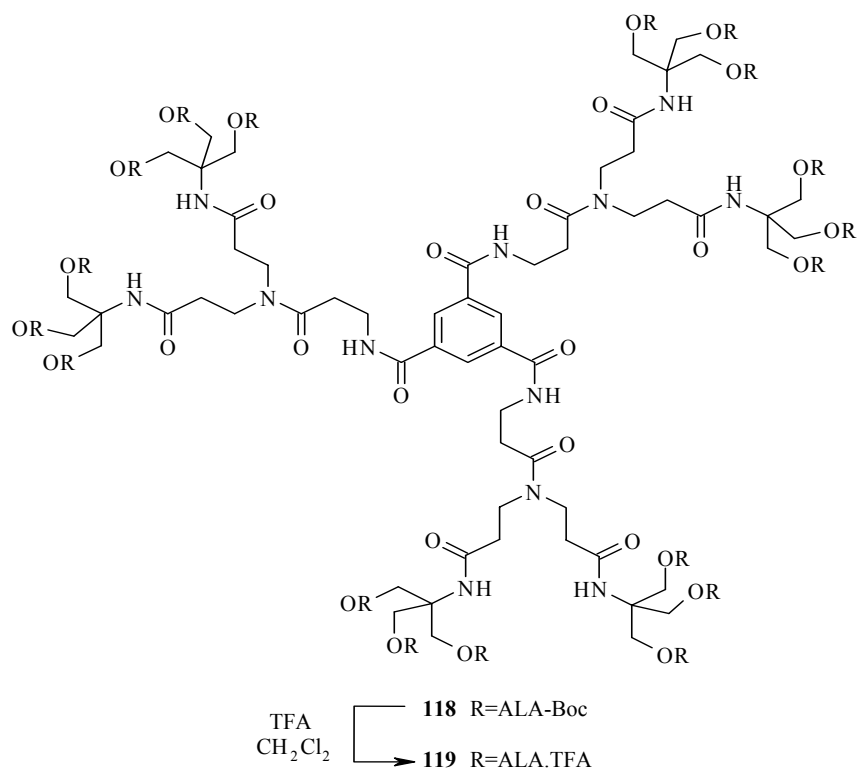


Figure 29 : Exemple de dendrimère contenant ALA

1.5.17 Perspectives d'avenir pour l'utilisation de ALA en PDT

De nombreuses indications ont été obtenues sur le métabolisme et la biodistribution de ALA [156], ainsi que sur les précurseurs porphyriques au sein de la biosynthèse de l'hème. Les études ont également démontré que les cellules à croissance rapide utilisaient ALA beaucoup plus rapidement que les autres et que l'activité de la *ferrochélatase* au sein de ces cellules est plus faible. Toutes ces observations permettent de comprendre pourquoi une accumulation de porphyrines excédentaires a lieu au sein de ce type de cellules. Par conséquent, l'utilisation de ALA en clinique, afin de détecter ou de détruire les tissus cancéreux est une approche tout à fait viable.

Les applications cliniques lors d'une utilisation topique de ALA-PDT ont donné de bons résultats indiquant par la même occasion que la méthode était tout à fait adaptée pour le traitement des tumeurs bénignes ou malignes de surface, ainsi que celles situées au sein des organes creux [157]. Les recherches futures devraient permettre de déterminer quels sont les mécanismes responsables de la résistance de certaines tumeurs face à un traitement ALA-PDT, tout cela en tenant compte du fait que de nombreux paramètres entrent en jeu.

Cependant, le challenge le plus prometteur est la modification chimique de ALA. Cette approche permet d'envisager la synthèse de prodrugs capable d'amener sélectivement ALA au cellules ciblées, avec un composé non toxique. Ainsi qu'il a été déjà mentionné, le premier problème de ALA est sa mauvaise répartition au sein des membranes cellulaires due à sa polarité. Ce problème a été contourné en diminuant la polarité de ALA par estérification à l'aide d'une série d'alcool alkyliques. Cette modification a permis d'obtenir une meilleure diffusion de ALA. Toutefois, la sélectivité envers les tumeurs cancéreuses n'a pas été

modifiée de façon probante. En effet, ALA sous sa forme estérifiée ne permet pas de cibler les cellules malades et l'efficacité de ses dérivés réside toujours sur le fait que la PpIX est surproduite au sein des tumeurs. Les modifications de ALA [158] ne devront plus seulement améliorer la diffusion (but atteint par les dérivés esters), mais également avoir une très bonne sélectivité face aux cellules cancéreuses. Les études des mécanismes intervenant dans le transport des porphyrines au travers les tissus et leur distribution parmi les tissus et les cellules ont permis de réunir un large éventail d'informations, qui sont actuellement évaluées afin d'élargir les domaines d'application de la PDT [159]. C'est ces perspectives qui permettent donc d'envisager un jour d'utiliser la PDT avec un plus grand champ d'action.

1.5.18 Les enzymes protéolytiques pouvant être ciblés avec des dérivés spécifiques de ALA (protéases)

Une des approches possibles est représentée par la préparation de prodrugs comme substrats de protéases. Il est en effet accepté que les cellules cancéreuses, et les cellules pathologiques en général présentent une tendance protéolytique altérée. Les protéases sont une classe d'enzyme capable d'hydrolyser les protéines, en réalisant des coupures au milieu d'une chaîne d'acides aminés. Les protéases interviennent dans des processus biologiques, comme la digestion (pepsine, trypsine), la maturation ou l'activation de certaines protéines (notamment la thrombine dans la cascade de la coagulation, l'activation de nombreuses hormones, le clivage de certaines protéines) et la dégradation des protéines intracellulaires. On distingue les **endoprotéases** (clivant dans la chaîne polypeptidique) des **exoprotéases** (dégradant les protéines à partir de leurs extrémités). Il existe quatre classes de protéases, classées selon leur mécanisme d'action et l'acide aminé (sérine/thréonine, aspartate, cystéine) ou l'atome métallique directement impliqué dans ce mécanisme (metalloprotéases).

1.5.18.1 Les hydroxy protéases (Ser/Thr) et les thiol protéases (CySH)

Ces protéases fonctionnent toutes deux avec un schéma général commun, dans lequel la protéine fixée se coupe en libérant sa partie C terminale, tandis que la partie N terminale acyle l'enzyme par son groupe carboxylique résultant de l'hydrolyse. Dans les deux cas, l'hydroxyl de la sérine et le thiol de la cystéine sont déprotonés, transférant leur proton à un noyau d'histidine (qui lui-même est activé par un aspartate dans le cas des protéases à sérine). La différence essentielle est dans le groupement intermédiaire acylé: sérine dans le premier cas ($X=O$) et cystéine dans le second ($X=S$). Des exemples de protéases à thiol (cystéine) sont la papaïne, les caspases et la cathepsine K. Pour les protéases à sérine, on peut citer la trypsine qui hydrolyse la liaison peptidique du côté carboxylique des résidus lysine et arginine et la chymotrypsine qui hydrolyse la liaison peptidique impliquant des résidus volumineux et hydrophobes comme le tryptophane. Dans les seules protéases connues à thréonine (sous unités du protéasome), cet acide aminé joue le même rôle que la sérine ci-dessus.

1.5.18.2 Les protéases à aspartate

Les protéases de ce type les plus étudiées sont la pepsine, la cathepsine D et la protéase qui permet la coupure de la polyprotéine du VIH (Virus de l'immunodéficience humaine). La pepsine est une protéase à aspartate. Elle coupe la liaison peptidique de nombreux peptides différents, avec peu de spécificité; avec seulement une petite préférence pour une liaison peptidique située au centre d'un tripeptide dont les extrémités sont hydrophobes. Le pepsinogène est le précurseur inactif de la pepsine. Il contient 44 acides aminés supplémentaires du côté N terminal. Les groupes importants sont deux aspartates qui jouent alternativement l'un le rôle de catalyseur acide et l'autre de catalyseur basique.

1.5.18.3 Les métalloprotéases

La majorité des métalloprotéases contiennent un atome de zinc. La plus anciennement connue des protéases à Zinc est la carboxypeptidase A. Dans l'intestin grêle des vertébrés, elle coupe de façon successive les acides aminés C terminaux des protéines. Des métalloprotéases à zinc sont impliquées dans les modifications et la dégradation intracellulaires des protéines. Il existe cinq sous-familles d'endoprotéases à Zn: astacine, serratia, matrixine, venin de serpent et thermolysine, qui, toutes sauf la dernière, contiennent trois histidines complexant un Zn. Un exemple de ce type de métalloprotéase est l'endoprotéase à Zn provenant de *S. caespitosus* (ScNP) qui coupe sélectivement la liaison peptidique du côté imine d'un acide aminé aromatique. L'atome de Zn participe à la catalyse en polarisant fortement la liaison carbonyle appartenant à la liaison peptidique coupée. Le carbone du carbonyle devient alors beaucoup plus électrophile, permettant une attaque par l'eau (assistée d'un groupe Glu) pour donner un intermédiaire instable bi-anionique qui se coupe en libérant l'acide aminé C terminal, le peptide restant se libérant ensuite.

1.6 Discussion des résultats

1.6.1 Considérations générales sur l'acide δ -aminolévulinique

1.6.1.1 Généralités sur les acides aminés

L'hydrolyse des protéines constituant la matière vivante montre qu'elles sont toutes formées d'une vingtaine d'unités structurales (ou *monomères*): les *acides aminés*, de formule générale (Figure 30) :

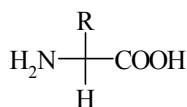


Figure 30 : Formule générale des acides aminés

Où R représente un reste propre à chaque acide aminé considéré. Le carbone, qui porte le reste R, confère des propriétés particulières à la molécule, car il préside à l'existence de deux formes désignées R et S. Les cellules utilisent essentiellement les formes L pour leurs synthèses. On parle dans ce cas là d'acides aminés essentiels et l'organisme se les procure par l'alimentation.

Les trois premières lettres de leur nom servent le plus souvent à désigner les acides aminés: par ex. Ala = *alanine*, Leu = *leucine*, Val = *valine*, Trp = *tryptophane*, Phe = *phénylalanine*. Ils sont souvent solubles dans l'eau, à l'exception de ceux dont une partie importante de la molécule est hydrophobe. Les acides aminés ont deux groupements ionisables : le carboxylate et l'ammonium. Ces produits, dont l'ionisation varie avec le pH, sont dits *amphotères*. Leur caractère hydrophile ou hydrophobe permet de les classer en trois groupes: ceux à caractère *hydrophobe*, à caractère *hydrophile et fortement hydrophile*. Les méthodes simples de caractérisation des acides aminés d'un hydrolysats protéique sont la réaction à la ninhydrine, la chromatographie sur papier ou sur colonne, ou l'électrophorèse. Ces techniques sont dues au chimiste allemand Emil Hermann Fischer (1852-1919), dont les travaux, établissant le lien entre stéréochimie, chimie organique et biologie, ont valu le prix Nobel 1902. Les acides aminés peuvent exister à l'état libre dans les cellules ou se trouver sous forme de protéines. Les protéines sont des polymères d'acides aminés unis par des liaisons dites *peptidiques* [-CO-NH-]. Un composé formé d'un petit nombre de monomères est appelé *peptide* ou *polypeptide*; lorsque le poids moléculaire dépasse 5 000, on parle de *protéines*. Bien que leur rôle principal soit de constituer les protéines, les acides aminés sont également précurseurs de glucides, de certaines hormones et parfois de lipides.

1.6.1.2 Propriétés de l'acide δ -aminolévulinique

L'acide δ -aminolévulinique (acide 5-aminolévulinique) ou ALA avec un code de trois lettres ne fait pas partie des 20 acides aminés classiques des protéines. ALA est le produit de la

première étape de la biosynthèse des tetrapyrroles, formé par condensation du succinyl CoA avec la glycine (Figure 15), catalysée par l'enzyme *ALA synthase* et par le cofacteur pyridoxyl phosphate.

Il diffère sur de nombreux points avec les acides aminés communs. Tout d'abord si l'on compare ALA avec la glycine (Gly) (Figure 31), la première différence qui peut être observée, c'est que la fonction de l'acide carboxylique et la fonction de l'amine ne se sont pas fixées sur le même carbone. En effet dans le cas de ALA quatre atomes de carbone séparent les deux fonctions. Si l'on continue la comparaison des structures, on remarque que ALA possède une fonction supplémentaire sur le carbone C₄ avec la présence d'une cétone. Cette fonction cétone amène de nombreuses complications lors des synthèses et entraîne également des problèmes de stabilité avec certains produits obtenus, comme cela sera expliqué plus tard.

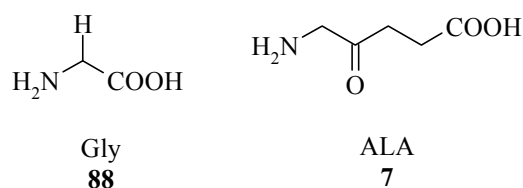


Figure 31 : Structure de Gly et ALA

Une autre différence par rapport aux autres acides aminés se situe au niveau des valeurs mesurées pour le pKa (Figure 32). En effet, on observe pour ALA un premier pKa à 4.05 et un deuxième à 8.90, alors que pour Gly, on a un premier pKa à 2.37 et un deuxième à 9.82. Dans le cas de ALA. Cette propriété peut également influencer les résultats des synthèses

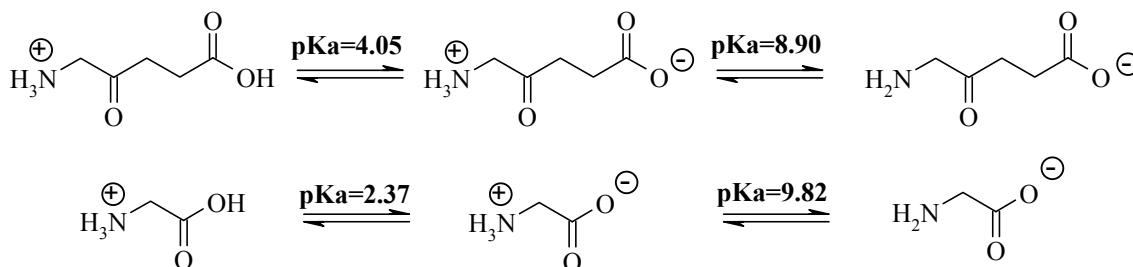


Figure 32 : Comparaison du pKa de ALA et Gly

Malgré ces différences entre ALA et les acides aminés dit communs, nous avons testé et utilisé des méthodes standard, afin de synthétiser des dérivées de ALA. Tout en tenant compte de ses spécificités et en s'adaptant en fonction des problèmes rencontrés lors des différentes réactions.

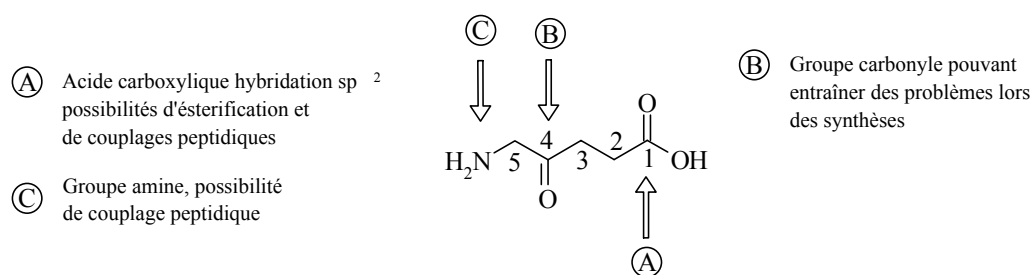


Figure 33 : Description et numérotation des groupes fonctionnels et des carbones de ALA

Lors de ce travail, nous avons aussi bien utilisé la fonction acide carboxylique **A** que l'amine **C**, afin de modifier ALA. Dans le cas de **C**, nous avons utilisé la fonction amine, afin de réaliser toute une série de dérivés peptidiques. Alors qu'à partir de l'acide carboxylique **A**, nous avons synthétisé des esters contenant ALA et nous avons également tenté de réaliser une série de dérivés peptidiques sur cette fonction, mais ce type de produit s'est révélé instable. Les numéros¹ attribués au carbone (Figure 33) ont été gardés pour l'interprétation spectroscopique.

1.6.2 Résumé des travaux précédents sur la synthèse des dérivés de ALA

1.6.2.1 Synthèse peptidique avec ALA sur la phase solide

Dans le cadre du travail de thèse réalisé par A.Greppi [160], la possibilité d'utiliser ALA en phase solide a été étudiée. Les techniques développées pour la synthèse sur phase solide sont basées sur les travaux de Merrifield [161], qui fut le premier à se servir de résines substituées en tant que support solide pour la synthèse de peptides.

La synthèse sur phase solide se prête naturellement à la construction de peptides, du fait du nombre limité de transformation nécessaire à leur synthèse, et également parce que chacune des étapes-clé a été optimisée, de manière à produire les peptides d'une longueur désirée avec un excellent rendement.

La stratégie envisagée était la suivante :

- 1) Greffage, par l'intermédiaire d'une liaison de type ester, de ALA par son C-terminal sur un linker de type Wang.
- 2) Couplages successifs, sur le N-terminal de ALA, de deux acides α -aminés différents, par une série successive de déprotection et de couplage.
- 3) Et finalement décrochage du peptide contenant ALA du linker

¹ La numérotation attribuée à ALA a également été utilisée lors de l'interprétation des spectres RMN. Nous avons gardé cette numérotation sans tenir compte de la priorité des groupes fonctionnels, afin de garder une cohésion dans la présentation des données spectroscopiques

L'avantage de la synthèse en phase solide est également de permettre l'utilisation de réactifs en excès. En effet, par simple rinçage du linker sur lequel le produit est fixé, il est possible d'éliminer les excès très facilement. De plus, l'emploi de groupe protecteur UV actif permet de suivre les différentes réactions à l'aide d'un détecteur UV.

Avant de greffer ALA sur une phase solide, il est nécessaire de protéger le *N*-terminal de ALA en solution, afin de n'avoir que le *C*-terminal qui se fixe sur le linker. Le groupe protecteur sélectionné pour la synthèse est le groupe classique Fmoc, il a été introduit par Carpino [162]. Ce groupe protecteur a l'avantage d'être UV actif et de pouvoir être éliminé sous l'effet d'une base faible (pipéridine ou diéthylamine) [163], un acide carbamoïque est généré qui, par perte de CO₂, libère l'amine libre et le dibenzofulvène qui réagit avec la pipéridine pour former un adduit UV actif.

La protection de ALA avec le groupe Fmoc pose quelques problèmes, puisque la déprotection se déroule à un pH basique et que ALA n'est pas stable dans ces conditions. Le rendement de cette étape de la synthèse est de l'ordre de 60%. Afin de tester la possibilité de fixer ALA sur la résine de type Wang, le méthylester de ALA a été synthétisé par la méthode des anhydrides mixtes. La réaction fonctionne et des rendements de l'ordre de 70% sont obtenus. L'étape suivante a consisté à charger ALA sur la phase solide selon une méthode classique [164]. Les résultats obtenus (70-80%) sont inférieurs à ceux obtenus avec des acides aminés classiques (90%), mais l'étape suivante qui consiste en la construction d'une séquence peptidique basée sur ALA, peut être envisagée.

Cette approche aurait dû permettre d'obtenir à court terme toute une librairie de composés, après optimisation des paramètres de réactions. Malheureusement ALA a posé de nombreux problèmes lors de son utilisation en phase solide. Lors de la formation de ces dérivés peptidiques de nombreux problèmes sont apparus [165] : tout d'abord, lors de la synthèse du dérivé Val-Ala-ALA, moins de 20% du mélange obtenu était composé du produit désiré, le produit majoritaire étant le dipeptide Val-Ala (80%). La synthèse sur phase solide d'une séquence basée sur ALA pose par conséquent des problèmes qui n'apparaissent pas avec les acides aminés communs. Le couplage de ALA sur un acide aminé déjà lié à la résine ne donne pas de meilleurs résultats. Une des explications à ces problèmes pourrait être due au fait que ALA dimérise en présence d'une base, afin de former la pyrazine correspondante. Cette réaction pourrait par conséquent avoir lieu sur la résine, dégradant ainsi ALA. Afin de mieux comprendre le phénomène toutes ces réactions ont été reproduites avec l'acide 5-aminovalérique (AVA). Tous les problèmes rencontrés avec ALA se reproduisent avec AVA, de ce fait l'hypothèse de la dimérisation ne semble pas être le problème principal lors de cette réaction. L'explication avancée est qu'en présence de pipéridine AVA et ALA sont dégradés par ammonolyse (Figure 34) du linker de type ester, ce qui entraîne la cyclisation de AVA en valérolactame. Ce dernier n'étant plus fixé au linker est éliminé par les lavages successifs et la résine se retrouve sans produit fixé comme au départ de la réaction, d'où l'explication de la formation majoritaire des dipeptides.

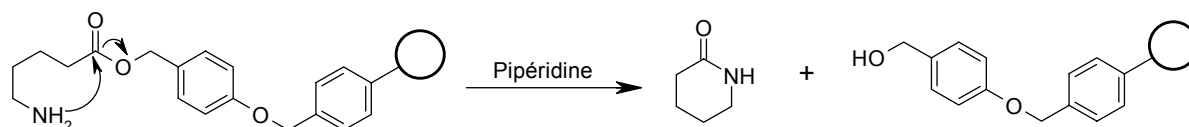


Figure 34 : Explication de la formation éventuelle du valérolactame par ammonolyse du linker de Wang

Tous ces problèmes mettent en évidence que malgré le fait que ALA soit un acide aminé, son utilisation lors de synthèse est plus délicate que prévue. Et cela même en employant des conditions qui fonctionnent relativement bien avec des acides aminés standards. Il faut donc se montrer prudent lors de son utilisation lorsque sa réactivité envers les autres produits n'est pas connue. La première précaution à employer avec ALA est d'éviter son exposition à des conditions basiques, car dans ce cas le groupe amine et la cétone peuvent participer à des réactions intra ou intermoléculaires (1.5.15 p.47).

1.6.2.2 Etudes des paramètres influençant la production de PpIX à partir des esters de ALA

Lors de son travail de diplôme P.Uehlinger [166;167] a déterminé les concentrations optimales de différents esters permettant d'obtenir la meilleure fluorescence en vu de leur utilisation en PDT. Ces mesures ont été réalisées sur des cultures cellulaires (J82 et T24 issues de carcinome humain de la vessie et A549 issues issu de carcinome humain du colon) selon les mêmes méthodes avec lesquelles, nous avons fait nos mesures de fluorescence lors de ce travail. Les esters de ALA considérés ont été : le méthyl- **8**, l'éthyl- **69**, le butyl- **89**, l'hexyl- **9**, le cyclohexyl-, **10** et l'octyl- **90** de ALA. Les concentrations donnant la meilleure fluorescence sont regroupés dans le Tableau 3.

Composé	Conc. optimale [mM]
ALA 7	10-12
ALA-OMe 8	15-25
ALA-OEt 69	15-30
ALA-OBu 89	2-5
ALA-O(CH ₂) ₅ Me 9	0.2-1.5
ALA-O(CH ₂) ₆ 10	4-6
ALA-O(CH ₂) ₇ Me 9	0.2-0.4

Tableau 3 : Concentration optimale pour chaque composé

Les esters à longue chaîne semblent être plus efficaces en tant que précurseur de PpIX dans les cellules en culture et cela indépendamment de la lignée cellulaire considérée. Toutefois, il est délicat de faire des corrélations entre les résultats obtenus *in vitro* pour les concentration optimum et l'expérimentation *in vivo*. Les observations expérimentales ne sont pas toujours reproductibles, notamment pour le contraste marqué *in vitro* entre l'accumulation de PpIX par les cellules tumorales et l'accumulation par les cellules saines immortalisées, permettant une différenciation très nette par observation de la fluorescence. De plus les concentrations administrées varient entre le milieu *in vitro* et *in vivo*. Ainsi *in vivo* pour l'hexylester **9**, les concentrations sont de l'ordre de 8 mM, alors que les concentrations optimales observées *in vitro* varient entre 0.2 mM et 1.5 mM (selon la lignée cellulaire).

1.6.3 Application des dérivés esters de ALA en PDT

L'estérification de ALA par différents alcools (p. ex. hexanol) a permis de traiter des couches cellulaires plus profondes, ainsi que d'améliorer la pénétration médiocre de ALA à travers les membranes cellulaires et dans l'espace interstitiel des tissus [168-170]. Les premiers esters de ALA étaient basés sur des alcools alkyliques. Lors de test *in vitro* et *in vivo* (cancer de la vessie), ces produits ont montré que l'augmentation de la longueur de la chaîne de l'ester induisait une meilleure pénétration de la dose de ALA appliquée [146;150]. La limitation principale de cette approche est que lorsque la chaîne alkyle devient trop longue (C₈), une diminution de la solubilité dans l'eau est observée, ce qui pose des problèmes en vue d'une utilisation thérapeutique du produit.

Un autre problème est survenu lors des tests *in vivo* sur les rats. Les hexyl esters se sont révélés extrêmement toxiques lors des injections intraveineuses. Dans la majorité des cas l'animal mourrait en moins d'une minute. L'origine de cette toxicité n'a pas été déterminée.

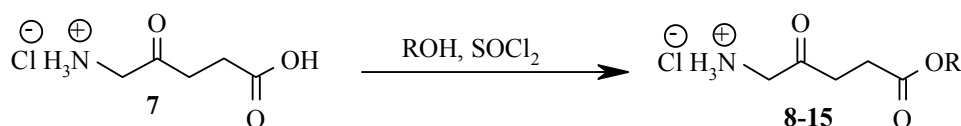
Afin de tenter de remédier à ces inconvénients, une nouvelle série d'esters a été mise au point, l'idée était de trouver une série d'alcools ayant une toxicité le plus faible possible et ayant une bonne solubilité dans l'eau indépendamment de la longueur de la chaîne, tout en étant lipophile. Les alcools à base d'éthylène glycol sont des candidats idéaux puisqu'ils remplissent ces critères, en effet ils sont en même temps hydro- et liposoluble. La première série de dérivés, qui ont été examinés pour leur capacité de produire de la PpIX, était donc des esters de l'acide 5-aminolevulinique dérivés de l'éthylène glycol. La synthèse de ces composés s'est révélée plus délicate que prévu et il a fallu modifier les conditions de la réaction, afin de les obtenir. Cela a également permis d'optimiser les autres estérifications.

1.6.3.1 Synthèse des esters de ALA

Les alcools **8-15** qui servent en même temps de solvants et de réactifs sont refroidis à 0 °C, le SOCl₂ est ensuite ajouté. A ce mélange est additionné ALA, qui en présence du chlorure de thionyl va former *in situ* le chlorure d'acide. Le chlorure d'acide attaque l'alcool, ce qui entraîne la formation de l'ester désiré. L'excès d'alcool utilisé durant la réaction est éliminé en passant le produit sur une colonne. Cette purification fonctionne très bien avec les alkyl esters, mais pose problème avec les dérivés éthylène glycol. En effet, la différence de polarité entre l'alcool et l'ester n'est plus aussi marquée. En utilisant un gradient de solvant (3 à 20 % de MeOH dans CH₂Cl₂ ou 10 à 50 % d'isopropanol dans CH₂Cl₂), il est possible d'isoler les dérivés éthylène glycol, ainsi que les autres esters, en évitant l'utilisation du méthanol pur comme solvant.

Dans le cas des esters d'éthylène glycol un autre problème est apparu. En effet lors de l'élimination du mélange utilisé pour la chromatographie (dichlorométhane/méthanol), une transestérification partielle du produit a eu lieu. Les produits observés après évaporation du mélange était le méthyle ester, l'ester à base d'éthylène glycol, ainsi que ALA non estérifié. Afin d'éviter cette réaction parasite, le méthanol a été remplacé par l'isopropanol. Malheureusement, il a fallu utiliser des quantités importantes d'isopropanol, afin d'extraire le produit de la phase immobile (silice). Une autre alternative pourrait consister à évaporer du solvant à base température, ce qui peut s'avérer peu pratique si les quantités sont trop importantes.

Lorsque le résidu pâteux le permet, il est dissout dans un volume minimum de méthanol, puis sa précipitation est provoquée par l'addition d'éther jusqu'à l'obtention d'une solution trouble. Les rendements obtenus sont récapitulés dans le Tableau 4. Les composés ont été ensuite entièrement caractérisés par spectroscopie



Composé				
8	-Me	15 heures	70°C	90 %
9	-n(CH ₂) ₅ Me	4 heures	70°C	85 %
10	-c(CH ₂) ₆	30 heures	70°C	77 %
11	-CH ₂ C ₆ H ₅	4 heures	70°C	84 %
12	-((CH ₂) ₂ O)Me	4 heures	50°C	75 %
13	-((CH ₂) ₂ O)Et	4 heures	50°C	71 %
14	-((CH ₂) ₂ O) ₂ Et	4 heures	50°C	76 %
15	-((CH ₂) ₂ O) ₃ Et	4 heures	50°C	87 %

Tableau 4 : Récapitulation des rendements des différentes estérifications

1.6.3.2 Etudes de l'hydrolyse d'esters de ALA

Pendant mon travail de diplôme effectué sous la direction de A.Greppi [171], la synthèse de différents esters de ALA a été réalisée pour la première fois. Leur vitesses relatives d'hydrolyse ont été étudiées par deux enzymes reconnus pour leur efficacité et leur disponibilité en tant qu'estérase : l'*α*-chymotrypsine et l'estérase de foie de porc (PLE). Les synthèses de ces esters ont été optimisées ou dans certains cas modifiées.

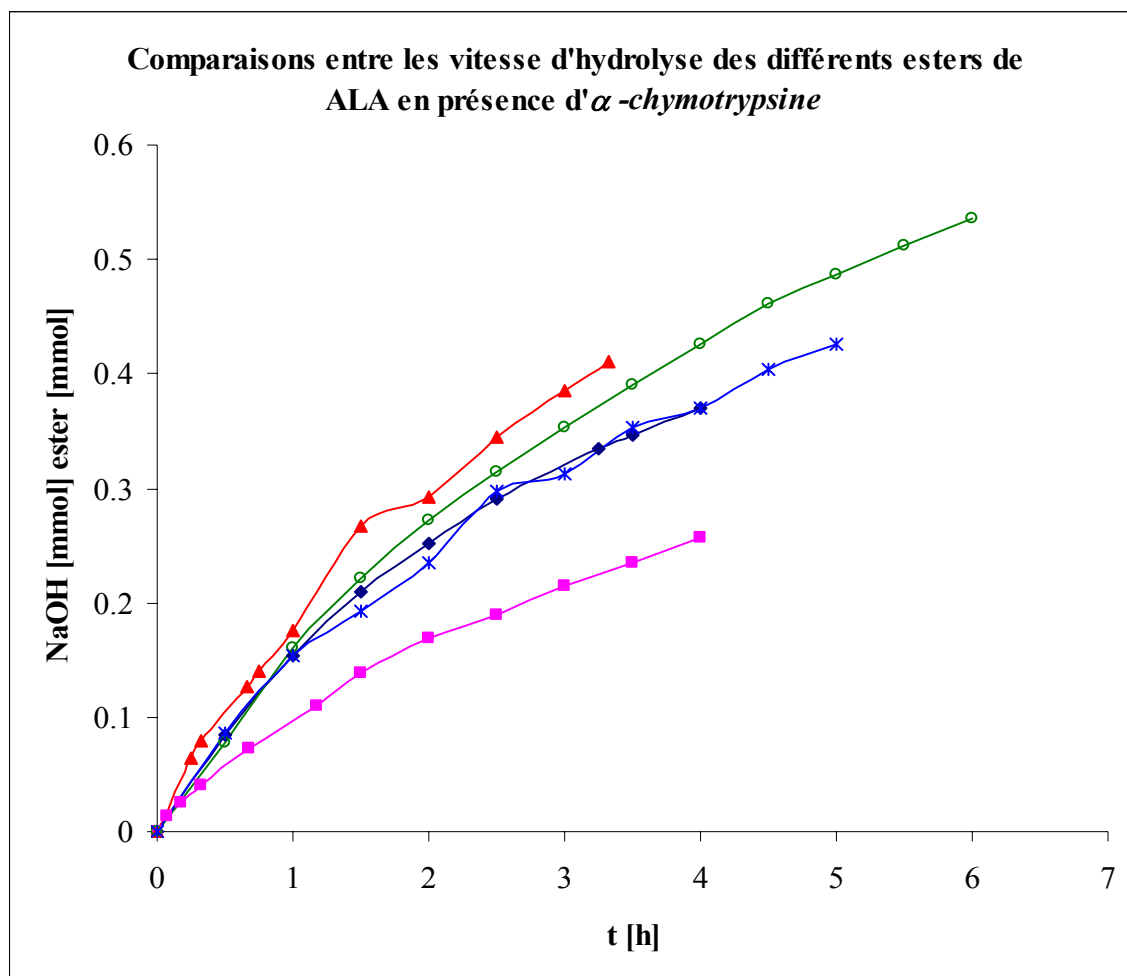
Le but de ces mesures a été de tester si il y avait une corrélation entre la facilité avec laquelle le substrat était hydrolysé par les deux types d'enzymes et la fluorescence induite par la formation de la PpIX sur des cultures cellulaires. Il s'est avéré difficile d'obtenir cette corrélation, car la vitesse d'hydrolyse n'est pas le seul paramètre déterminant la production de PpIX dans les cellules. L'internalisation du dérivé par les cellules est par exemple une des clés de l'efficacité du produit. En déterminant le coefficient de partage dans un mélange biphasique octanol/eau, la lipophilicité d'un certain nombre de dérivés a été déterminée. Ce coefficient de partage a été corrélé avec l'efficacité de ces produits [166].

Dans le cas de l'*α*-chymotrypsine, la vitesse d'hydrolyse de l'ester étudié est suivie par titration de l'acide δ-aminolévulinique correspondant libéré à l'aide de NaOH. Ces mesures sont effectuées en utilisant un appareillage pH-stat, selon le mode opératoire suivant :

L'ester correspondant est dissout dans 1 ml d'éthanol, puis sont ajoutés : 20 ml d'eau bidistillée, 5 ml de Tris Buffer (tris-(hydroxyméthyl)-aminométhane) 0.05 M, ainsi que 2.2 ml de la solution de CaCl₂ 5 %. Le pH est ajusté à 8.0 et la solution est complétée à 50 ml

avec de l'eau bidistillée dégazée. Pour les mesures 10 ml de la solution sont thermostatisés à 25 °C sous agitation magnétique. L' α -chymotrypsine dissoute dans une solution d'HCl 0.001 M est ajoutés (début de la mesure). Le *N*-acetyl-*L*-tyrosine ainsi libéré est titré à l'aide de NaOH 0.01N à pH constant (8.0).

La première série obtenue avec l' α -chymotrypsine (graphique 1 et Tableau 5) n'a pas donné de résultats qui diffèrent réellement entre les différents substrats, on note juste que l'ester à base de cyclohexanol **10** est le produit dont la vitesse d'hydrolyse est la plus faible. La vitesse d'hydrolyse avec le substrat de référence le *butyrate d'éthyle* a également été déterminée à titre de comparaison.



Graphique 1 : représentation de la quantité de NaOH utilisée par mol d'ester respectif en fonction du temps t. Afin de pouvoir comparer les résultats, le nombre de moles de NaOH a été divisé par le nombre de moles d'ester respectif utilisé pour les mesures. ◇ ALA-O(CH₂)₅Me **9**; □ ALA-O(CH₂)₆ **10**; △ ALA-O(CH₂)₂OMe **12**; ○ ALA-O(CH₂)₂OEt **13**; * ALA-O((CH₂)₂O)₂Me **14**.

Composé	Vitesse d'hydrolyse [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
<i>butyrate d'éthyle</i>	17.10
ALA-O(CH ₂) ₅ Me 9	0.21
ALA-O(CH ₂) ₆ 10	0.14
ALA-O(CH ₂) ₂ OMe 12	0.27
ALA-O(CH ₂) ₂ OEt 13	0.23
ALA-O((CH ₂) ₂ O) ₂ Me 14	0.20

Tableau 5 : Mesure d'hydrolyse des esters par l' α -chymotrypsine

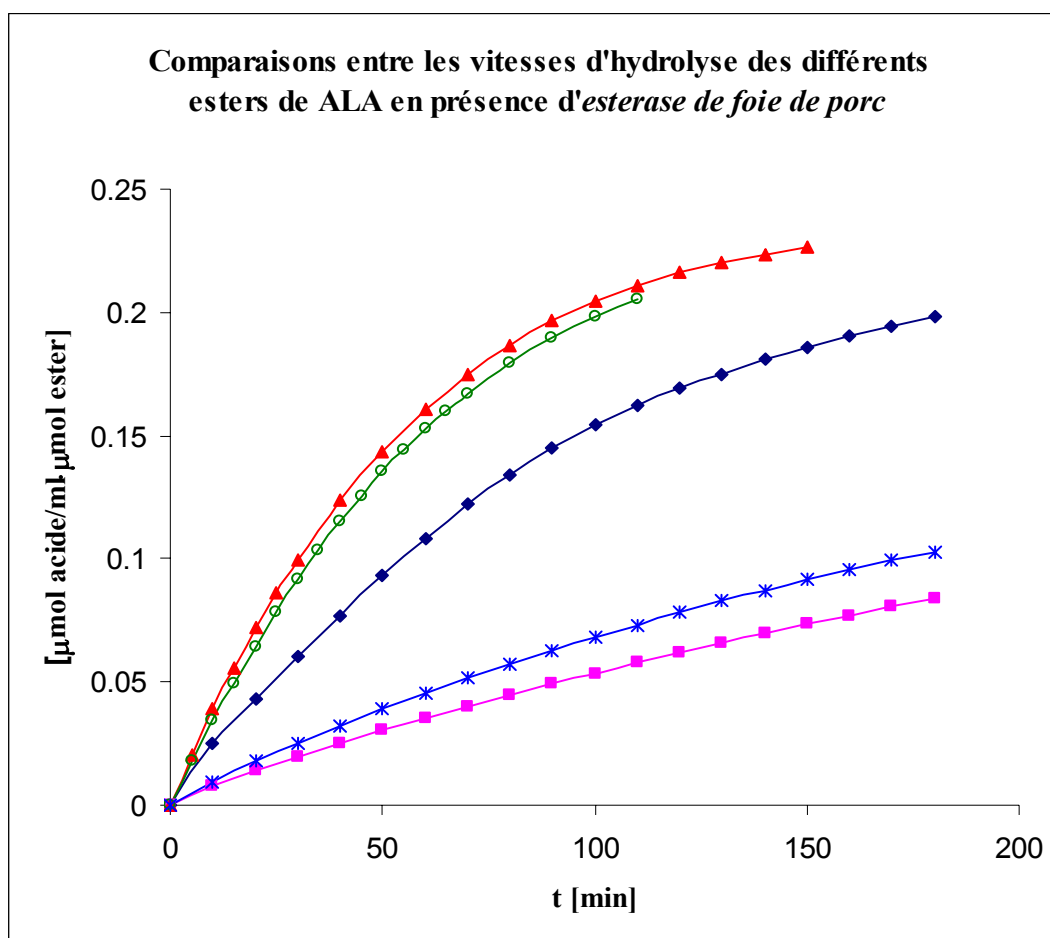
La deuxième série de mesure a été effectuée avec l'*estérase de foie de porc*. Dans ce cas, des différences de vitesse plus marquées ont été observées. Les mesures sont réalisées à l'aide d'un spectrophotomètre. 6.5 ml de solution de 6 mg de rouge de crésol (Indicateur pH : 0.2-1.8 / pH : 7.0-8.8) sont dissous dans 100 ml d'eau bidistillée dégazée (solution jaune). 3 ml de tampon borate 0.1M sont ajoutés à la solution, puis 0.03 ml de butyrate d'éthyle (dans le cas de la mesure de référence) et finalement 10 ml d'eau bidistillée dégazée. Le pH est ajusté à 8.0 à l'aide de HCl 0.1 N, puis la solution est complétée avec 30 ml avec de l'eau bidistillée dégazée.

La suspension enzymatique de PLE (10mg/ml) est diluée avec de la solution tampon (B) refroidie sur de la glace dans les proportions 1 : 10 et cela immédiatement avant la mesure. Les mesures spectrophotométriques sont réalisées en mélangeant 1.5 ml de solution contenant l'indicateur avec 0.01 ml de solution enzymatique ce qui donne un volume final de 1.51 ml. (Longueur d'onde, lampe Hg λ : 578 nm; épaisseur de la cuve : 1 cm; température : 25 °C).

Composé	Vitesse d'hydrolyse [$\mu\text{mol}/\text{min}$]
<i>N</i> -acétyl- <i>L</i> -tyrosine éthylester	1.010
ALA-O(CH ₂) ₅ Me 9	0.036
ALA-O(CH ₂) ₆ 10	0.009
ALA-O(CH ₂) ₂ OMe 12	0.063
ALA-O(CH ₂) ₂ OEt 13	0.053
ALA-O((CH ₂) ₂ O) ₂ Me 14	0.014

Tableau 6 : Mesure d'hydrolyse des esters par l'*estérase de foie de porc*

L'ester qui s'hydrolyse le plus rapidement (graphique1 et Tableau 6) est celui à base d'éthylène glycol monométhyle éther **12** et celui dont l'hydrolyse est la plus lente est formé avec le cyclohexanol **10**. La vitesse d'hydrolyse avec le substrat de référence le *N*-acétyl-*L*-tyrosine éthylester a également été déterminée à titre de comparaison. Afin de comparer les différents résultats, les courbes d'hydrolyses respectives ont été regroupées sur un même graphique et un rapport entre le nombre de mole d'acide formé et le nombre de mole d'ester de départ a été réalisé.



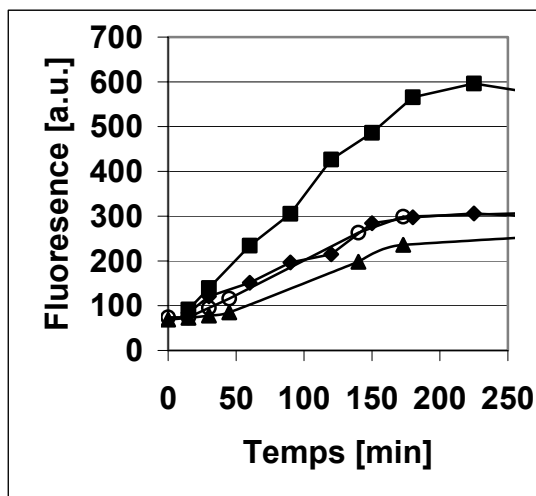
Graphique 2 : Comparaisons de la concentration d'acide libéré en tenant compte de la quantité initiale d'ester, en fonction du temps t. \diamond ALA-O(CH₂)₅Me **9**; \square ALA-O(CH₂)₆ **10**; \triangle ALA-O(CH₂)₂OMe **12**; \circ ALA-O(CH₂)₂OEt **13**; $*$ ALA-O((CH₂)₂O)₂Et **14**.

Dans le cas des mesures avec les deux enzymes, les meilleurs résultats obtenus pour les hydrolyses ont été mesurés avec les dérivés à base d'éthylène glycol.

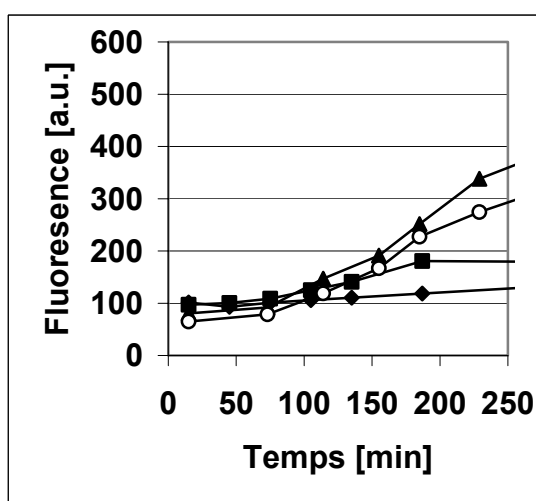
1.6.3.3 Production de PpIX à partir des dérivés synthétiques de ALA à base d'éthylène glycol en culture cellulaire

Toute une famille de nouveaux esters a donc été synthétisée, afin de déterminer leur capacité à être utilisé en PDT. Afin de pouvoir déterminer l'influence de la chaîne éthylène glycol et de l'éther terminal, quatre esters ont été synthétisés et testés. La production de PpIX à partir de la famille des esters éthylène glycol de ALA a été évaluée en utilisant des cultures de cellules humaines, l'une des lignées est d'origine endothéliale (HCEC) (Graphique 3) et l'autre d'origine tumorale de carcinome pulmonaire (A549) (Graphique 4). La première approche a consisté à déterminer l'influence de l'augmentation de la longueur de l'éther terminal. La production de PpIX à partir de ALA-O(CH₂)₂OMe **12** et ALA-O(CH₂)₂OEt **13** a donc été comparée sur les cellules endothéliales et tumorales. Dans le cas des cellules endothéliales (Graphique 3) le dérivé ALA-O(CH₂)₂OEt **13** produit une quantité plus importante de PpIX que le dérivé ALA-O(CH₂)₂OMe **12**. Dans le cas des cellules tumorales (Graphique 4), la

quantité de PpIX est inférieure à celle obtenue dans le cas les cellules endothéliales et cela dans le cas des deux dérivés.



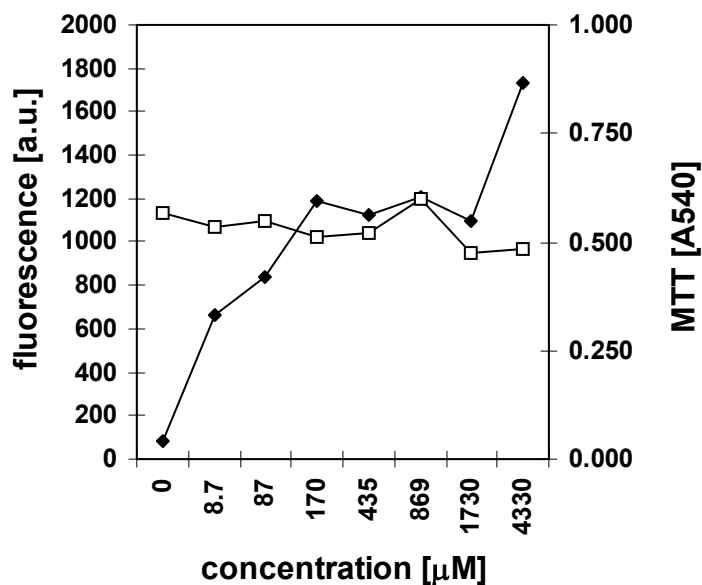
Graphique 3 : Production de fluorescence émise par la PpIX, après exposition des cellules endothéliales humaines (HCEC) aux esters éthylène glycol de ALA. Détermination de l'influence de la longueur de la chaîne éther et éthylène glycol. : ◆ ALA-O((CH₂)₂O)Me **12** [87 μM]; ■ ALA-O((CH₂)₂O)Et **13** [82 μM]; ▲ ALA-O((CH₂)₂O)₂ Et **13** [100 μM]; ○ ALA-O((CH₂)₂O)₃ Et **14** [90 μM].



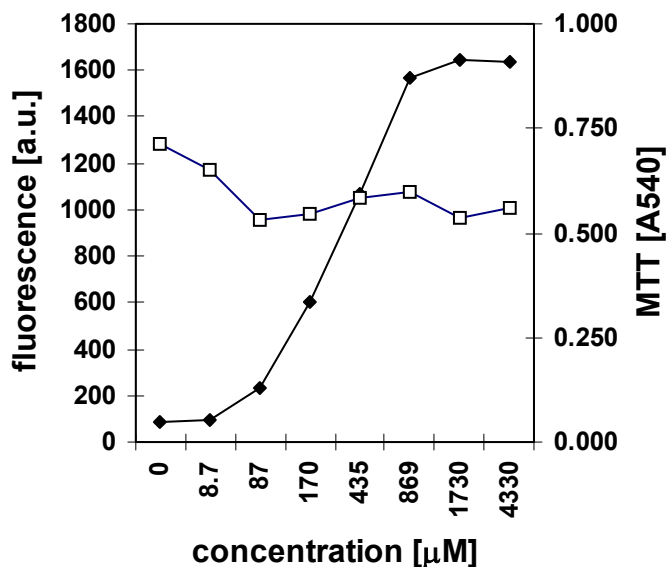
Graphique 4 : Production de fluorescence émise par la PpIX, après exposition des cellules de carcinome humain (A549) aux esters éthylène glycol de ALA. Détermination de l'influence de la longueur de la chaîne éther et éthylène glycol. : ◆ ALA-O((CH₂)₂O)₂Me **12** [87 μM]; ■ ALA-O((CH₂)₂O)Et **13** [82 μM]; ▲ ALA-O((CH₂)₂O)₂Et **13** [79 μM]; ○ ALA-O((CH₂)₂O)₃Et **14** [85 μM].

La seconde étape a consisté à déterminer les effets de l'allongement de la partie éthylène glycol de la chaîne. Dans le cas des cellules endothéliales, aucune différence n'a été observée entre le mono-, le di- et le triéthylène glycol mono éthyle éther. Pour les cellules cancéreuses, en augmentant la taille de la chaîne éthylène glycol, la production de PpIX devient légèrement plus importante. Ces résultats suggèrent qu'une certaine sélectivité pour les cellules endothéliales par rapport aux cellules tumorales peut être obtenue, en utilisant des esters de ALA de la famille des éthylènes glycol tels que **12-15**. La cytotoxicité de ces composés en l'absence d'exposition à une source lumineuse supplémentaire a été contrôlée par comparaison

de la production de la fluorescence avec la mortalité des cellules. Pour cela, la fluorescence de la PpIX à 300 minutes a été comparée avec la survie des cellules (évaluation par MTT (2.1.18 p.104) après 20 heures d'exposition. L'exposition des cellules au photosensibilisateur a été prolongée, pour permettre à la mort cellulaire de se produire, car c'est un processus plus lent que la production de PpIX.

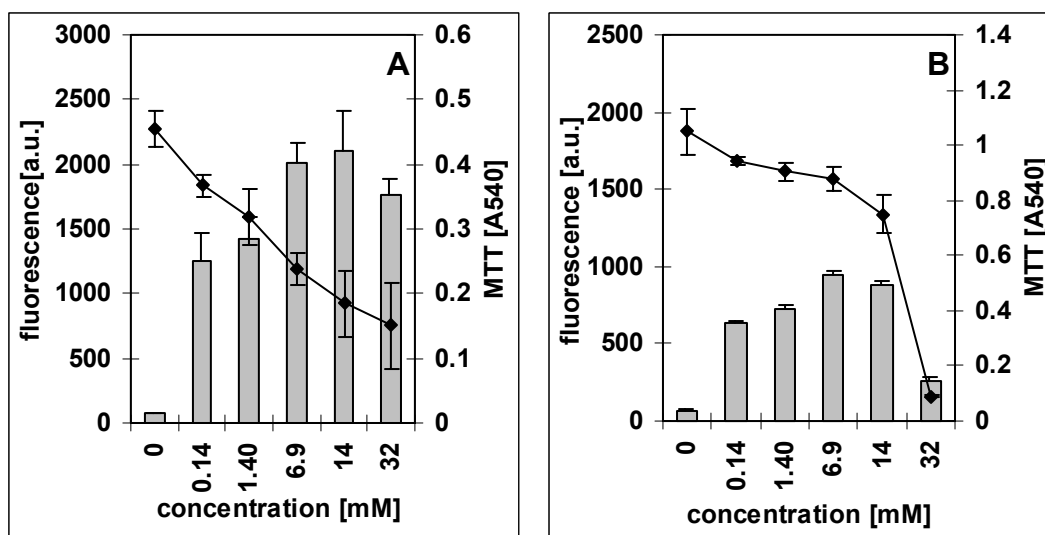


Graphique 5 : Fluorescence induite par la PpIX et réduction de MTT dans le cas de la lignée cellulaire (HCEC) exposée à des concentrations croissantes de ALA-O((CH₂)₂O)₂Et **13**. ◆ fluorescence de la PpIX [a.u.] à 300 min; □ réduction par MTT [A₅₄₀ nm] à 24 h.

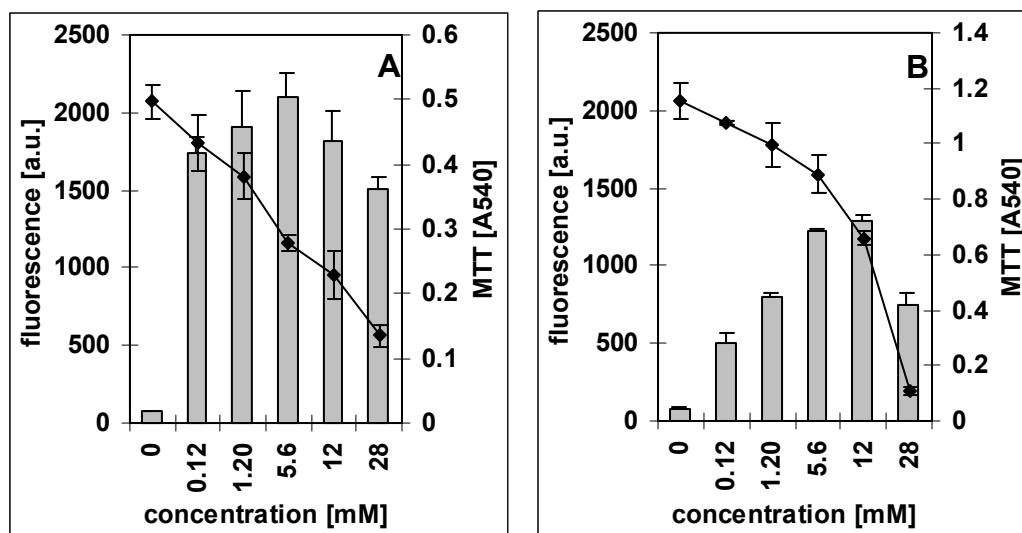


Graphique 6 : Fluorescence induite par la PpIX et réduction de MTT dans le cas de la lignée cellulaire (A549) exposée à des concentrations croissantes de ALA-O(CH₂)₂OEt **13**. \blacklozenge fluorescence de la PpIX [a.u.] à 300 min; \square réduction par MTT [A₅₄₀ nm] à 24 h.

Aucune cytotoxicité n'a été observée pour les cellules HCEC (Graphique 5), ainsi que pour les cellules A549 (Graphique 6) exposées à des concentrations faibles d'ALA-O((CH₂)₂O)₂Et, alors que la fluorescence induite par la PpIX était déjà importante. Dans le cas d'exposition des cellules à des hautes concentrations de dérivés d'éthylène glycol, une certaine cytotoxicité a été observée (Graphique 7) et (Graphique 8). Les résultats indiquent que les cellules endothéliales sont plus sensibles que les cellules tumorales aux effets cytotoxiques de ces dérivés, un effet parallèle à la production de PpIX.



Graphique 7 : Efficacité de ALA-O((CH₂)₂O)₂Et **13** en utilisant des concentrations croissantes sur des cellules endothéliales humaines HCEC (A) et des cellules tumorales A549 (B) . Production de PpIX (fluorescence à 300 min) et cytotoxicité à 20 heures (mesures MTT, absorbance à 540 nm).



Graphique 8 : Efficacité de ALA-O((CH₂)₂O)₃Et **13** en utilisant des concentrations croissantes sur des cellules endothéliales humaines HCEC (A) et des cellules tumorales A549 (B). Production de PpIX (fluorescence à 300 min) et cytotoxicité à 20 heures (mesures MTT, absorbance à 540 nm).

1.6.3.4 Discussion des résultats obtenus à partir d'esters synthétiques d'éthylène glycol contenant ALA

L'adressage de petites molécules à des cellules spécifiques est un domaine où la recherche est particulièrement active. Une application importante de l'adressage pourrait être d'obtenir des molécules cytostatiques¹ spécifiquement ciblées contre des cellules cancéreuses. Pour pouvoir appliquer cette méthodologie en PDT, les précurseurs des photosensibilisateurs, dans notre cas ALA, doivent être internalisés au sein des cellules, afin de devenir actifs. Il est donc primordial d'acheminer sélectivement ALA aux cellules que l'on désire éliminer, afin d'éviter au maximum les destructions des cellules saines, ainsi que les effets secondaires liés au traitement. Comme cela a déjà été expliqué, ALA est le précurseur de la PpIX qui est un photosensibilisateur endogène. C'est au sein des mitochondries que ALA va être transformé par biosynthèse en PpIX. Dans le cas d'un dérivé, l'efficacité du produit ne va plus seulement dépendre de la présence d'un système de transport capable d'acheminer ALA au sein du cytoplasme, mais également du système d'enzymes qui va permettre la libération de ALA à partir de "prodrug". Cette ou ces étapes sont nécessaires, afin que ALA puisse être incorporé dans la biosynthèse menant à l'hème. Ainsi lorsqu'un dérivé de ALA est utilisé en tant que prodrug une ou plusieurs étapes sont ajoutées en plus de l'étape d'assimilation du produit par la cellule. De ce fait, le prodrug doit posséder des capacités supérieures dans le domaine de la vitesse de son internalisation au sein de la cellule, avoir une cytotoxicité plus faible, ou encore montrer une sélectivité supérieure envers les cellules ciblées, sinon il perd tout intérêt, puisque les étapes supplémentaires de déprotection vont ralentir son entrée dans la biosynthèse de l'hème. Ces processus spécifiques du métabolisme peuvent être différents dans les cellules n'ayant pas le même phénotype [97], ainsi un même dérivé n'aura pas les mêmes effets envers deux lignés cellulaires. Il est courant que pour un même "prodrug", de bons

¹ Se dit de substances qui inhibent les divisions cellulaires

résultats soient obtenus sur un type de cellules, alors qu'un autre type de cellules ne donnera aucune réponse envers ce produit.

Le but de ce travail est de définir des moyens d'adresser spécifiquement ALA soit aux cellules endothéliales associées aux tumeurs, soit directement aux cellules tumorales. Afin d'évaluer le potentiel de cibler spécifiquement des estérases cellulaires, la production de PpIX obtenue, lors de différentes mesures, a été comparée, en suivant l'exposition de cellules endothéliales humaines ou des cellules de carcinome humain, aux dérivés des esters éthylène glycol **12-15** et en comparant les résultats obtenus, avec les mesures effectuées sur les esters alkyles de ALA **8-11** [145;150]. Les esters de ALA de la famille des éthylènes glycol **12-15** ont démontré une certaine sélectivité pour les cellules endothéliales par rapport aux cellules tumorales.

Il a été démontré lors d'expériences précédentes que ALA-O(CH₂)₅Me **9** est internalisé plus rapidement et efficacement que ALA **7** ou que ALA-OMe **8** [145;146;150;172]. Cependant, aucune différence de quantité de PpIX n'a été observée entre les cellules endothéliales et tumorales, ce qui dénote un manque de sélectivité de la part de ces composés. En utilisant des esters d'éthylène glycol **12-15**, nous avons obtenu une augmentation de la production de PpIX dans les cellules endothéliales par rapport à celles des cellules tumorales. En allongeant la chaîne terminale, une augmentation de la production de PpIX était observée (cf. composé **13**). De plus, les dérivés éthylène glycol **12-15** utilisés lors de ces expériences ont démontré un meilleur rapport entre la fluorescence induite par la production de PpIX et la cytotoxicité de ces produits en l'absence de lumière que les esters alkyls. Ces observations suggèrent qu'une cytotoxicité réduite pour les cellules saines peut être obtenue en utilisant cette classe de composés. La cytotoxicité de ces produits peut, avec un ciblage hautement sélectif des cellules à traiter, être un avantage dans le traitement du cancer.

Lors de diverses études, il a été démontré qu'une partie importante de l'efficacité de la PDT provient des dommages causés au système vasculaire des tumeurs. La PDT peut causer la régression des tumeurs et la mort des cellules cancéreuses (apoptose et nécrose) [173], soit en détruisant directement la cellule tumorale, soit en provoquant une asphyxie de la tumeur causée par les obstructions microvasculaires, induites par la destruction des cellules endothéliales du système vasculaire de la tumeurs [174;175]. L'administration ciblée de médicaments aux cellules endothéliales associées à la tumeur après une injection systémique est aussi un avantage par rapport au ciblage des cellules tumorales, afin de causer des dégâts importants à toute la tumeur. En privant la tumeur d'oxygène et d'éléments nutritifs, cela permet d'atteindre les parties difficiles d'accès de la lésion, en couplant ainsi une attaque directe sur les cellules cancéreuses et une destruction du système vasculaire, on peut espérer occasionner des dégâts maximums aux tumeurs tout en épargnant le tissu sain

En conclusion, les esters dérivés de l'éthylène glycol ont montré un potentiel intéressant utilisable lors de protocoles de PDT. Ces produits permettent d'envisager une nouvelle approche, en ciblant les cellules endothéliales associées aux tumeurs. L'idée d'adresser des précurseurs de PpIX à des cellules spécifiques, dans ce cas en adressant des esters d'éthylènes glycol d'ALA pour des estérases spécifiques semble réalisable. On peut donc espérer que les modifications suivantes de ALA vont permettre d'augmenter cette sélectivité.

1.6.4 Application des dérivés peptidiques de ALA en PDT

1.6.4.1 Description des réactifs et des mécanismes réactionnels du couplage

1.6.4.1.1 Mécanismes réactionnels des réactifs de couplage

Etant donné que les groupes protecteurs sont sensibles aux acides et aux bases, la liaison peptidique doit être formée dans des conditions les plus douces possibles [176;177]. Il est, dès lors, nécessaire de faire appel à des réactifs particuliers pour activer la fonction carboxylique. Le plus universel de ces réactifs est, sans conteste, le **dicyclohexylcarbodiimide (DCC)**. La réactivité électrophile de cette molécule est analogue à celle d'un cétène ou d'un isocyanate. Le produit final est la *N, N'*-dicyclohexylurée (Figure 35).

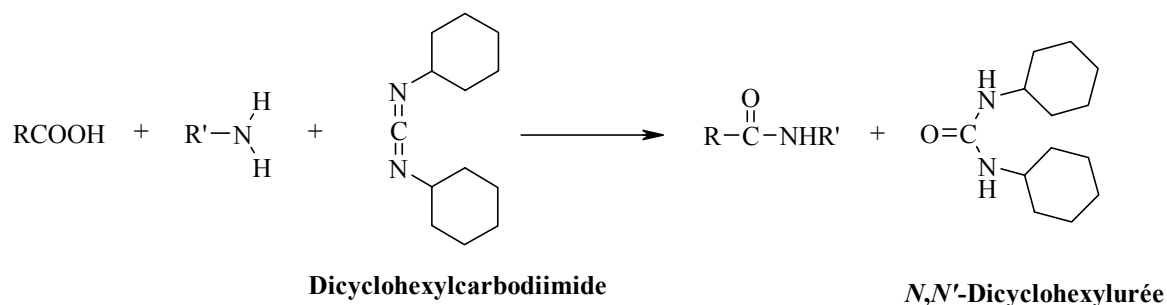


Figure 35 : Formation d'une liaison peptidique en présence de dicyclohexylcarbodiimide

Les premiers essais de couplage ont été faits avec la DCC, le problème réside dans l'urée obtenue après réaction et qui est soluble en quantité plus au moins importante dans la plupart des solvants que nous avons utilisé lors de la synthèse et lors des étapes de purification. Des traces d'urée se sont retrouvées dans tous les produits finaux et il a fallu, afin d'obtenir une bonne pureté faire plusieurs purifications chromatographiques successives de nos produits. Afin de résoudre ce problème, il a fallu se diriger vers une alternative. La solution a été trouvée en remplaçant le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) par le *N*-(3-diméthylaminopropyl)-*N'*-éthylcarbodiimide hydrochloride (EDC). Ce réactif de couplage a l'avantage de posséder une amine tertiaire qui peut être protonée produisant ainsi une urée chargée, facilement éliminée par extraction en milieu acide ou par chromatographie. Le mécanisme réactionnel est le même pour l'EDC (Figure 36) que pour la DCC.

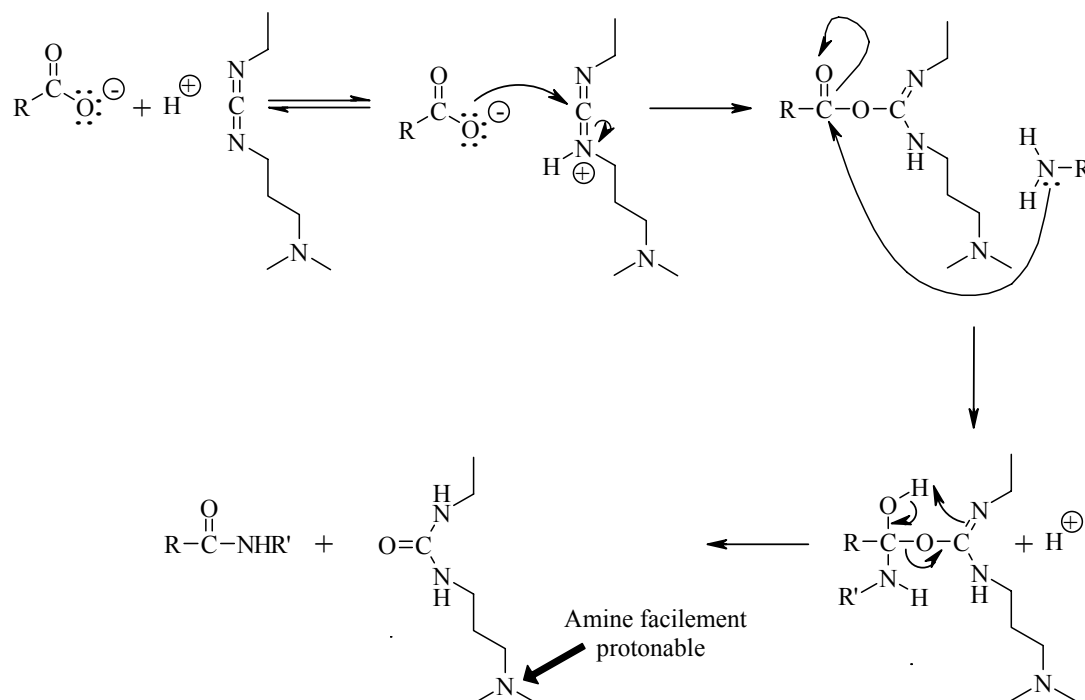


Figure 36 : Mécanisme de la formation d'une liaison peptidique en présence d'EDC

Bien que les amines puissent également réagir avec les carbodiimides (Figure 37) (donnant des dérivés guanidine) [176;177], le taux de réaction est négligeable comparé à l'addition rapide de l'acide carboxylique sur une des deux doubles liaisons du carbodiimide. Comme le montre la Figure 36, il faut, pour que l'attaque se fasse rapidement sur le carbodiimide, avoir un bon nucléophile. C'est le cas pour le carboxylate, mais pas pour l'amine.

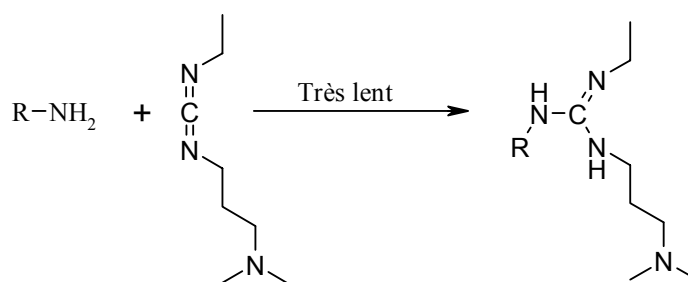


Figure 37 : Réaction de l'amine avec le carbodiimide

Le second chemin de synthèse, amenant à la formation de la liaison peptidique, passe par la formation d'un anhydride symétrique, ce qui engendre une autre sorte de réaction. Cette réaction est importante dans le cas d'une préactivation où l'acide carboxylique est en présence du carbodiimide avant l'adjonction de l'amine. Dans le cas où l'amine et l'acide carboxylique sont ajoutés sans préactivation, l'anhydride n'est pas présent ou uniquement en très faible quantité lors de la réaction. L'anhydride est formé par l'attaque d'une molécule du composé carboxyle n'ayant pas encore réagi avec l'intermédiaire O-acyl-isouré (Figure 38).

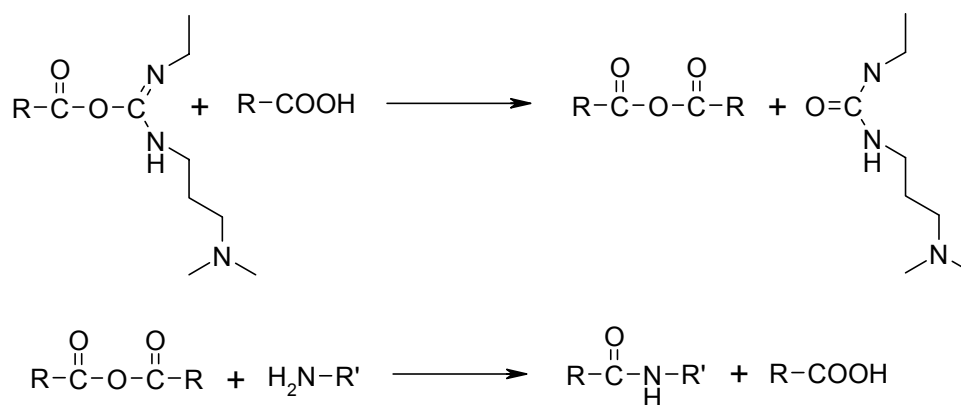


Figure 38 : Formation et réaction de l'anhydride symétrique. Réaction qui a lieu lorsque le carboxylate est en présence du carbodiimide sans amine

La génération extrêmement rapide de l'anhydride symétrique peut être expliquée, en supposant une attaque de l'anion carboxylate sur le carbonyle réactif (Figure 39).

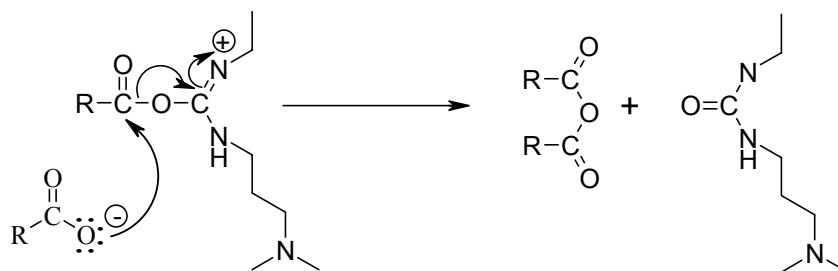


Figure 39 : Mécanisme de formation de l'anhydride acétique

L'exécution rapide de l'activation et du couplage en une seule opération est un avantage considérable de l'utilisation de l'EDC. De plus l'urée formée peut être facilement éliminée par extraction en milieu acide. La polarité de l'urée permettrait une séparation complète par chromatographie au cas où l'extraction du mélange réactionnel n'était pas possible.

1.6.4.1.2 Racémisation lors des couplages peptidiques

A l'exception de la glycine, tous les autres acides aminés qui constituent les protéines possèdent un atome de carbone α -chiral et les protéases ne reconnaissent que les acides aminés L. Afin d'obtenir un peptide final pur, il est indispensable d'utiliser des acides aminés énantiomériquement purs et de garder la configuration absolue durant les différentes opérations de synthèse [178;179]. Si ces précautions ne sont pas prises, un mélange de produits sera obtenu à la place du produit désiré.

La compréhension des mécanismes de racémisation semble nécessaire afin de pouvoir les prévenir. Un travail expérimental considérable a été fait dans ce domaine, et a été répertorié dans une revue de Kemp [151]. Trois possibilités peuvent être envisagées comme pouvant amener à une racémisation :

- Une élimination directe du proton en position α .
- Une racémisation passant par une élimination β réversible.
- Une racémisation via les azalactones.

La racémisation des acides aminés catalysée par les acides implique probablement la protonation de l'oxygène doublement lié de l'ester qui est suivie par une énolisation (Figure 40).

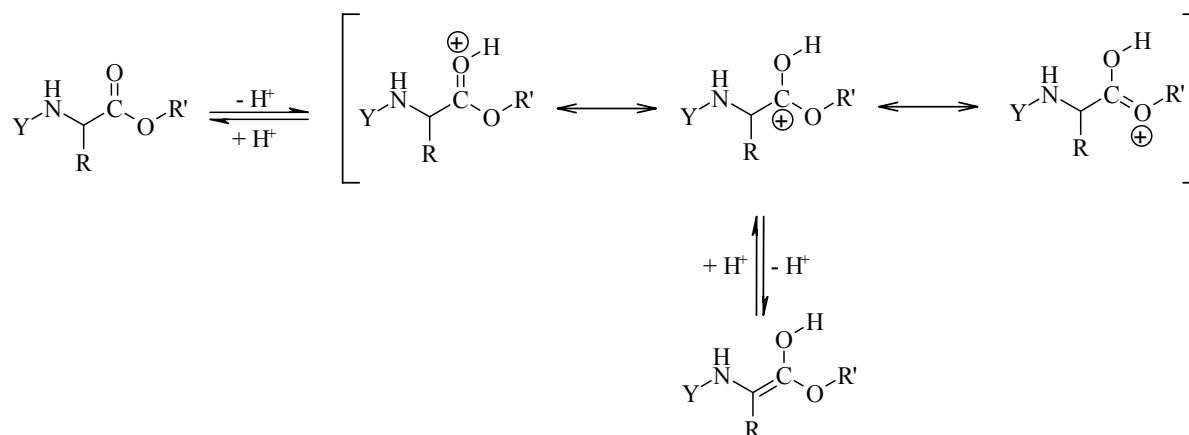


Figure 40 : Racémisation en présence d'acide fort.

Un tel procédé requiert cependant un acide fort, car la protonation de l'atome d'oxygène ne peut pas avoir lieu en présence d'un acide trop faible. Pourtant, l'élimination par acidolyse de certains groupes protecteurs exige l'utilisation d'acides très forts, tels que l'acide bromique [180] ou l'acide fluorhydrique [181]. Les bons résultats obtenus lors de l'application pratique de ces réactifs, indiquent que l'importance de la racémisation causée par les acides doit être très faible, voir négligeable. Cette circonstance favorable pourrait être due à la faible température à laquelle les réactions de déprotection ont lieu, l'élimination des groupes protecteurs par acidolyse à haute température [182] entraînant une perte de chiralité [183].

Le mécanisme de racémisation le plus étudié et probablement le plus important entraîne la formation d'azalactones [184] (Figure 41):

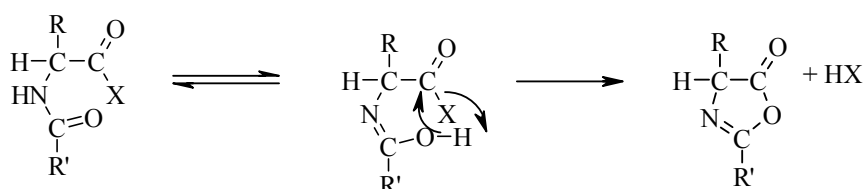


Figure 41 : Formation de l'azalactone

L'explication de la tendance des azalactones à racémiser est due à la facilité avec laquelle le proton acide peut être arraché par une base [178;179]. Le carbanion obtenu par cette opération est stabilisé par délocalisation de la charge (Figure 42) :

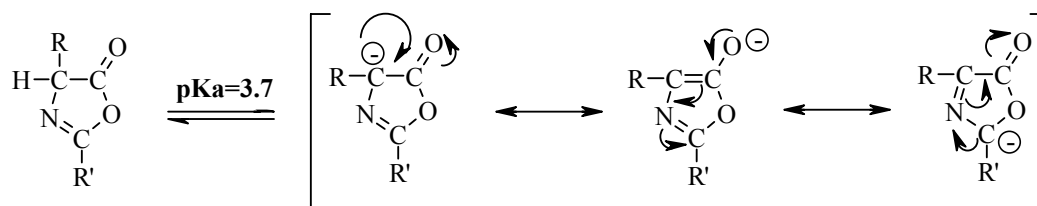
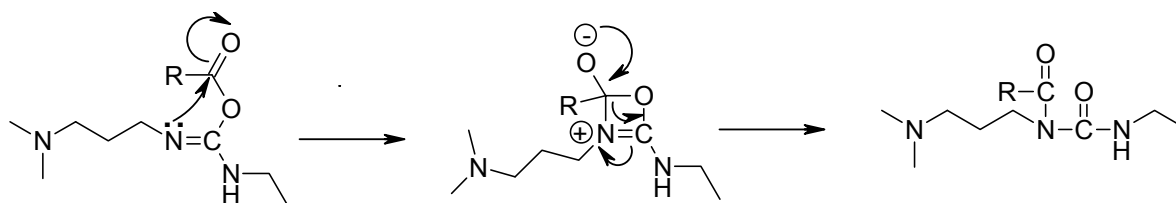


Figure 42 : Stabilisation du carbanion par résonance

Cette hypothèse a tout d'abord été postulée et prouvée de façon subséquente par des spectres IR. La formation d'azalactone est importante avec les acides aminés possédant un reste benzyle, et un peu moins importante avec les acides aminés possédant un reste alkyle. Pendant une longue période, on a pensé que les acides aminés possédant des groupes protecteurs du type uréthane ou benzyloxycarbonyle échappaient à ce type de réaction. L'absence de racémisation lors de l'activation de ces derniers était attribuée à un manque de formation de l'azalactone. Mais ces dernières années, des azalactones ont été obtenues à partir d'acides aminés protégés par des groupes benzyloxycarbonyle-, tert-butoxycarbonyle, etc...

1.6.4.1.3 Utilisation du 1-hydroxybenzotriazole (HOBt)

L'utilisation des réactifs de couplage entraîne également quelques problèmes [178;179]. En effet, lors de l'activation, les réactifs intermédiaires peuvent amener à une perte de la chiralité lorsque les segments de peptide sont couplés. De plus, le centre nucléophile du carbone doublement lié à l'oxygène sur le O-acylisourée entre en compétition avec les composés amine pour l'attaque du résidu acyle. Cette compétition amène à la formation d'un produit non réactif : *N*-acylurée (Figure 43).

Figure 43 : Formation du produit secondaire *N*-acylurée. Cette réaction peut également se passer de façon intermoléculaire

La racémisation, ainsi que la formation de la *N*-acylurée peuvent être supprimées par l'addition d'auxiliaires nucléophiles comme le 1-hydroxybenzotriazole (HoBT) proposé par König et Geiger (1970). L'élimination du proton du carbone chiral peut-être supprimé en ajoutant un acide faible au mélange réactionnel. Parmi les nombreux composés testés, on peut citer le 1-hydroxybenzotriazole (König et Geiger 1970) et le *N*-hydroxysuccinimide (Weygand et al. 1966) qui sont communément utilisés dans la synthèse peptidique. Ces composés ne sont pas assez acides pour protoner la fonction amine des réactifs et de plus ils n'interfèrent pas avec la réaction d'acylation, mais leur acidité est suffisante pour empêcher l'élimination du proton de l'atome chiral de l'intermédiaire activé.

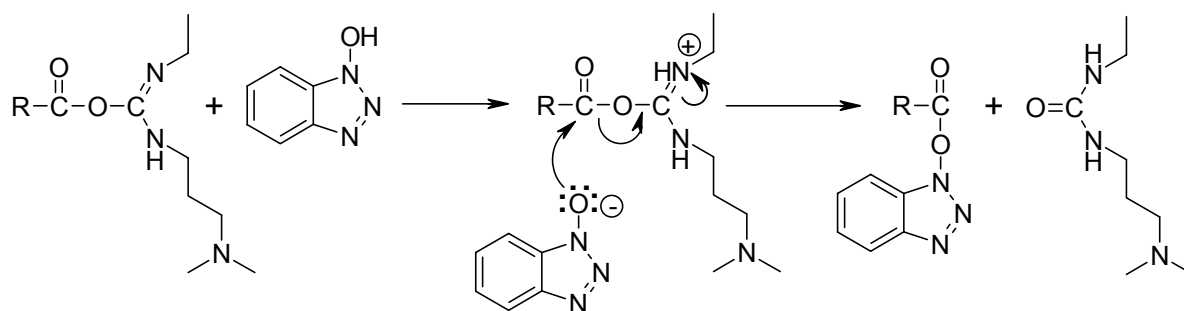


Figure 44 : Réaction de HOBt avec l'ester activé

Toutefois ce n'est pas uniquement leur acidité qui permet de les utiliser dans le rôle d'agents supprimant la racémisation. En effet, beaucoup d'autres acides faibles n'ont montré qu'un faible potentiel de supprimer la racémisation lors de leur utilisation dans les mêmes conditions que le HOBt. Les deux additifs sont décrits comme étant de puissants nucléophiles L'attaque de l'additif sur l'intermédiaire réactif donne l'O-acyle-1-hydroxybenzotriazole [185], un agent d'acylation très puissant (Figure 44). Cette réactivité est probablement due en partie, à l'assistance anchimérique (Figure 45). On observe le même type de catalyse lors de l'utilisation d'autres composés *N*-hydroxy, par exemple le 1-hydroxy-2-pyridone.

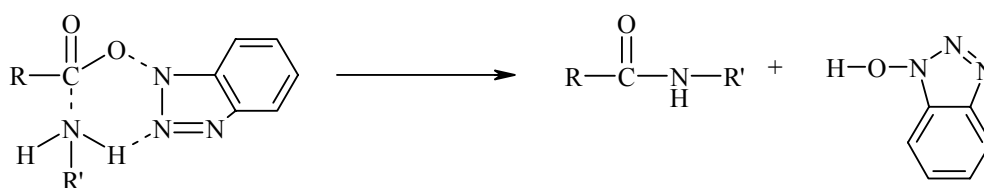


Figure 45 : Catalyse de la réaction par HOBt

La présence d'un second nucléophile dans le mélange réactionnel réduit la concentration de l'O-acylisourée et réduit les effet de racémisation, en réduisant la durée de vie des espèces entraînant la racémisation. L'ester produit durant cette réaction possède une plus grande stabilité envers la racémisation.

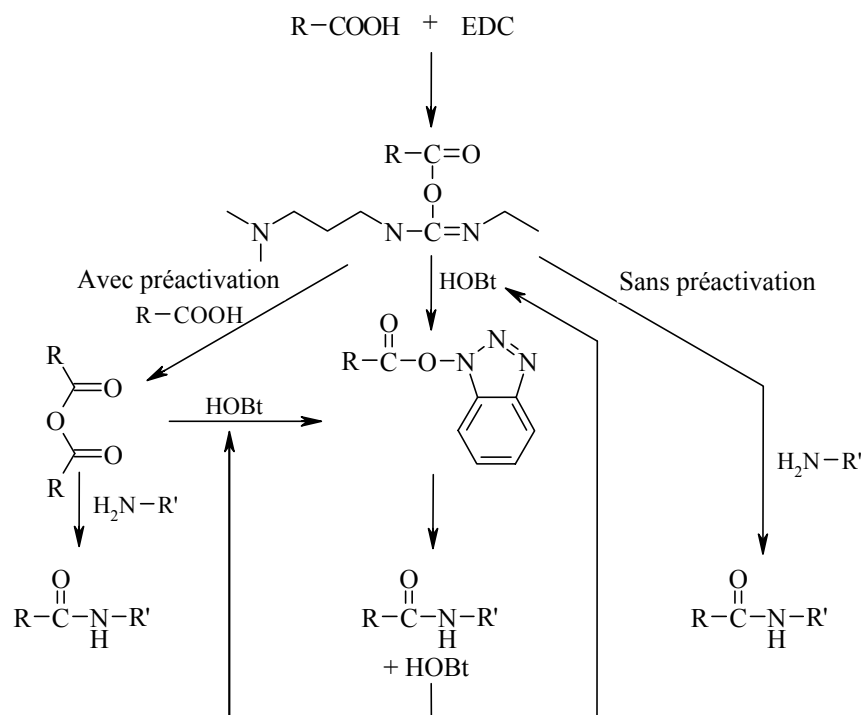


Figure 46 : Résumé des différentes voies amenant au couplage

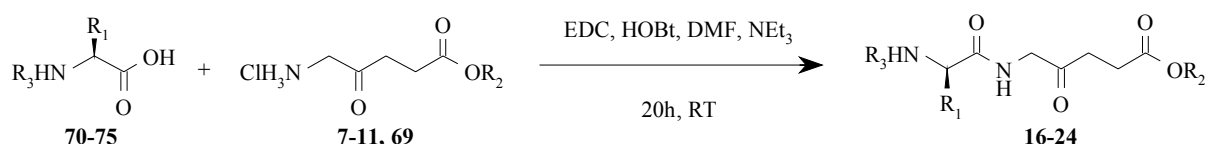
L'autre propriété de l'auxiliaire nucléophile ($HOBT$) est de réduire la durée de vie de l'intermédiaire activé O-acylisouré et par conséquent de diminuer les effets de la migration $O \rightarrow N$ acyle qui entraîne la formation du N-acyluré. Il est également important de noter que l' $HOBT$ est régénéré durant l'acylation, et de ce fait sa concentration reste à peu près stable durant le couplage. Les différents chemins possibles lors du couplage en présence d' $HOBT$ et du réactif de couplage EDC sont résumés dans la Figure 46.

1.6.4.2 Synthèse de la première génération de dérivés peptidiques

La condensation des esters de ALA avec un acide aminé, afin d'obtenir les analogues peptidiques, donne de bons résultats. Les premiers essais de couplage ont été réalisés avec des acides aminés protégés par le groupe Fmoc, en vue d'une application en phase solide. Toutefois, il s'est vite avéré que la déprotection du groupe Fmoc en milieu basique posait de nombreux problèmes. En effet, les produits obtenus n'étant pas stables sous ces conditions, comme cela a été démontré dans la thèse de A. Greppi [164], il a fallu trouver un autre groupe protecteur. Le choix s'est donc porté sur des acides aminés protégés par le groupe Boc, qui peut être éliminé en présence d'acide trifluoroacétique. En contraste avec les dérivés peptidiques protégés Fmoc, qui étaient pour la plupart cristallins, ceux protégés Boc ne le sont pas dans la majorité des cas; ce qui rend leur purification plus délicate. La première génération de dérivés peptidiques a été synthétisée, par couplage d'acides aminés protégés par le groupe Boc disponibles commercialement avec l'ester de ALA correspondant. La réaction [186] a lieu dans le DMF, en présence de $HOBT$ (1-hydroxybenzotriazole) et avec l' EDC (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride) comme réactif de couplage. Après extraction et purification sur colonne, le produit obtenu, dans la plupart des cas une

huile pâteuse, est entièrement caractérisée par spectroscopie. Les rendements obtenus sont rassemblés dans le Tableau 7.

Lors de cette réaction peu de problèmes ont été rencontrés, il a toutefois été nécessaire de remplacer la DCC, dont l'urée produite lors du couplage, était soluble dans les solvants utilisés pour la purification par l'EDC. Ce changement a permis d'éliminer toute trace d'urée dans nos produits, ce qui n'était pas le cas avec la DCC, puisque l'EDC peut être éliminé par lavage aqueux ou par chromatographie en présence d'éluant pas trop polaire.

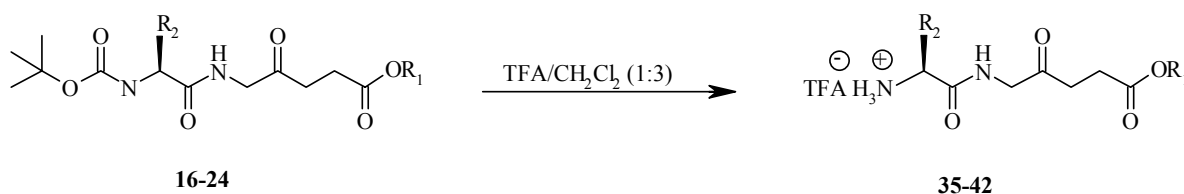


Produit					
16	CH ₃	Ala	Me	Boc	81 %
17	CH ₂ C ₆ H ₅	Phe	Me	Boc	79 %
18	CH ₂ COO ^t Bu	Asp	Me	Boc	73 %
19	(CH ₂) ₂ COO ^t Bu	Glu	Et	Boc	75 %
20	(CH ₂) ₄ NHBoc	Lys	Me	Boc	71 %
21	(CH ₂) ₃ NHC(NBoc)(NHBoc)	Arg	Me	Boc	59 %
22	CH ₃	Ala	Hexyl	Boc	80 %
23	CH ₃	Ala	Et	Boc	84 %
24	CH ₃	Ala	Cyclohexyl	Boc	72 %

Tableau 7 : Récapitulation des rendements des différents couplages peptidiques

1.6.4.3 Déprotection de la première génération de dérivés peptidiques

La deuxième étape de synthèse [186] effectuée sur ces dérivés a été de les déprotéger, le groupe Boc a été éliminé, ainsi que pour certains dérivés le groupe ester protégeant l'acide de ALA. L'élimination du groupe Boc a lieu par traitement des produits 16-24 avec une solution d'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane (1:1). Le solvant est éliminé à température ambiante et le résidu pâteux est entièrement caractérisé par spectroscopie. Tous ces produits sont conservés à l'abri de la lumière à un maximum de 4 °C. Les rendements obtenus sont rassemblés dans le Tableau 8.



Composé	R ₁	R ₂	Acide aminé	Rendement
35	Me	CH ₃	Ala	quantitatif
36	H	CH ₃	Ala	quantitatif
37	Et	CH ₃	Ala	quantitatif
38	Hexyl	CH ₃	Ala	quantitatif
39	Cyclohexyl	CH ₃	Ala	quantitatif
40	Me	CH ₂ C ₆ H ₅	Phe	quantitatif
41	CH ₃	(CH ₂) ₄ NH ₃ Cl	Lys	quantitatif
42	CH ₃	CH ₂ COOH	Asp	quantitatif

Tableau 8 : Récapitulation des rendements de déprotection par TFA

La déprotection, dans ce cas-ci, est réalisé par un traitement acide (TFA) dans des conditions suffisamment douces pour laisser les autres liaisons peptidiques inchangées. La déprotection a lieu selon le mécanisme suivant (figure 47)

Sous leur forme protégée, ces produits ne présentent aucun problème de stabilité, par contre dès qu'ils ont été traités à l'aide du mélange TFA/CH₂Cl₂, ils deviennent instables en solution. Pour tous ces produits le seul solvant qui évite une dégradation trop rapide est l'eau, ce qui présente un avantage biologique. En effet il a été impossible par exemple de faire une RMN du produit dans du méthanol, car le temps de préparer la solution et de faire la mesure, les dégradations étaient déjà trop importantes. Dans l'eau les dégradations commencent à être visibles au bout de quelques heures, ce qui a permis de faire des mesures spectroscopiques, ainsi que des mesures de fluorescence.

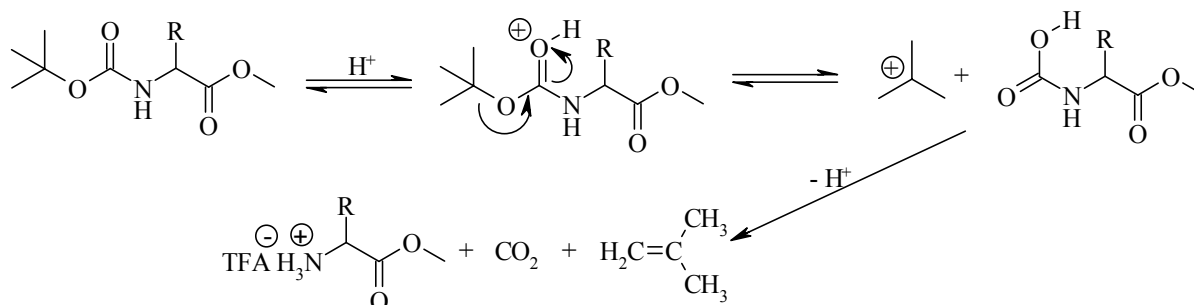
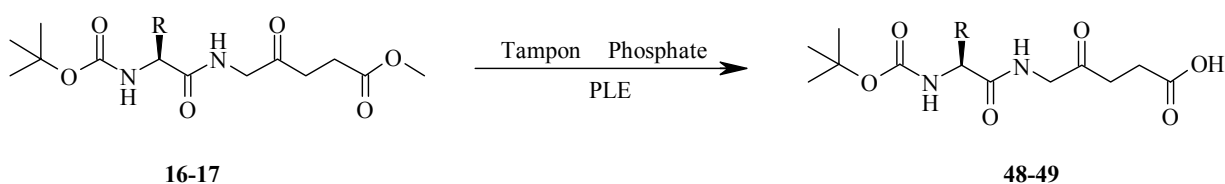


Figure 48 : Mécanisme de déprotection du groupe Boc en présence de TFA

L'autre fonction à déprotéger est le méthyle ester, il est facilement éliminé en utilisant un estérase tel l'*estersase de foie de porc* (PLE). Le produit est traité avec la PLE [187] dans une solution tampon de phosphate. La libération de l'acide est suivie par titration au pH-stat (pH = 8.0) à l'aide d'une solution NaOH 0.1N. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à ce que la réaction soit complète. Après purification, le produit est entièrement caractérisé par spectroscopie. Les rendements obtenus sont rassemblés dans le Tableau 9



16-17

48-49

Composé	R	Rendement
48	CH ₃	88 %
49	CH ₂ C ₆ H ₅	84 %

Tableau 9 : Récapitulation des rendements des différentes déprotections par hydrolyse enzymatique

Les produits obtenus lors de cette déprotection ne posent aucun problème de stabilité, au contraire des produits dont le groupe Boc a été éliminé.

1.6.4.4 Tentative d'explication de l'instabilité de la première génération de dérivés peptidiques

L'azote est plus nucléophile que l'oxygène de sorte que les amines s'additionnent très efficacement au groupe carbonyle des aldéhydes et des cétones. En présence d'amine, les aldéhydes et les cétones forment des hémiaminaux, analogues azotés des hémiacétals. Les hémiaminaux provenant d'amines primaires perdent facilement de l'eau, ce qui engendre une double liaison carbone-azote. Ce groupe fonctionnel est appelé imine (ou anciennement base de Schiff) et est l'analogue azoté d'un aldéhyde ou d'une cétone.

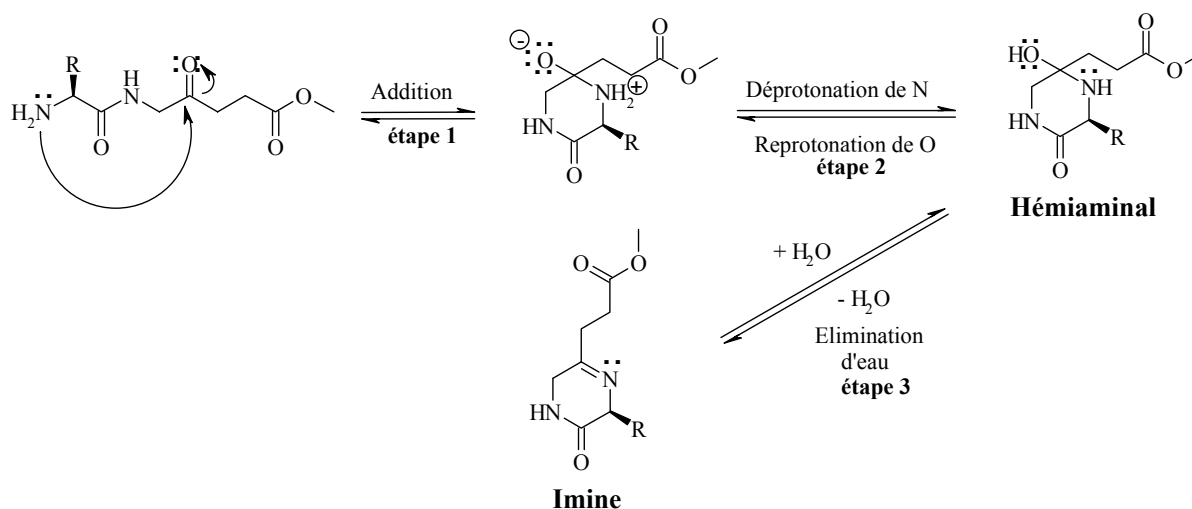


Figure 49 : Formation de l'imine à partir du dérivé N-déprotégé.

Lors de la déprotection, les dérivés de ALA composés d'un seul acide aminé ont posé des problèmes de stabilité [158]. Une hypothèse permettant d'expliquer ce phénomène est que la distance entre l'amine terminale et la fonction cétone du dérivé de ALA permet la formation intramoléculaire d'une imine (ou base de Schiff) entre l'amine terminale et la fonction cétone et que cette réaction joue un rôle majeur dans la destruction de nos dérivés de ALA. Lors de la déprotection, la formation de l'imine (Figure 49) conduit à la formation d'un cycle à six carbones qui est thermodynamiquement stable.

La première étape de la réaction est une addition nucléophile sur le groupe carbonyle. Cette étape est suivie d'un transfert rapide du proton, ce qui entraîne la formation d'un hémiaminal, parfois aussi appelé carbinolamine. Ce produit est généralement si réactif qu'il est impossible

de l'isoler. L'étape suivante qui est catalysée par la présence d'acide, amène à la formation d'une molécule d'eau qui est éliminée. Le produit résultant de ces transformations est une imine. Lors des trois premières étapes, l'équilibre se fait très rapidement, alors que l'élimination de l'eau de l'hémiacétal protonée est l'étape limitante de la réaction.

Bien que la réaction soit catalysée en milieu acide avec un pH modéré, à des concentrations plus élevées la vitesse de transformation diminue du fait de l'augmentation de la concentration de l'acide, car l'amine est également protonée par l'acide. Par conséquent, la concentration de nucléophile libre est inversement proportionnelle à la concentration de l'acide. Dans les solutions ayant une concentration d'acide élevée (pH faible), la concentration de molécule ayant leur fonction amine non protonée est si faible que l'étape 1 devient l'étape limitante. A une concentration d'acide modérée, il y a suffisamment d'amine non protonée, pour que **l'étape 1** (Figure 49) permette d'obtenir un équilibre rapide, mais il y a également suffisamment d'acide pour permettre une catalyse de **l'étape 3** (Figure 49). Pour cette raison, cette réaction est souvent réalisée en présence d'un tampon tel que l'acétate de sodium. Dans certains cas, particulièrement lors de la formation de simple imine, la réaction a lieu sans catalyse acide.

Le mécanisme d'élimination d'eau (Figure 50) à partir de l'hémiacétal est identique à celui de la décomposition d'un hémiacétal en composé carbonyle et en alcool. Il débute par la protonation du groupe hydroxyle. La protonation de l'azote, qui est plus basique, aboutirait tout simplement au composé carbonyle de départ. Il s'ensuit une déshydratation, puis la déprotonation de l'ion iminium intermédiaire.

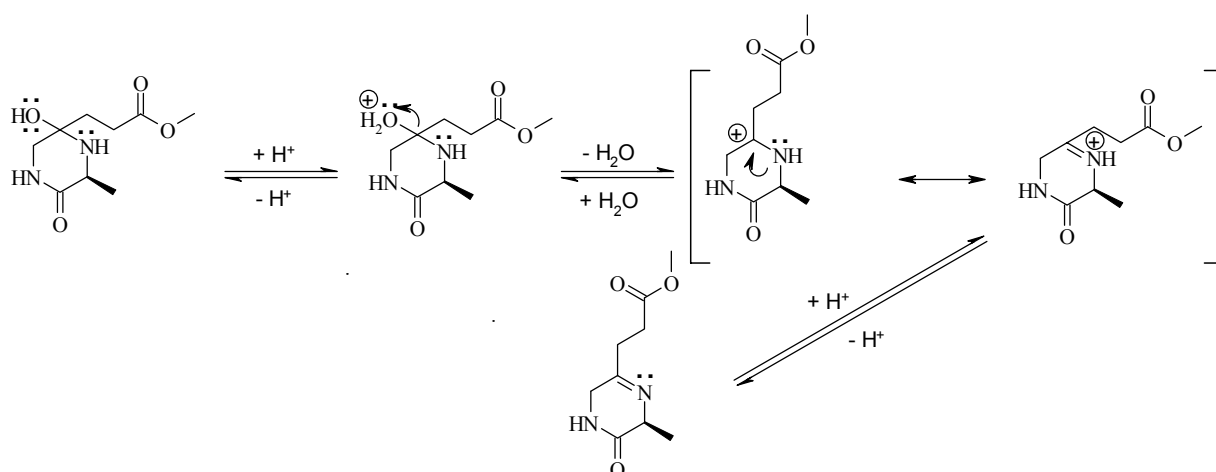


Figure 50 : Mécanisme de déshydratation d'un hémiacétal

Des réactions telles que la formation d'une imine à partir d'une amine primaire et d'un aldéhyde ou d'une cétone, lors desquelles deux molécules s'additionnent en éliminant de l'eau, sont appelées des condensations. La formation d'une imine est réversible de sorte que les mesures habituelles doivent être prises, afin de déplacer l'équilibre dans la direction voulue. Les imines peuvent exister sous forme d'isomères *Z* et *E*.

1.6.4.5 Production de PpIX à partir des dérivés synthétiques de ALA à base d'acide aminé

Avec les dérivés esters de ALA se sont les estérases qui permettaient d'obtenir ALA sous sa forme déprotégés. Cette approche a permis d'augmenter la production de PpIX, mais elle n'a pas permis de cibler des cellules spécifiques. Une nouvelle approche était donc nécessaire, afin de palier le manque de sélectivités de ALA et de ses dérivés esters. Au sein du laboratoire Dr Lucienne Juillerat, il avait été observé que certains types d'aminopeptidases étaient présents en quantité plus ou moins importante au sein des cellules cancéreuses ou de leur vascularisation (Figure 51). Dans une approche différente basée sur l'information préliminaire selon laquelle l'activité des aminopeptidases acides, basiques et neutres sont différemment exprimés dans les systèmes vasculaires des tumeurs par rapport à la vascularisation normale du même organe [188], nous avons synthétisé des substrats potentiels pour les aminopeptidases, afin de cibler les aminopeptidases neutre (APN/M), acide (APA) et basique (APB).

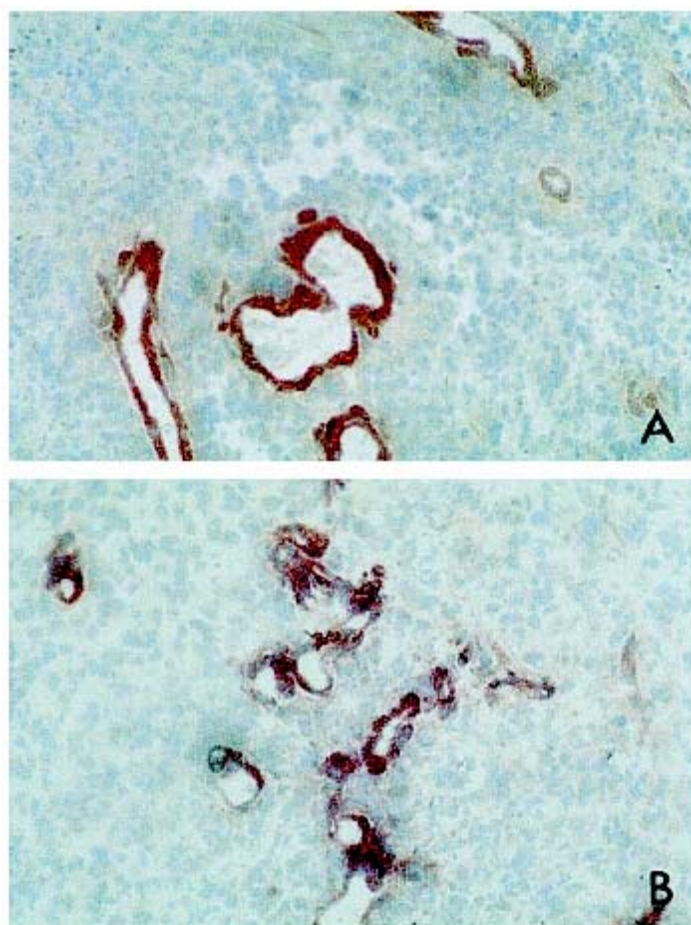


Figure 51 : Activité aminopeptidase A *in situ* (histoenzymographie) au sein de la vascularisation d'un glioblastome humain et de cellules EC219 intactes. (A) Glioblastome humain ; (B) Cellules EC219.

Afin de réaliser les tests *in vitro* avec nos substrats potentiels, il a fallu sélectionner trois lignées cellulaires surexprimant un des types d'aminopeptidases (Tableau 10). Notre choix c'est donc tourné vers les lignées cellulaires suivantes : EC219 pour APA, HCEC pour APB, et

A549 pour APN/M. Les activités des aminopeptidases qui a été déterminé par le Dr. Lucienne Juillerat ont été reporté dans le Tableau 10

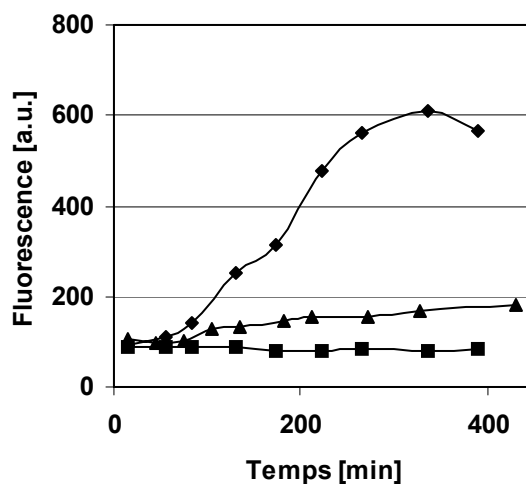
Lignées cellulaires	APA	APB	APN/M
	Glu-, Asp-X	Lys-, Arg-X	Phe, Ala-, Leu-X
A549	-	+	++
HCEC	+	++	+
EC219	++	+	+

Tableau 10 : Expression de l'activité des aminopeptidases (AP) A, B, et N/M au sein des lignées cellulaires endothéliales et tumorales. Les cellules sont mises en culture, afin d'obtenir une confluence, puis l'activité enzymatique est mesurée. Symboles : -, pas d'activité mesurable. +, faible activité enzymatique. ++, forte activité enzymatique. Cellules A549 Cellules de carcinome humaine du poumon. Cellules HCEC et EC219 d'origine endothéliale provenant de l'homme et du rat respectivement.

Dans le cas des aminopeptidases A, l'activité APA *in situ* a été mesurée sur les cellules, en utilisant comme substrat le Glu-4-méthoxy- β -naphtylamine, la même méthode a été utilisée pour mesurer l'activité N et B, en utilisant cette fois Ala-4-méthoxy- β -naphtylamine et Lys-4-méthoxy- β -naphtylamine. Ce réactif entraîne, après avoir été hydrolysé, la formation d'un précipité rouge en présence de réactifs de diazotation (Figure 51). Les résultats ont montré que l'APA est facilement accessible au sein des cellules EC219, et également au sein du système vasculaire des glioblastomes humains (Figure 51).

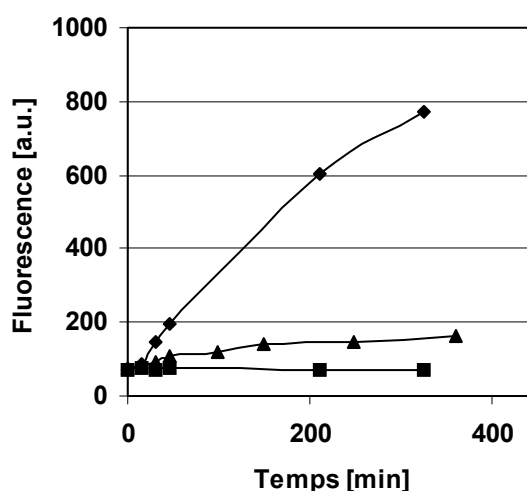
Nous avons préparé des substrats contenant ALA et un acide aminé acide de type neutre, basique ou acide, espérant ainsi pouvoir cibler les différents types d'aminopeptidase, en leur fournissant une prodrug qu'elles puissent déprotéger. Nous avons synthétisés et caractérisés des dérivés pseudo-peptidiques de ALA : à base d'acides aminés neutre (Ala et Phe) pour les APN/M à base d'acides aminés acide (Glu et Asp) pour les APA, et à base d'acides aminés basique (Lys et Arg) pour les APB.

Les mesures *in vitro* ont été fait avec les différents dérivés synthétisés en utilisant des cellules ayant été mises en culture jusqu'à l'obtention d'une mono couche confluente. En comparant les résultats obtenus en utilisant des concentrations similaires de nos différents composés, le meilleur précurseur est le dérivé de l'acide aminé aromatique neutre (H-Phe-ALA-OMe) **40** qui est un substrat pour les aminopeptidases du type APN/M. Et cela pour toutes les lignées de cellules testées quel que soit le niveau d'expression de cette activité enzymatique par les différentes lignées cellulaires (graphique 9-11). Les résultats montrent également que le dérivé contenant un acide aminé basique (H-Lys-ALA-OMe) **41** n'est pas un précurseur pour la production de PpIX quelle que soit la lignée de cellule testée, c'est à dire même les cellules que expriment une activité APB importante telle que HCEC, et quelle que soit la concentration de substrat utilisée (Graphique 9).

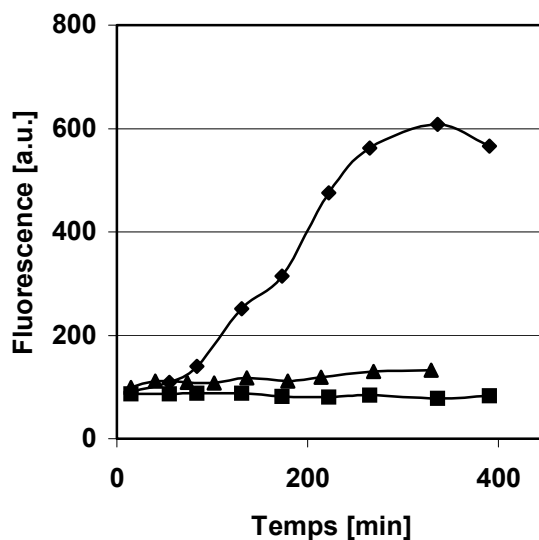


Graphique 9 : Production de la fluorescence induite par la PpIX, après l'exposition de cellules endothéliales humaines (HCEC) : ▲ Asp-ALA-OMe **42** [1.57 mM]; ■ Lys-ALA-OMe **41** [1.17 mM]; ◆ Phe-ALA-OMe **40** [1.43 mM].

Les dérivés acides comme (H-Asp-ALA-OMe) **42** sont des précurseurs faibles de PpIX dans les cellules exprimant APA (Graphique 9 et 11) telles que EC219 et HCEC, alors qu'aucune fluorescence n'a été obtenue dans les cellules A549 qui sont APA négatives (Graphique 11). Toutefois, dans les cellules EC219 exprimant une haute activité APA, la production de PpIX ne peut être observée qu'en utilisant des concentrations élevées de précurseurs qui vont jusqu'à 10 mM. Le ciblage des aminopeptidases A et B n'a pas fonctionné, la production de PpIX est faible voire carrément nul. On observe donc aucune corrélation entre les mesures de l'activité des aminopeptidases et la production de PpIX.

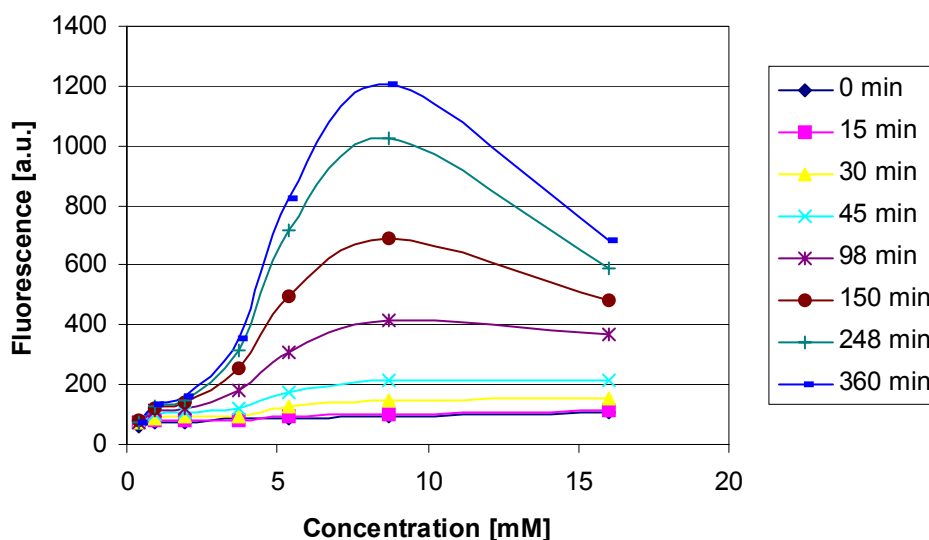


Graphique 10 : Production de la fluorescence induite par la PpIX, après l'exposition de cellules endothéliales de rats (EC219) : ▲ Asp-ALA-OMe **42** [1.88 mM]; ■ Lys-ALA-OMe **41** [1.61 mM]; ◆ Phe-ALA-OMe **40** [1.68 mM].



Graphique 11 : Production de la fluorescence induite par la PpIX, après l'exposition de cellules de carcinome humain (A549) : ▲ Asp-ALA-OMe 42 [1.88 mM]; ■ Lys-ALA-OMe 41 [1.61 mM]; ◆ Phe-ALA-OMe 40 [1.68 mM].

Avec le dérivé Asp-ALA-OMe, une courbe dose/réponse en fonction de la dose appliquée et du temps (Graphique 12) a été réalisé avec des concentrations importantes de précurseurs. Cela permet d'obtenir la concentration optimale du précurseur, cela permet également de déterminer l'efficacité du produit en tant que précurseur de PpIX.

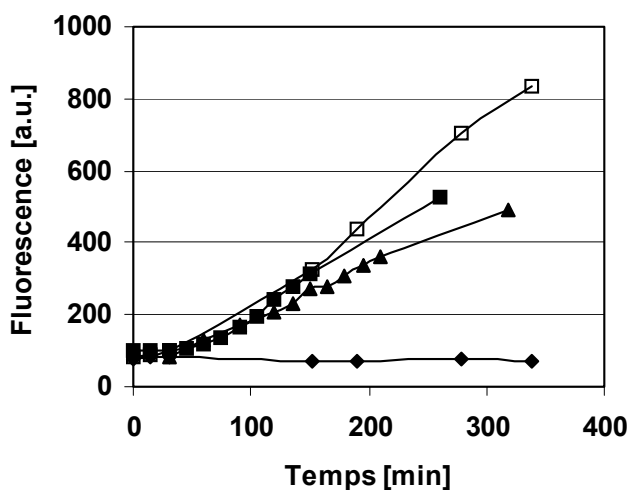


Graphique 12 : Production de la fluorescence induite par la PpIX, après l'exposition de cellules endothéliales de rats (EC219) à Asp-ALA-OMe 42. Les différentes courbes représentent la fluorescence mesurée à un temps précis en fonction de la concentration de Asp-ALA-OMe 42.

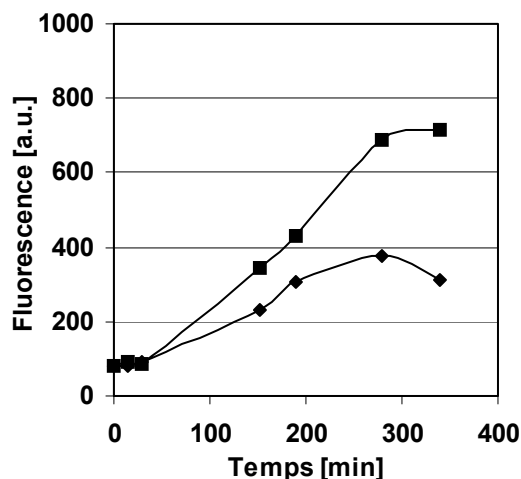
On observe une diminution de la fluorescence lorsque les concentrations dépassent une certaine limite, cette diminution est due à la cytotoxicité du produit qui induit la mort des

cellules. Cette observation avait déjà été faite lors des mesures effectuées sur les esters de ALA. Si l'on compare dans ce cas le résultat obtenu, la concentration optimale se trouve dans une zone proche de 8 mM. Si l'on compare ce résultat avec les concentrations optimums des esters, on arrive à des concentrations assez proches du dérivé cyclohexyle **10**. Toutefois, les maxima de fluorescence sont beaucoup plus faibles que ceux obtenus avec cet ester. Cela peut-être du à la différence de vitesse de déprotection des précurseurs ou au fait que les dérivés à base d'acides aminés ne sont pas transportés de la même manière que les esters de ALA.

La spécificité des dérivés d'ALA à base d'acides aminés aliphatiques neutres tels que Ala-ALA-OMe **35** et Phe-ALA-OMe **40** pour les aminopeptidases de type APN/M a été évaluée de façon plus approfondie, en utilisant les dérivés N-substitués Boc-Ala-ALA-OMe **16** et Boc-Ala-ALA **48** qui ne se sont pas révélés être de bons précurseurs de PpIX pour les enzymes. Les résultats ont montré, comme cela avait été supposé, que les produits protégés sur l'amine Boc-Ala-ALA-OMe **16** et Boc-Ala-ALA **48** (Graphique 13) ne sont pas des précurseurs de PpIX. Cette observation est en accord avec l'hypothèse qu'il faut nécessairement une activité de type APN/M pour que ALA puisse être libéré. Les dérivés Ala-ALA-OMe **35** et Ala-ALA-O(CH₂)₅Me **38** ont aussi été testés, afin de voir si en augmentant l'hydrophobicité des précurseurs, ils pénétraient plus facilement au sein des cellules. L'augmentation de l'hydrophobicité (Ala-ALA-OMe **35** contre Ala-ALA-O(CH₂)₅Me **38**) a entraîné une production plus importante de PpIX. La comparaison de la production de PpIX entre Ala-ALA **36** et Ala-ALA-O(CH₂)₅Me **38** (Graphique 13) avec ALA **7** et ALA-O(CH₂)₅Me **9** (Graphique 13) a démontré un comportement semblable des deux groupes. Ces résultats suggèrent un mécanisme similaire pour l'assimilation des précurseurs par la cellule.



Graphique 13 : Production de la fluorescence induite par la PpIX, après l'exposition de cellules de carcinome humain (A549) aux esters de Ala-ALA avec N- et C-bloqués: ◆ Boc-Ala-ALA **48** [10.9 mM]; ■ Ala-ALA **36** [11.1 mM]; ▲ Ala-ALA-OMe **35** [11.4 mM]; □ Ala-ALA-O(CH₂)₅Me **38** [1.9 mM].



Graphique 14 : Production de la fluorescence induite par la PpIX, après l'exposition de cellules de carcinome humain (A549) à : ♦ ALA 7 [3.9 mM]; ■ ALA-O(CH₂)₅Me 9 [39.8 μM].

1.6.4.6 Discussion des résultats obtenus à partir des dérivés synthétiques de ALA à base d'acide aminés

Une comparaison de la production de PpIX obtenue avec les lignées cellulaires de phénotype endothéliales et du type carcinome, exprimant des niveaux plus ou moins importants des trois types d'aminopeptidase (APA, APB, APN/M). Les substrats pour les aminopeptidases, en particulier APN/M ont démontré un potentiel permettant d'obtenir de la PpIX depuis ce type de prodrugs avec une certaine sélectivité.

L'utilisation des dérivés d'ALA à base d'acides aminés n'avait pas encore été tentée précédemment dans la mesure de nos connaissances. Les substrats pour les aminopeptidases basiques tels que Boc-[Lys(Boc)-ALA]-OMe **20**, Boc-[Arg(Boc)₂-ALA]-OMe **21**, Lys-ALA-OMe **41** ne se sont pas révélés comme étant des précurseurs pour la production de PpIX, même dans le cadre des cellules exprimant une activité APB importante, alors que les précurseurs pour les aminopeptidases acides ont induit une production de PpIX uniquement avec les lignées cellulaires exprimant une activité APA. Cependant, lors des mesures avec les dérivés contenant des acides aminés de type acide, il a fallu utiliser des concentrations importantes de ces prodrugs, afin d'obtenir des concentrations intracellulaires de PpIX qui puissent être mesurées et utilisées pour la PDT. Les caractéristiques cinétiques de l'hydrolyse de Lys-ALA-OMe **41** ou Asp-ALA-OMe **42** par les aminopeptidases cellulaires, ainsi que les mécanismes d'assimilation cellulaire n'ont pas été déterminés. Par conséquent, nous ne pouvons pas, avec les expériences présentes, déterminer si ce manque de productivité de PpIX est dû à une cinétique d'hydrolyse défavorable, à une faible pénétration au sein des cellules ou encore à un transport du dérivé dans un compartiment cellulaire autre que le cytoplasme, où se trouve *ALA déhydratase* nécessaire à la première étape biosynthèse de la PpIX.

En utilisant des substrats ciblant l'activité APN/M, tels que Ala-ALA **36**, Ala-ALA-OMe **35** et Phe-ALA-OMe **40**, nous avons obtenu des rendements nettement plus élevés de PpIX que lors des mesures avec les autres substrats. Ce type d'enzymes est localisé sur la surface de la cellule, ainsi qu'au sein du cytoplasme. La production de PpIX à partir de Ala-ALA **36**, Ala-ALA-OMe **35** et Ala-ALA-O(CH₂)₅Me **38** a été comparé avec la production de PpIX obtenue

à partir de ALA **7**, ALA-OMe **8** et ALA-O(CH₂)₅Me **9**, suggérant par là que le caractère lipophile des prodrugs comportant des acides aminés neutres facilite leur pénétration au sein des cellules et que les dérivés de ALA et les peptides courts ou les acides aminés utilisent certainement un système de transport commun.

Cependant, notre approche ne permet pas de faire une différence formelle entre les différentes possibilités qui sont :

- 1) Ala-ALA ou ses esters sont tout d'abord hydrolysés à la surface de la cellule et ensuite ALA ou ses esters sont internalisés au sein de la cellule.
- 2) L'hydrolyse a lieu de façon intracellulaire, après que le dérivé d'ALA à base d'acides aminés ait été transporté au sein de la cellule.

Le mécanisme de l'entrée d'ALA ou de ses dérivés exogènes au sein des cellules n'a pas encore pu être déterminé. L'absorption de ALA par les cellules a cependant pu être inhibée par des acides aminés [189], des peptides [190] ou encore des modulateurs de (co)transporteurs de ions [172;190;191] suggérant par là la participation d'un (co) transport d'acides aminés ou de peptide. Dans les cellules de mammifère transfectées par des transporteurs de dipeptides, on observe que ALA est transportée par des mécanismes de (co)transport cation/ALA [172;190]. Ce mécanisme de transport peut être saturé et est également dépendant du pH. Les di- et tripeptides, ainsi que le sérum rentrent en compétition dans le cadre de ce transport. Par contre les acides aminés tels que Glu ou GABA [192], ne sont pas des compétiteurs. Cette observation indique que le système de transport des acides aminés impliqués ne transporte pas les analogues d'acides aminés basiques et acides. Cette information peut expliquer la faible efficacité des dérivés acides et basiques de ALA comme précurseurs de PpIX, suggérant que l'hydrolyse des dérivés de ALA à base d'acides aminés sont dégradés de façon intracellulaire par les aminopeptidases, principalement les dérivés neutres, après leur entrée dans la cellule. Comme l'activité APA a été principalement décrite comme étant un ectoenzyme cela peut aussi expliquer la faible efficacité de ses dérivés pour la production de PpIX.

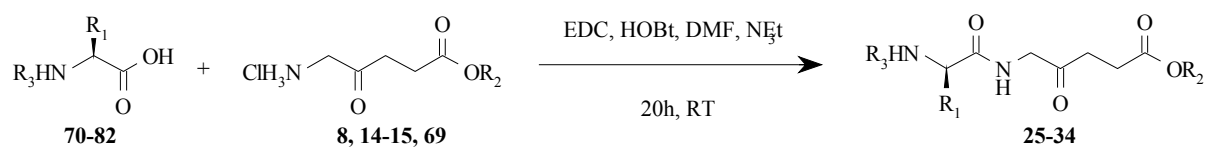
En conclusion, l'utilisation de dérivés à base d'acides aminés a permis de montrer qu'il était possible d'obtenir de la fluorescence avec certains de ces produits. Leur utilisation est cependant limitée par deux facteurs :

- L'instabilité de ces produits est un désavantage en vue de leur utilisation lors de traitements médicaux. Par contre, ce problème n'a pas empêché de réaliser les mesures, car la dégradation en milieu aqueux est suffisamment lente, pour permettre de mesurer la fluorescence.
- La sélectivité de ces produits n'a pas été aussi bonne qu'espérée. En effet, sur les trois types de dérivés seuls les produits visant les APN/M ont produit une fluorescence suffisante permettant d'envisager leur utilisation en PDT, malheureusement, ils n'ont pas montré une sélectivité envers les lignées cellulaires.

Toutefois ces premiers résultats sont encourageants, car ils ont montré qu'il était possible d'utiliser des dérivés contenant des acides aminés. La prochaine étape va consister à trouver des dérivés de ce type ne présentant plus de problèmes de stabilité et montrant une meilleure sélectivité envers les lignées cellulaires.

1.6.4.7 Synthèse de la deuxième génération de dérivés peptidiques : dipeptides de ALA

Une deuxième génération de dérivés peptidiques a été synthétisée [186], par couplage de courts peptides de deux ou trois acides aminés protégé par le groupe Boc, disponibles commercialement avec l'ester de ALA correspondant. La réaction a lieu dans le DMF, en présence de HOBt (1-hydroxybenzotriazole) et avec l'EDC (N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride) comme réactif de couplage. Après extraction, purification sur colonne lorsque la solubilité du produit le permet et recristallisation, le produit obtenu, dans la plupart des cas solide, est entièrement caractérisé par spectroscopie. Les rendements obtenus sont rassemblés dans le Tableau 11.



Produit	R ₁	R ₂	R ₃	Rendement
25	H	Et	Boc-Gly	80 %
26	(CH ₂) ₃ -N _(azote de l'aa)	Et	Boc-Gly	80 %
27	H	Me	Boc-Gly-Gly	80 %
28	CH ₂ C ₆ H ₅	Me	Z	72 %
29	CH ₂ COOBzl	Me	Z	71 %
30	CH ₂ COO ^t Bu	Me	Z	70 %
31	H	Me	Z-Gly	65 %
32	H	DEG	Boc-Gly	25 %
33	H	TEG	Boc-Gly	25 %
34	CH ₂ C ₆ H ₅	Ala-OMe	Boc	55 %
65	H	Me	Boc-Gly	83 %

Tableau 11 : Récapitulation des rendements des différents couplages peptidiques

Lors de la synthèse de cette série de composés, le problème principal qui a été rencontré est le manque de solubilité de ces dérivés. Cette particularité a entraîné des complications lors de la purification de ces produits. Il a donc fallu changer les mélanges utilisés lors des chromatographies, et ainsi employer le mélange dichlorométhane/méthanol à la place du mélange acétate d'éthyle/hexane. Dans le cas du produit Boc-Gly-Gly-Gly-ALA-OMe **27** il a fallu utiliser des quantités importantes de méthanol. La série de dérivés protégés par le groupe Z a été synthétisée, afin de déterminer si on pouvait envisager son utilisation lors de la synthèse de dérivés peptidiques contenant ALA. Leur synthèse ne pose aucun problème et les produits obtenus sont stables. Par contre, lors du couplage de Z-Gly-Gly avec ALA des problèmes de solubilité sont également observés.

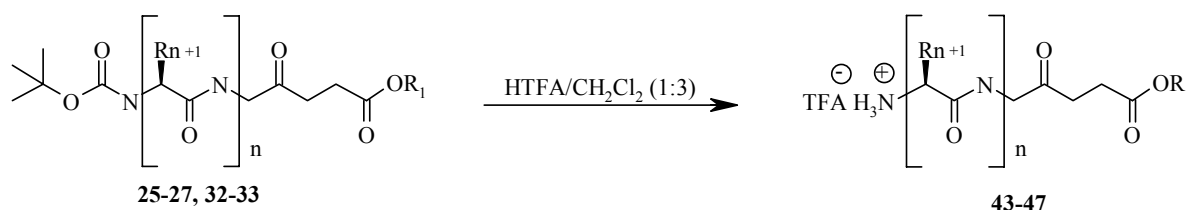
Le composé **34** est particulier, parce que ALA est incorporé au centre de la chaîne peptidique. Pour sa synthèse, la première étape a consisté à synthétiser le composé Boc-Phe-ALA-OMe **17**, ce produit a ensuite été déprotégé au niveau du méthyle ester en présence de PLE. **17** s'est

révélé être un mauvais substrat pour l'estérase. En effet, la réaction s'est déroulée sur sept jours, alors que la déprotection de Boc-Ala-ALA-OMe **16** s'effectue en moins de 48 heures. Ce problème est sans doute dû à la présence du phényle qui rend la molécule plus lipophile, ce qui doit défavoriser l'accès du substrat au site actif de l'enzyme. Ce problème pourrait être contourné en employant un autre enzyme plus favorable pour ce substrat. La dernière étape a consisté en une condensation de Boc-Phe-ALA-OH **49** avec Ala-OMe **86**, les conditions employées pour cette réaction sont les mêmes que pour les autres couplages peptidiques.

1.6.5 Déprotection de la deuxième génération de dérivés peptidiques

1.6.5.1 Déprotection du groupe protecteur Boc par acidolyse

La déprotection de l'amine [186] a été accomplie par acidolyse. L'élimination du groupe Boc a lieu par traitement du produit **16-24** avec une solution d'acide trifluoroacétique dans du dichlorométhane (1:1). Le solvant est éliminé à température ambiante et le résidu pâteux est entièrement caractérisé par spectroscopie. Tous ces produits sont conservés à l'abri de la lumière à un maximum de 4 °C. Les rendements obtenus sont rassemblés dans le Tableau 12.



Composé	n	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Rendement
43	2	Et	H	H	-	84 %
44	2	Et	H	(CH ₂) ₃ -N _(azote de l'aa)	-	quantitatif
45	2	DEG	H	H	-	quantitatif
46	2	TEG	H	H	-	quantitatif
47	3	Me	H	H	H	quantitatif

Tableau 12 : Récapitulation des rendements de déprotection par TFA

La monodéprotection du groupe Boc, en utilisant l'acide trifluoroacétique permet d'obtenir les di- et tripeptides monodéprotégés **43-47** sous forme de sel de trifluoroacétate. Les rendements sont quantitatifs et bons lorsque le produit est recristallisé. Lorsqu'ils sont stockés pour de longues périodes, ils sont conservés à 4 °C et sous argon. Comme les études préliminaires l'ont montré, la présence d'un ester sur la fonction carboxylate de ALA à la fin des molécules ne pose pas de problème pour la biosynthèse de la PpIX. Par conséquent, nous avons laissé l'ester intact, afin de réaliser les mesures de fluorescence.

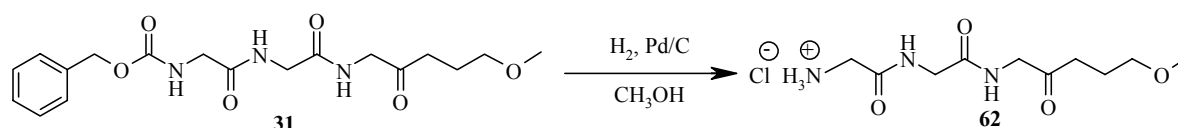
Les dérivés dipeptidiques de ALA ont montré une plus grande stabilité que les dérivés composés d'un seul acide aminé qui avait été synthétisé précédemment [158]. Nous avons attribué cet accroissement de stabilité des dérivés di- et tripeptides au fait que la distance entre l'amine terminale et la fonction cétone du dérivé de ALA est plus grande que dans le cas d'un

seul acide aminé. Afin d'expliquer ce phénomène, nous avons supposé qu'il y a formation intramoléculaire d'une base de Schiff entre l'amine terminale et la fonction cétone et que cette réaction joue un rôle majeur dans la dégradation de nos dérivés de ALA. Lors de la déprotection contenant un seul acide aminé, la formation de la base de Schiff conduira à la formation d'un cycle à six qui est thermodynamiquement stable. Dans le cas d'un dérivé dipeptidique, c'est un cycle à neuf unités qui serait formé, ce qui est une configuration moins favorable.

1.6.5.1.1 Déprotection du groupe protecteur Z par hydrogénolyse

Le composé protégé par Z est ajouté au méthanol dans un hydrogénateur en verre de 200 ml. La réaction a lieu en quatre heures sous 4 bars d'hydrogène et en présence de HCl et de palladium sur charbon actif. La réaction est filtrée sur célite[®], afin d'éliminer le catalyseur. Après élimination du solvant, le résidu obtenu est recristallisé.

Rendement : 120 mg (80 %).



Cette réaction [186] fonctionne très bien dans le cas d'un dérivé peptidique, car le produit déprotégé est stable. Par contre, dans le cas des dérivés avec un seul acide aminé, il est impossible d'obtenir le produit déprotégé de cette façon, car le produit se dégrade au fur et à mesure de sa déprotection. Par conséquent l'emploi du groupe Z (CbZ) est tout à fait envisageable, lors de la synthèse de dérivés contenant plus d'un acide aminé. Cela pourrait donc être une alternative intéressante lorsque Boc ne peut pas être utilisé.

Le groupe Z peut être éliminé de deux façons différentes, la première déprotection du groupe amino peut se faire par hydrogénolyse par voie catalytique (Figure 52) selon une réaction qui implique la rupture de la liaison carbone benzylique-oxygène, qui fournit d'abord un acide carbamique en guise d'intermédiaire réactionnel. Les acides carbamiques sont instables et se décomposent en l'amine correspondante, avec un dégagement de dioxyde de carbone. La décarboxylation instantanée de celui-ci régénère immédiatement la fonction amino.

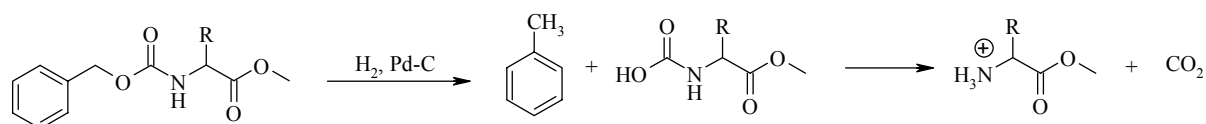


Figure 52 : Déprotection du groupe Z par hydrogénolyse catalytique

Il est également possible d'éliminer le groupe Z d'une autre façon que par réduction. En effet il est possible de déprotéger le groupe amino par traitement par des acides forts dans un milieu anhydre. L'acide hydrobromique dans de l'acide acétique glacial semble être le mélange le plus efficace pour cette opération. Il faut souligner que cette méthode est en fait

une acidolyse et non pas une hydrolyse. Rompre la liaison ester des uréthanes exige la présence d'un groupe qui va permettre d'obtenir des carbocations stables (Figure 53).

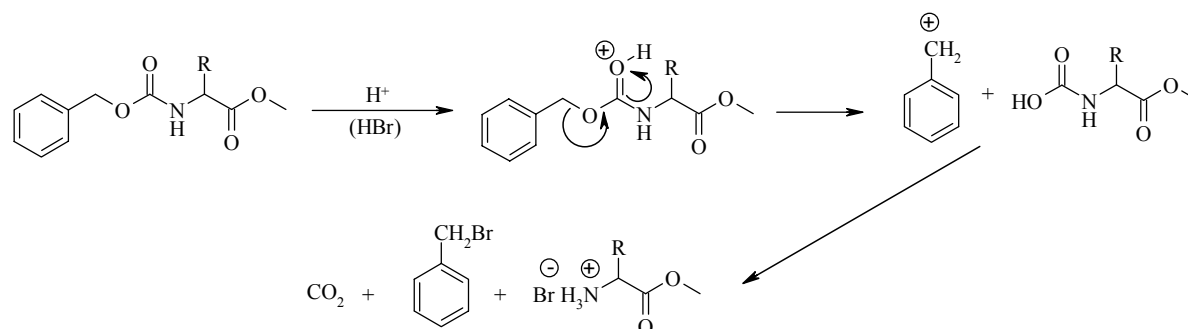


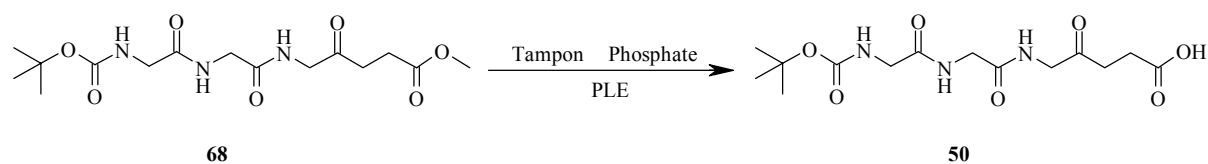
Figure 53 : Déprotection du groupe Z par acidolyse

La déprotection est induite par la protonation du carbonate. L'hétérolyse de la liaison benzylique engendre la formation du benzyle cation stabilisé. En absence d'eau aucune hydrolyse de liaisons peptidiques n'a été observée. Toutefois si la déprotection en milieu acide est envisagée, il vaut mieux employer le groupe Boc qui permet une déprotection dans des conditions plus douces.

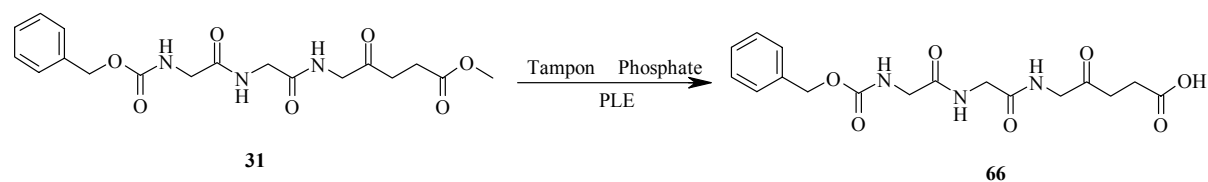
1.6.5.1.2 Hydrolyse du méthyle ester en présence de PLE

Le méthylester est facilement éliminé en utilisant une estérase tel que l'*estersase de foie de porc*. Le produit est traité avec la PLE [187] dans une solution tampon de phosphate. La libération de l'acide est suivie par titration au pH-stat (pH = 8.0) à l'aide d'une solution NaOH 0.1N. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante jusqu'au terme de la réaction. Après purification le produit est entièrement caractérisé par spectroscopie.

Rendement : 82%



Rendement : 83%



Cette réaction permet de libérer la fonction acide du dérivé, elle ne pose aucun problème, mais elle se déroule sur une longue période. Le remplacement du groupe Boc par le groupe Z est possible et n'entraîne pas de problème lors de la déprotection. Une alternative permettant

d'arriver au même résultat est de remplacer le méthyle ester par un benzyle ester. La déprotection qui se fait par hydrogénation est beaucoup plus rapide (4 heures), permet d'éviter l'utilisation de l'eau et donne de bons résultats. Cette alternative présente donc de nombreux avantages par rapport à la déprotection enzymatique (Tableau 13) :

	Méthyle ester	Benzyle ester
Réactifs	PLE	Pd/C, H ₂ bar
Solvant	Eau (tampon phosphate)	Méthanol
Durée	2-5 jours	4 heures
Température	Température ambiante	Température ambiante

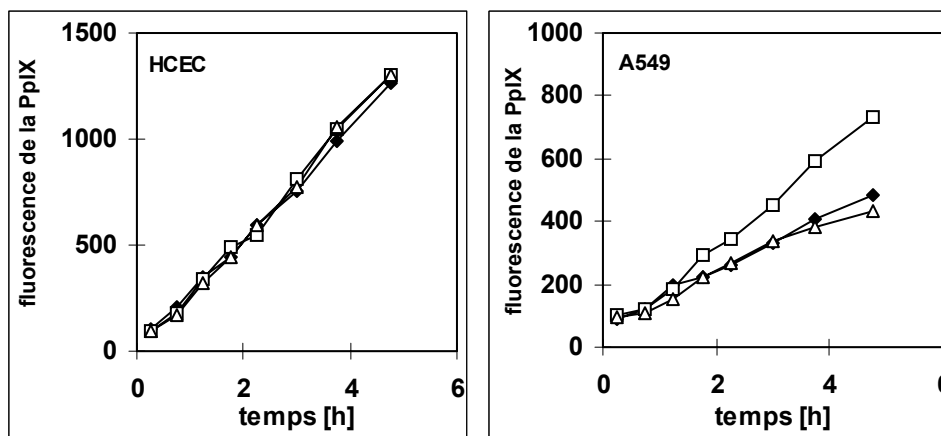
Tableau 13 : Comparaison entre la déprotection du méthyle et la déprotection du benzyle ester

1.6.5.2 Production de PpIX à partir des dérivés synthétiques de ALA de deuxième génération

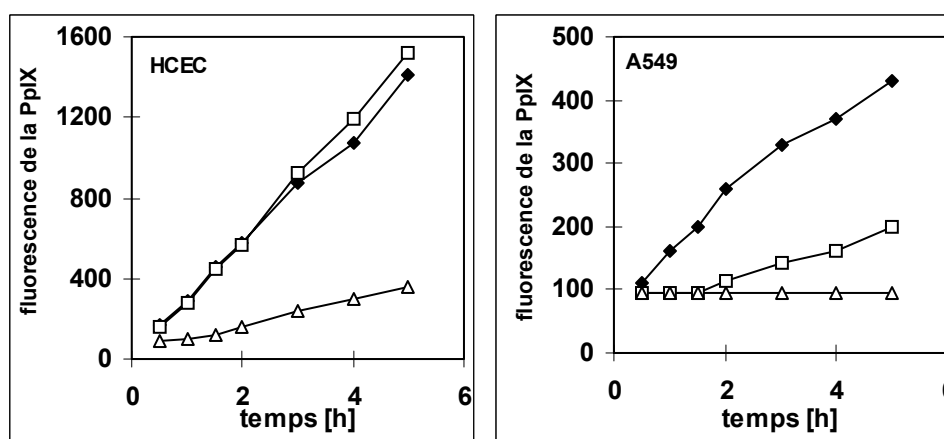
Afin de déterminer l'efficacité de ces produits en PDT, la production de PpIX à partir des dérivés dipeptidiques a été évaluée en utilisant deux lignées cellulaires :

- des cellules endothéliales de carcinome humain (HCEC)
- des cellules pulmonaires de carcinome humain (A549).

Pour ces mesures, les cellules ont été mises en culture jusqu'à l'obtention d'une mono couche confluente, elles ont été ensuite exposées à des concentrations croissantes de dérivés dipeptidiques de ALA. ALA a été utilisé comme standard et la fluorescence induite par la production de PpIX a été mesurée à des intervalles réguliers. Les tests se sont tout d'abord concentrés sur les dérivés censés être des substrats pour les peptidases spécifiques proline (Pro), c'est à dire le dérivé Gly-Pro-ALA-OEt **44** pour l'activité de la *dipeptidyl-aminopeptidase IV* (DPPIV)/CD26 et le peptide bloqué sur la position N-terminale par le groupe Boc Boc-Gly-Pro-ALA-OEt **26** pour les *prolyloligopeptidases* (Graphique 15). Les résultats ont montré que ces dérivés peptidiques de ALA sont des précurseurs efficaces de PpIX dans les cellules humaines. Dans un second temps, l'effet du remplacement de l'acide aminé Pro par Gly, qui a amené à la synthèse de **25** et **43**, a été évalué (Graphique 16). Les résultats ont suggéré qu'une certaine sélectivité pour les cellules endothéliales par rapport aux cellules tumorales peut être obtenue en utilisant les substrats potentiels pour DPPIV et *prolyloligopeptidase(s)* (Graphique 15). Contre toute attente Boc-(Gly)₂-ALA-OEt **43** s'est montré très sélectif (Graphique 17) pour les cellules endothéliales HCEC face aux cellules pulmonaires humaines A549. Les esters méthyle **62** et éthyle **43** des dérivés contenant la séquence Gly-Gly sont des précurseurs équivalents de PpIX. Le tripeptide bloqué sur le N-terminal par le groupe Boc Boc-(Gly)₃-OMe **27** ou encore le dérivé Z-(Gly)₂-ALA-OMe **31** ne sont pas ou sont seulement des précurseurs très faibles de PpIX.



Graphique 15: Production de PpIX par les cellules endothéliales humaines (HCEC) et par des cellules pulmonaires humaines (A549). ◆ ALA [4.0mM]. □ Boc-Gly-Pro-ALA-OEt [1.9mM]. △ Gly-Pro-ALA-OEt [3.2 mM].

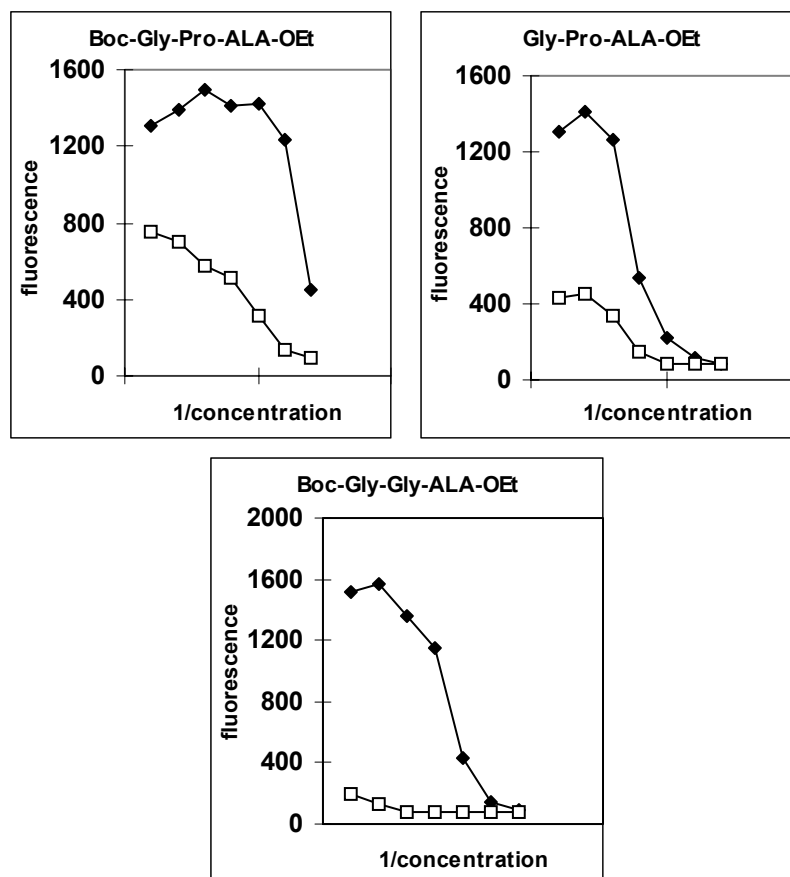


Graphique 16: Production de PpIX par les cellules endothéliales humaines (HCEC) et par des cellules pulmonaires humaines (A549). ◆ ALA [4.0mM]. □ Boc-Gly-Pro-ALA-OEt [2.6mM]. △ Gly-Pro-ALA-OEt [3.3 mM].

La cytotoxicité en absence de lumière supplémentaire de ces dérivés a été déterminée en comparant la fluorescence de la PpIX à 300 minutes avec la survie des cellules (évaluation par MTT) après 20 heures d'exposition aux concentrations de ces composés produisant le plus haut niveau de PpIX [158]. Ces quatre dipeptides de ALA **25**, **26**, **43** et **44** n'ont pas révélé de cytotoxicité particulière et cela quelque soit la concentration du dérivé utilisé. Les produits ont également été testés sur d'autres lignées cellulaires telles que : MCF-7 et T47D (carcinome du sein humain), HT29 et SW480 (carcinome du colon humain). Les cellules de carcinome humain du colon et du sein ont produit de la PpIX à partir de ces précurseurs, avec une certaine sélectivité pour un des dérivés en particulier (Graphique 18). Cette sélectivité observée pour certaines cellules peut résulter :

- soit de l'expression d'un enzyme spécifique, opérant lors de l'hydrolyse du prodrug de ALA avant internalisation cellulaire.

- soit de l'expression d'un système spécifique de transport au travers de la membrane avant une étape d'hydrolyse intracellulaire, relâchant ALA.

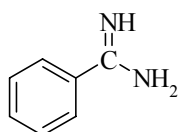


Graphique 17 : Boc-(Gly)₂-ALA-Oet [0.02-2.6mM] montre une certaine sélectivité envers les cellules endothéliales humaines (HCEC) ◆, par rapport aux cellules pulmonaires humaines (A549) □, lors de la production de PpIX. Alors que cette sélectivité n'apparaît pas avec Boc-Gly-Pro-ALA-OEt [0.02-2.6mM] ou Gly-Pro-ALA-OEt [0.02-2.6mM].

Dans un premier temps, afin d'obtenir des informations concernant les activités enzymatiques impliquées dans le relâchement de ALA à partir de ses précurseurs, nous avons évalué la production de PpIX en présence d'inhibiteurs spécifiques pour certaines classes de protéases (inhibiteur pour Ser-, CySH- et metallo-protéase) (Graphique 19). Pour ces mesures, les cellules ont été mises en culture jusqu'à l'obtention d'une mono couche confluente, l'inhibiteur de protéases a été ajouté avant les dérivés dipeptidiques. La fluorescence induite par la production de PpIX a été mesurée à des intervalles réguliers. La production de PpIX à partir de Gly-Pro-ALA-OEt **44** a été inhibée par les inhibiteurs de Ser-protéase, suggérant ainsi l'implication de la Ser-protéase DPPIX lors de l'hydrolyse du dérivé. L'activité enzymatique permettant l'hydrolyse de Boc-(Gly)₂-ALA-OEt **25** dépend aussi de la famille des Ser-protéases. La protéase permettant l'hydrolyse de (Gly)₂-ALA-OEt **43** a été inhibée quand à elle par les inhibiteurs des métalloprotéases. Cette première évaluation a été affinée en utilisant une autre série d'inhibiteurs spécifiques pour les protéases, tels que benzamidine, leupeptin, aprotinin, E64 ou chymostatin dans les cellules HCEC, cette nouvelle série de mesures a permis de confirmer ces résultats.

Aprotinin :

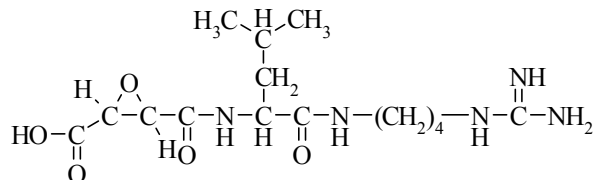
H-Arg-Pro-Asp-Phe-Cys-Leu-Glu-Pro-Pro-Tyr-Thr-Gly-Pro-Cys-Lys-Ala-Arg-Ile-Ile-Arg-Tyr-Phe-Tyr-Asn-Ala-Lys-Ala-Gly-Leu-Cys-Gln-Thr-Phe-Val-Tyr-Gly-Gly-Cys-Arg-Ala-Lys-Arg-Asn-Asn-Phe-Lys-Ser-Ala-Glu-Asp-Cys-Met-Arg-Thr-Cys-Gly-Gly-Ala-OH
(Ponts disulfide entre Cys⁵ et Cys⁵⁵/Cys¹⁴ et Cys³⁸/Cys³⁰ et Cys⁵¹)

Benzamidine :**Chymostatin :**

[(S)-1-Carboxy-2-phenylethyl]-carbamoyl- α -[2-amidohexahydro-4(S)-pyrimidyl]-(S)-glycyl-[A = Leu; B = Val; ou C = Ile]-phenylalaninal

E64 :

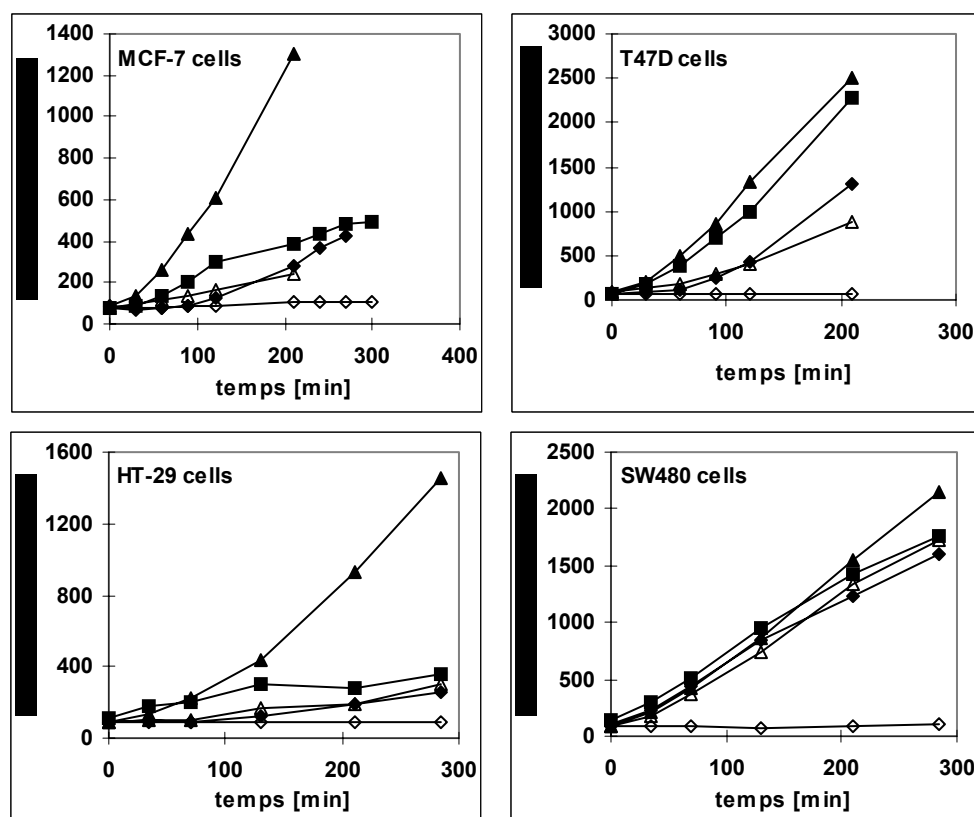
L-trans-3-carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine

**Leupeptin :**

Ac-Leu-Leu-Arg-aldéhyde•hémisulfate
C₂₀H₃₈N₆O₄ . 1/2H₂SO₄

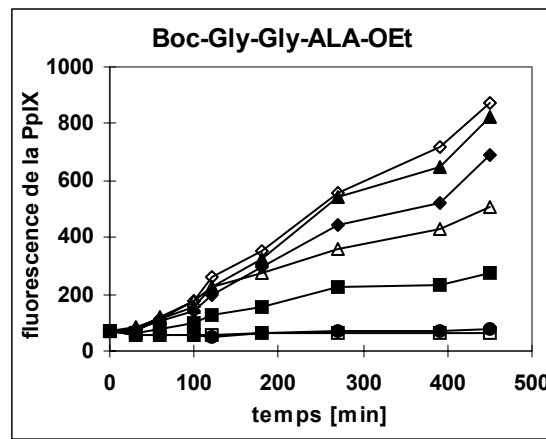
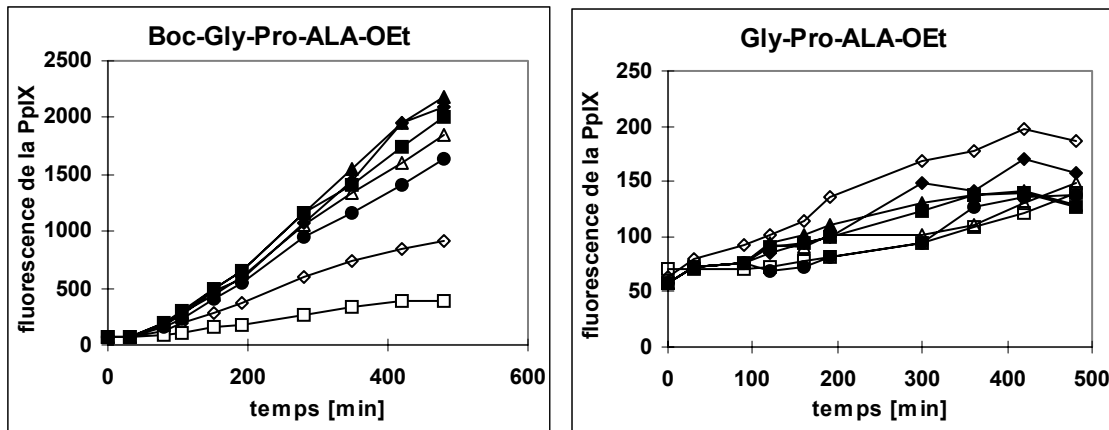
L'étape d'hydrolyse du précurseur peut donc avoir lieu soit :

- de façon extracellulaire, suivie par l'absorption de ALA libre par la cellule.
- dans le cytoplasme, après que précurseur non hydrolysé ait été transporté par un transporteur sélectif.

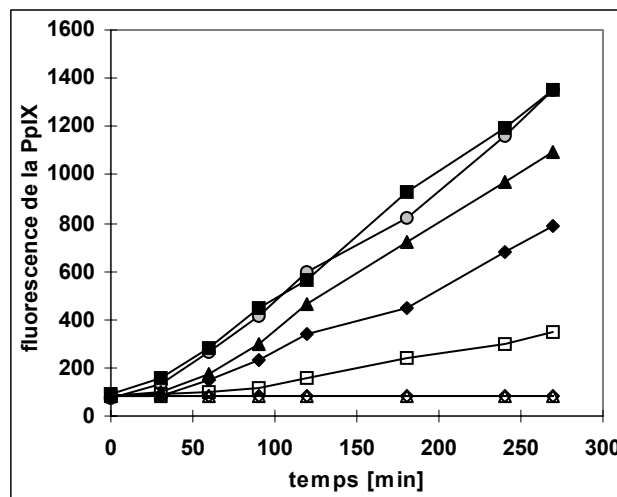


Graphique 18: Mesure de la production de PpIX sur des cellules humaines de carcinome du sein (MCF-7, T47D) et sur des cellules humaines de carcinome du colon. Pour les cellules MCF-7 et T47D : ■ ALA [0.7mM], ◆ Boc-Gly-Pro-ALA-OEt [0.9mM], ◇ Gly-Pro-ALA-OEt [0.8mM], ▲ Boc-(Gly)₂-ALA-OEt [0.6mM], △ (Gly)₂-ALA-OEt [0.8mM]. Pour les cellules HT-29 et SW480 : ■ ALA [4mM], ◆ Boc-Gly-Pro-ALA-OEt [1.9mM], ◇ Gly-Pro-ALA-OEt [1.6mM], ▲ Boc-(Gly)₂-ALA-OEt [1.4mM], △ (Gly)₂-ALA-OEt [1.7mM].

Afin de distinguer entre ces deux possibilités, nous avons préparé les dérivés esters à base de diéthylène glycol et triéthylène glycol **32**, **33**, **45** et **46**. Puisque nous avons montré précédemment [158] que la production cellulaire de PpIX est nettement améliorée lors de l'emploi des esters éthylène glycol de ALA, grâce une assimilation cellulaire plus importante du dérivé. Par conséquent, si l'hydrolyse du prodrug a lieu à la surface de la cellule, cela entraînerait une augmentation de la production de PpIX, puisque le produit libéré est internalisé par la cellule plus rapidement que ALA-OEt. Alors que dans la cas où l'hydrolyse aurait lieu dans le cytoplasme, après que le dérivé ait été transporté intact, la production de PpIX serait dépendante du taux limite d'entrée dans la cellule du dérivé de ALA. Les mesures ont montré que ces dérivés ne sont pas, ou sont seulement, de faibles précurseurs de PpIX (Graphique 20). Cette observation peut indiquer que le précurseur resté intact est absorbé par la cellule, et que seulement ensuite ALA est relâché sous forme libre dans le cytoplasme par des Ser-protéase(s). Cette information indique aussi qu'une partie de la sélectivité de la cellule, pour ces molécules, est par conséquent due aux transporteurs membranaires.



Graphique 19 : Mesure de la production de PpIX sur des cellules endothéliales humaines (HCEC) en présence d'inhibiteurs spécifiques à certaines classes de protéases. ◇ Sans inhibiteur, □ Cocktail d'inhibiteurs de protéases [1:250], △ BB2116 [4µM], ▲ aprotinine A [20µM], ◆ aprotinine B [20µM], * AEBSF [200µM], ■ bestatine [20µM].



Graphique 20 : Mesure de la production de PpIX sur des cellules endothéliales humaines (HCEC), exposées aux dérivés esters di- et tri-éthylène glycol de Boc-(Gly)₂-ALA ou (Gly)₂-ALA. ◇ ALA [2mM], ■ Boc-(Gly)₂-ALA-OEt [2.6mM], ▲ Boc-(Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₂Me [2.2mM], ◆ Boc-(Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₃Me [1.8mM], □ (Gly)₂-ALA-OEt [3.3mM], △ (Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₂Me [2.6mM], ◇ (Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₃Me [2.4mM].

1.6.5.3 Discussions des résultats obtenus à partir des dérivés synthétiques de ALA de deuxième génération

L'adressage de traitements cancéreux à des cellules spécifiques incluant les photosensibilisateurs pour la PDT permet de minimiser les effets secondaires des médicaments cytostatiques et cytotoxiques. Les précurseurs des photosensibilisateurs, tel que ALA et ses dérivés chimiques doivent être en premier lieu internalisés par les cellules ciblées, avant d'être transformés en molécule active, dans ce cas, en PpIX qui est la molécule photosensibilisatrice se trouvant dans la mitochondrie. Ce processus est dépendant de la présence sur les cellules cibles du système de transport nécessaire afin d'amener ALA dans le cytoplasme, mais également de la présence des enzymes capables de relâcher ALA au sein du cytoplasme à partir de son prodrug, afin qu'il puisse être employé lors de la biosynthèse de l'hème.

Pour ALA, le mécanisme d'absorption et le système de transport ne sont pas encore clairement définis. Cependant, il semble que les systèmes de transport des acides aminés et des peptides, les transporteurs des acides β -aminés, PEPT1, PEPT2, et les transporteurs basolatéraux de di- et tri-peptides, sont impliqués au niveau de la membrane cellulaire. Ces systèmes sont capables de transporter GABA et ils sont modulés par Gly et ses analogues [190;193-196]. Cependant le transport est lent et de faible capacité ($K_m=2-10\text{mM}$) [194;195].

Nous avons montré précédemment la possibilité d'utiliser des dérivés esters de ALA, ainsi que des dérivés à base d'acides aminés comme substrats pour les estérases et les aminopeptidases des cellules, respectivement, [150;197], en tant que précurseurs de PpIX. Cependant, lors de l'utilisation de ces molécules, aucune sélectivité probante n'avait été obtenue et la cytotoxicité en l'absence de lumière n'était pas négligeable, suggérant ainsi que la toxicité systémique engendrée par ces dérivés pourrait être un problème. Notre but a été par conséquent de modifier ALA, afin de :

- réduire la cytotoxicité des dérivés.
- adresser de façon spécifique ALA aux cellules endothéliales associées aux tumeurs ou aux cellules tumorales.

Afin de développer une séquence peptidique plus sélective pour un type cellulaire, nous nous sommes dirigés vers des dérivés peptidiques de ALA plus longs. Dans le but d'évaluer le potentiel et de cibler le système vasculaire de la tumeur, nous avons en premier comparé la production de PpIX obtenue avec les cellules endothéliales avec celle obtenue avec des cellules de carcinome humain. Les deux lignées cellulaires ont été exposées aux dérivés peptidiques de ALA contenant Gly-Pro. Cette approche est basée sur l'hypothèse que l'activité définie au sein des cellules des transporteurs et des aminopeptidases sont exprimées différemment dans les cellules normales par rapport aux cellules cancéreuses.

Le fait que Boc-(Gly)₂-ALA-OEt **25** et (Gly)₂-ALA-OEt **43** sont des précurseurs efficaces de PpIX montre que l'hydrolyse de la liaison peptidique et la libération de ALA est possible. Les informations obtenues suggèrent que les précurseurs sont internalisés sous forme intacte et que l'activité hydrolytique nécessaire à la formation de ALA libre est due préférentiellement aux protéases intracellulaires. Ces conclusions ont été validées par les observations que le (Gly)₂-ALA-OEt **43** est un précurseur de ALA, alors que les dérivés (Gly)₂-ALA-

O((CH₂)₂O)₂Me **45** et (Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₃Me **46** ne sont, dans les mêmes cellules, que de faibles précurseurs de PpIX. Dans les mêmes conditions si les dérivés (Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₂Me **45** et (Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₃Me **46** étaient hydrolysés au niveau de la liaison peptidique à l'extérieur de la cellule, l'ester aurait dû permettre une augmentation de la production de PpIX. Ceci n'a pas été observé avec ces dérivés, alors que lors des mesures avec les esters, une très nette augmentation de la fluorescence avait été observée. Ce qui est en accord avec un transport intact des précurseurs. Nous avons aussi montré que l'activité hydrolytique impliquée dans ce processus de déprotection de ces précurseurs est rapide et peut couper après une séquence de Gly-Gly et que l'enzyme impliqué lors de cette étape appartient à la classe des Ser-protéases. Ce qui est une propriété inhabituelle

A notre connaissance, une activité permettant d'hydrolyser Boc-Gly-Gly-X n'a pas encore décrite. Par conséquent, un nouvel enzyme ou alternativement une nouvelle activité d'un enzyme connu sont impliqués dans l'hydrolyse de ce dérivé. Nous sommes en train de tenter de caractériser cette activité protéolytique. Nos autres approches expérimentales ont confirmé l'information selon laquelle les dérivés peptidiques de ALA sont tout d'abord transportés au sein de la cellule, avant d'être hydrolysés. Par contre, le mécanisme d'entrée de ces dérivés au sein des cellules n'a pas encore été déterminé. Les résultats indiquent aussi que le système de transport qui est impliqué accepte des ligands avec une longueur définie, puisque le dérivé (Gly)₃-ALA-OMe **47**, (Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₂Me **45** et (Gly)₂-ALA-O((CH₂)₂O)₃Me **46** ne sont pas des précurseurs de PpIX, et qu'ils appartiennent certainement aux (Co)transporteurs de tri-peptides. Les dérivés dipeptidiques de ALA sont aussi moins cytotoxiques en absence d'exposition à la lumière que les dérivés esters et d'acides aminés préalablement évalués [158].

En conclusion, nous avons démontré ici le potentiel des dérivés dipeptidiques de ALA, d'être utilisés comme substrats spécifiques pour certains systèmes de transports membranaires et pour certaines activités enzymatiques cellulaires. Ils peuvent donc être considérés comme précurseurs de PpIX dans les protocoles en PDT et potentiellement pour d'autres approches chimiothérapeutiques.

2 PARTIE EXPERIMENTALE

2.1 Méthodes analytiques et appareils

2.1.1 Chromatographie

Chromatographie sur couche mince (CCM)

Les CCM sont effectuées au moyen de couches minces (0.2 mm d'épaisseur) avec gel de silice 60 F₂₅₄ (indicateur de fluorescence) sur aluminium (Merck, Darmstadt). Après élution dans le solvant donné, les plaques sont révélées par une lampe UV (254 nm) puis, soit par l'atomisation d'une solution aqueuse basique de KMnO₄, d'une solution de réactif de Ehrlich ou d'une solution de ninhydrine et chauffage au sèche-cheveux.

Colonnes flash chromatographiques

Les colonnes flash-chromatographiques sont effectuées avec du gel de silice 60 A C.C. Chromagel, grosseur de grains 35 – 70 µm (SDS, Amtech). L'éluant et les proportions du mélange utilisé sont décrits dans la partie expérimentale de chaque produit. Toutes les chromatographies sur colonnes s'effectuent sous pression (p = 0.5 - 0.9 atm).

2.1.2 Chromatographie en phase gazeuse (GC)

Chromatographe Perkin-Elmer Sigma 3B Dual FID. Colonne : 25 m MN OV-1701, température d'injection : 250°C, température du détecteur : 280°C. Programme de température No.1 : injection à 70°C, temps d'initiation = 2 min, 8°C/min jusqu'à 250°C, 15 min à 250°C.

2.1.3 Chromatographie en phase liquide (HPLC)

Les chromatographies en phase liquide sont effectuées avec un Knauer Programmer 50 équipé d'une colonne C₁₈. Les mesures sont effectuées à 20°C en utilisant un mélange MECN/H₂O 80 : 20 avec une vitesse de flux 0.3 ml/min. La détection est effectuée avec un Bucher UV réglé sur 254 nm.

2.1.4 Spectroscopie infrarouge (FT-IR)

Un spectromètre du type Perkin Elmer FT-IR 1720 X est utilisé pour l'obtention des spectres IR, avec une résolution de 2 cm⁻¹. Les substances cristallines sont analysées dans des pastilles de KBr (puriss. p.a., Fluka, Buchs) et les liquides purs sous forme de film (sandwich) entre deux plaques de KBr. Les bandes d'absorption sont données en longueur d'onde entre 4000 et 400 cm⁻¹ et différenciées selon leur intensité (division du spectre en trois parties égales) par

des abréviations *vs* (la (les) plus intense(s)), *s* (intense), *m* (moyenne), *w* (faible) et *br.* (large). Entre 4000 et 600 cm^{-1} , toutes les bandes d'absorption sont décrites.

2.1.5 Spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN)

Les mesures RMN pour les spectres ^1H à 200 MHz, ^{13}C à 50 MHz sont effectuées avec un spectromètre Gemini XL-200 de Varian et les spectres ^1H à 400 MHz, ^{13}C à 100 MHz sont effectuées avec un spectromètre Bruker Avance-400. La fréquence de mesure, le solvant ainsi que la température sont précisés entre parenthèses dans chaque cas. Les solvants deutérés proviennent des Cambridge Isotope Laboratories. Le standard interne pour les spectres du proton (^1H) : TMS ($\delta_{\text{H}} = 0.00$ ppm) ou CHCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 7.26$ ppm); pour les spectres du carbone (^{13}C) : CDCl_3 ($\delta_{\text{H}} = 77.0$ ppm). Les spectres ^{13}C sont mesurés avec découplage large bande en proton. Les déplacements chimiques sont donnés en ppm dans l'ordre décroissant et les constantes de couplage J sont données en Hz. Le symbole ' \approx ' indique une valeur moyenne. La multiplicité des signaux est donnée avec les abréviations *s* (singulet), *d* (doublet), *t* (triplet), *q* (quadruplet), *quint* (quintuplet) et *m* (multiplet). L'abréviation *br* signifie que le signal est large. Pour permettre l'interprétation, des spectres HETCOR (long range ou short range), COSY, DEPT135, ont été mesurés lorsque cela s'avérait nécessaire. Les déplacements chimiques exacts du système de spin d'ordre supérieur AB sont calculés d'après E. Pretsch [209]. Les protons sont arbitrairement désignés par la lettre alphabétique correspondant au système de spin AB dans l'ordre croissant de leur déplacement chimique. La numérotation des atomes de carbones des composés contenant ALA a été attribuée arbitrairement, afin d'avoir une régularité dans la numérotation, dans les cas des autres molécules, la numérotation est celle définie par le nom systématique donné.

2.1.6 Spectroscopie de masse (MS)

Les mesures de spectroscopie de masse sont effectuées sur un spectromètre Nermag RC 30-10 pour l'ionisation à impact électronique (EI) avec une énergie de 70 eV et ionisation chimique (DCI) avec l'ammoniac. Les pics sont donnés en m/e et leur intensité en pour-cent du pic de base. Les mesures par ionisation électro-spray (ESI) sont effectuées sur un appareil Finnigan LCQ. La valeur donnée correspond à la masse moyenne de l'ion mesuré précisé entre crochets.

Les spectres de masse haute résolution (HR-MS) sont effectués à l'université de Fribourg (Suisse) sur un spectromètre Bruker BioAPEX II Daltonics. Si la technique d'ionisation n'est pas spécifiée, elle est par électro-spray; la valeur donnée entre parenthèse est celle se rapprochant le plus de la valeur mesurée et correspond à la formule brute de l'ion mesuré.

2.1.7 Indice de réfraction

Les indices de réfractations sont mesurés sur un réfractomètre Carl Zeiss. Les valeurs données ne sont pas corrigées; la température au moment de la mesure est précisée à chaque fois.

2.1.8 Analyse élémentaire (AE)

Les analyses élémentaires CHN sont effectuées par le département de chimie de l'Ecole d'ingénieurs et d'architectes de Fribourg.

2.1.9 Point de fusion (PF)

Les points de fusion sont mesurés dans un capillaire à point de fusion avec un appareil Büchi B 510 à bain d'huile. Les valeurs données ne sont pas corrigées.

2.1.10 Verreries, systèmes de chauffage et de refroidissement

La verrerie pour les réactions sous azote, sous argon ou sans humidité est chauffée à 120°C minimum à l'étuve pendant au moins 2 h. Elle est montée chaude et refroidie à température ambiante sous une atmosphère d'azote ou d'argon. Les réactions à basses températures se font dans un bain de glace (0°C), dans un bain acétone/azote liquide (-80°C) ou dans un bain éthanol/azote liquide (-100°C). La température mesurée est celle du bain. Pour les réactions de -40°C à 0°C effectuées durant la nuit, un cryostat HAAKE F3 (-40°C à +80°C) est utilisé.

Les réactions sont chauffées par un bain de polyéthylène glycol jusqu'à une température de 190°C.

2.1.11 Hydrogénation à haute pression

Les hydrogénations à haute pression s'effectuent dans un autoclave en acier de 100 ml comportant un cylindre en verre. La température est régulée par un "laborboy" composé d'un manteau chauffant et d'un agitateur magnétique. Les valeurs données entre parenthèses donnent les conditions de départ (variations de pression durant le chauffage et le refroidissement ± 5 bars). La température est celle mesurée physiquement à l'intérieur de l'autoclave.

2.1.12 Appareillage pour le pH-stat

Les réactions d'hydrolyse enzymatique ont été contrôlées à l'aide d'un appareil Präzisions-pH-meter E510 couplé à un Dosimat E535 et à un Impulsomat E473 (Metrohm, Herisau).

2.1.13 Spectrophotométrie UV-visible

Les mesures d'absorbance ont été effectuées sur un appareillage du type Cary 1E UV-visible (Varian).

2.1.14 Lignées de cellules

Dans le cadre de l'étude de la production de PpIX par les cellules en culture, trois lignées issues de divers laboratoires ont été étudiées :

- une lignée cellulaire humaine provenant d'un carcinome des poumons : les cellules A549 ("American Type Culture Collection" ATCC CCL-185, Rockville, MA, USA) sont de type épithélial. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", Life Technologies AG, Basel) 1 g/l de glucose et 10 % de FCS (sérum foetal de veau, Lot # 96207, Chemie Brunschwig AG, Basel). Ces cellules expriment l'activité de l'aminopeptidase N/CD13 (EC 3.4.12.2), mais pas celle de l'aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) [210].
- une lignée cellulaire cérébrale de rat : les cellules EC219 (Institut de Pathologie, CHUV) sont de type endothélial. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM 1 g/l de glucose et 10 % de FCS, développées à Lausanne et immortalisées par transfection du SV40 middle T-oncogène. Ces cellules expriment une activité modérée d'aminopeptidase N et une activité élevée d'aminopeptidase A [211].
- une lignée cérébrale humaine : les cellules HCEC (Institute of Biological Sciences, National Research Council of Canada, Ottawa) sont de type endothélial et sont puis immortalisées par transfection du SV40 large T-oncogène. Elles sont cultivées dans du milieu DMEM 4.5 g/l de glucose et 10 % de FCS. Ces cellules expriment une activité modérée d'aminopeptidase N, mais pas d'activité d'aminopeptidase A.
- deux lignées provenant de carcinome du colon : HT29 et SW480 [ATCC], même conditions de cultures.
- deux lignées provenant de carcinome du sein : T47D et MCF-7, [ATCC], même conditions de cultures.

Les cultures et les boîtes d'expérimentation sont placées dans un incubateur contenant 6 % de CO₂ à une température de 37°C. Les réactifs utilisés pour les cultures cellulaires proviennent généralement de Gibco BRL. Life Technologies, Basel.

2.1.15 Inhibiteurs des aminopeptidases considérés dans ce travail

- pour l'aminopeptidase A : l'amastatin (Novabiochem, Suisse; stock 1.0 mg/ml PBS Phosphate Buffer saline" : 0.15 M NaCl dans du tampon phosphate 0.01 M pH 7.2), MW 474.6)
- pour l'aminopeptidase N : l'actinonin (Novabiochem, Suisse; stock 0.6 mg/ml PBS, MW 385.5) [BBL]
- BB2116 : inhibiteur de matrice de metalloprotéase (enzyme permettant l'invasion des cellules cancéreuses au sein des tissus) [Sigma]

- Diprotin A : H-Ile-Pro-Ile-OH, inhibiteur des protéases coupant les séquence Gly-Pro tel DPP4 [Sigma]
- Diprotin B : H-Val-Pro-Leu-OH, inhibiteur des protéases coupant les séquence Gly-Pro tel DPP4
- AEBSF : 4-(aminoethyl)-benzensulfonyl fluorid hydrochlorid, inhibiteur covalent de serines protéases [Sigma]
- Bestatin : [(2S, 3R)]-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutyryl-L-leucine [Sigma]
- PIC : cocktail d'inhibiteurs, ABSEF, pepstatin A, E-64 (inhibiteur des cystéines protéases) bestatin, leupetin (inhibiteur de séquences spécifiques, aprotin [Roche]

2.1.16 Détection de la fluorescence

Le système de détection thermostatisé CytoFluor® Series 4000, Multi-well Plate Reader (Perspective Biosystems, Framingham, MA, USA) permet la mesure de la fluorescence des produits solubles ou associés à la cellule. La fluorescence est en fait mesurée à l'aide d'un tube photomultiplicateur dans une chambre de détection à l'abri de la lumière. Le scanner du système CytoFluor® possède six filtres d'excitation et six filtres d'émission de manière à détecter les produits fluorescents (ou fluorophores) les plus communs. Le spectre d'excitation de la lampe (de type tungstène-halogène d'une puissance de 50W) balaie les longueurs d'onde entre 320 nm et 700 nm. La détection de la PpIX produite se fait par des tubes à électrons (Inc. # 9781 Photomultiplier Tube). Filtres utilisés : 409 ± 20 nm pour l'excitation et 645 ± 40 nm pour l'émission.

2.1.17 Protocole pour l'expérimentation sur culture de cellules

Les supports considérés pour l'expérience sont des plaques multi-puits (Costar® 3548, Integra Biosciences, Wallisellen) de 48 puits spécialement conçues pour la culture cellulaire. Les cellules sont maintenues dans du milieu de culture pour leur prolifération jusqu'à confluence. Le jour de l'expérimentation, les milieux de culture sont aspirés et du milieu DMEM, ne contenant ni rouge phénol, ni FCS est ajouté (200 µl/puits), les cultures sont stabilisées à 37°C et à 6 % de CO₂ pendant 10 min. A noter que l'absence de sérum pendant un temps limité (l'expérience dure 3-4 heures) n'est pas préjudiciable à la survie des cellules.

Dans chaque puits sont alors administrés des volumes respectifs de 1, 2.5, 5, 10, 25 et 50 µl de solution 100 mM à tester constituée d'un dérivé peptidique de ALA dilué généralement dans de l'eau bidistillée. Pour chaque volume de dérivé peptidique considéré, six puits sont remplis. A l'extrémité gauche de la plaque, une ligne de six puits est remplie avec 200 µl de milieu et 10 µl de la solution de référence (ALA **7** pour les dérivés peptidiques acides et le méthylester de ALA **8** pour les dérivés peptidiques estérifiés), alors qu'à l'extrémité droite de la plaque, une ligne de six puits n'est remplie que de 200 µl de milieu. D'autre part, à trois des six puits de mesure sont ajoutés 10 µl d'un inhibiteur des aminopeptidases intervenant dans la libération du dérivé de ALA considéré.

Les mesures sont effectuées sur l'appareillage CytoFluor® toutes les 15 minutes pour une durée variant entre 90 et 150 minutes selon le dérivé peptidique considéré. Une mesure finale après plus de 200 minutes est effectuée pour certains dérivés présentant des résultats intéressants. Les données récoltées sont ensuite reportées sur un graphique représentant la fluorescence en fonction de la quantité de dérivé peptidique administré.

2.1.18 Test de viabilité des cellules

La viabilité des cellules après les diverses expérimentations est contrôlée grâce au test du MTT, méthode permettant de vérifier la respiration mitochondriale des cellules. La réduction du sel jaune de MTT, le bromure de [(4, 5-diméthylthiazo-2-yl)-2, 5-diphényl] tetrazolium en formazan violet (composé insoluble) est catalysée par une enzyme déshydrogénase mitochondriale, qui exerce son action uniquement au sein des cellules vivantes et métaboliquement actives.

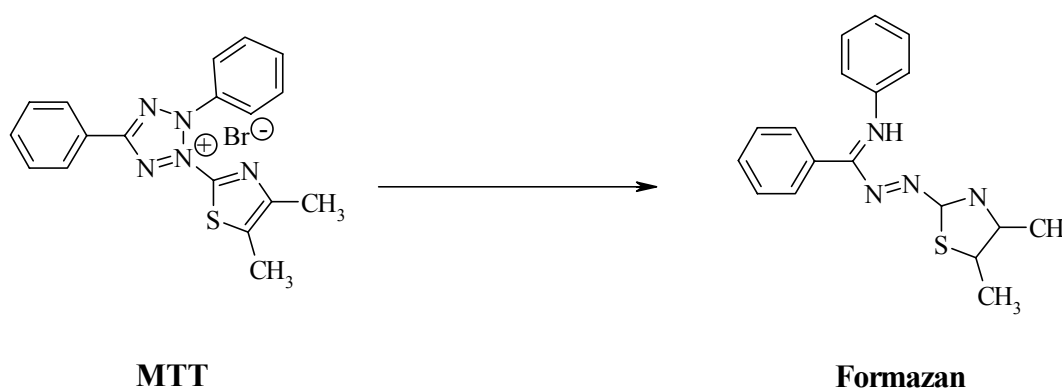


Figure 54: Réduction du MTT en formazan

Pratiquement, le sel de MTT est dissout dans du PBS à une concentration de 5 mg/ml (solution de stockage). 20 µl de cette solution sont alors ajoutés dans chaque puits contenant la solution à tester et le tout est placé pendant 120 min dans un incubateur à une température de 37°C. Après ce laps de temps, les boîtes sont vidées et rincées avec du PBS. 250 µl d'*i*-PrOH contenant 1% de HCl 4N sont alors ajoutés dans chaque puits, opération permettant de dissoudre les cellules et de mettre en solution le formazan qu'elles ont accumulé. L'absorbance de la solution est enfin mesurée à l'aide d'un lecteur multipuits (Labsystems, iEMS Reader EMF) à une longueur d'onde de 540 nm. L'activité mitochondriale est déterminée en fonction de l'absorbance mesurée : plus il y a de formazan accumulé, plus l'absorbance est élevée, donc plus l'activité mitochondriale est forte.

2.2 Solvants et produits

2.2.1 Solvants standards

Les solvants pour les chromatographies ainsi que pour les extractions sont de qualité technique et sont distillés sur un agent dessicatif avant emploi.

Solvant	Abréviation	Distillé sur
Chloroforme	CHCl ₃	CaCl ₂
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	CaCl ₂
Diéthyléther	Et ₂ O	CaCl ₂
Acétate d'éthyle	AcOEt	K ₂ CO ₃
Ethanol	EtOH	CaO
Pentane		CaCl ₂
Hexane		CaCl ₂
Isopropanol		CaO
Méthanol	MeOH	CaO

2.2.2 Solvants pour réactions

Pour toutes les réactions sous atmosphère gazeuse, des solvants secs sont utilisés. Certains solvants secs (SDS purex p.a., ≥ 99.7 %) sont distillés une deuxième fois (qualité absolue) et sont indiqués par un astérisque (*).

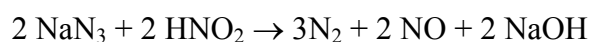
Solvant	Abréviation	Provenance & qualité
Acétonitrile	CH ₃ CN	Fluka puriss.; absolu
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂ *	distillé sur P ₂ O ₅
Diéthyléther	Et ₂ O	Fluka puriss.
Diméthylformamide	DMF	Fluka puriss.; absolu
Méthanol	MeOH	SDS purex p.a.
Tétrahydrofurane	THF*	potassium (benzophénone)

2.2.3 Produits chimiques et gaz

Produits chimiques	qualité	provenance	N°
Acide chlorhydrique (HCl)	32%	Prochimie	
Acide lévulinique	purum \geq 97%	Fluka	
Acide <i>para</i> -toluènesulfonique monohydrate (p-TsOH)	puriss. \geq 99%	Fluka	
Acide propionique	puriss \geq 99.5%	Fluka	
Acide trifluoroacétique	99%	Acros	
Acide sulfurique (H ₂ SO ₄)	96%	Prochimie	
L-Alanine methyl ester	puriss. \geq 99%	Fluka	
7-Amino-4methylcoumarine	\geq 98%	Bachem	84
Argon (Ar)	tech.	Carbagas	
Azote (N ₂)	tech.	Carbagas	
Azoture de sodium (NaN ₃)	> 99%	RdH	
Benzyl alcool	Assay \geq 99%	Fluka	
Brome (Br ₂)	purum p.a. \geq 99%	Fluka	
Boc-Ala-OH	\geq 98%	Nova	70
Boc-Arg(Boc ₂)-OH	\geq 98%	Bachem	75
Boc-Arg(Boc ₂)-Gly-Asp-OH	Pas pur	Bachem	
Boc-Asp(OtBu)-OH	\geq 98%	Bachem	72
Boc-Glu(OtBu)-OH	\geq 95%	Novabiochem	73
Boc-Gly-OH	\geq 98%	Fluka	
Boc-Gly-Gly-OH	\geq 95%	Novabiochem	76
Boc-Gly-Gly-Gly-OH	\geq 99%	Bachem	78
Boc-Gly-Pro-OH	\geq 99%	Novabiochem	77
Boc-Lys(Boc)-OH	\geq 98%	Bachem	74
Boc-Phe-OH	\geq 98%	Bachem	71
Boc-Arg(Boc) ₂ -Gly-Asp(OtBu)-OH	plusieurs produits	Bachem	71
Carbonate de sodium (NaCO ₃)		Fluka	
Célite®	(10-40 μ m)	Fluka	
Charbon actif	p.a.	Merck	
Chlorhydrate de N-Ethyl-N'-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide (EDC.HCl)	purum \geq 98%	Fluka	
Chlorure de thionyl (SOCl ₂)	purum \geq 98%	Fluka	
Chlorure d'étain (SnCl ₂)		Prochimie	
Chlorure de sodium (NaCl)		Prochimie	
Cyclohexanol	purum \geq 98%	Fluka	
Diéthylène glycol	purum \geq 98%	Fluka	
Diéthylène glycol monoéthyle ether (DEG)	purum \geq 98%	Fluka	
Dichloroacétone	99%	Acros	
N, N' Dicyclohexylcarbodiimide (DCC)	puriss. \sim 99%	Fluka	
Dihydrogénophosphate de sodium (NaH ₂ PO ₄)		Fluka	
4-(N, N'-Diméthylamino)pyridine (DMAP)	purum \geq 98%	Fluka	

<i>N,N</i> -Diméthylformamide (DMF)	Assay $\geq 99.8\%$	Fluka	
Diméthyle sulfoxyde (DMSO)		Fluka	
Di- <i>tert</i> -butyl-dicarbonat	purum $\geq 98\%$	Fluka	
Ethylène glycol	purum $\geq 98\%$	Fluka	
Etylène glycol monométhyle ether	purum $\geq 98\%$	Fluka	
Etylène glycol monoéthyle ether	purum $\geq 98\%$	Fluka	
Hexanol	purum $\geq 98\%$	Fluka	
Hydrogène (H ₂)	tech.	Carbagas,	
Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO ₃)		Fluka	
Hydrogénophosphate de disodium (Na ₂ HPO ₄)		Fluka	
Hydroxy-benzotriazole (HOBT)	purum $\geq 98\%$	Fluka	
Hydroxyde de potassium (KOH)	p.a.	SdS	
Hydroxyde de sodium (NaOH)	p.a.	SdS	
Hydruide de sodium (NaH)	pract.	Fluka	
Magnésium (en tournure)	purum $\geq 99.5\%$	Fluka	
4-Methoxy- β -naphthylamine	$\geq 97\%$	Bachem	85
Oxyde d'aluminium neutre		Fluka	
Palladium sur charbon actif (10%)	puriss.	Fluka	
Pentaerythritol	$\geq 98\%$	Bachem	
Phtalimide de potassium	purum $\geq 99\%$	Fluka	
Pig liver esterase (PLE)	20 unités/mg	Sigma	
Potassium	purum	Fluka	
1,3-propanediol	puriss. $\geq 99\%$	Fluka	
Solution de HCl/MeOH	1.25M	Fluka	
Sulfate de magnésium (MgSO ₄)		SdS	
Sulfate de sodium (Na ₂ SO ₄)		SdS	
Triéthylamine (Et ₃ N)	puriss. p.a. $\geq 99.5\%$	Fluka	
Triéthylène glycol monoéthyle ether (TEG)	purum $\geq 98\%$	Fluka	
Triphénylphosphine (PPh ₃)	puriss. $\sim 99\%$	Fluka	
Z-Asp(Obz)-OH	$\geq 99.0\%$	Bachem	80
Z-Asp(O <i>t</i> Bu)-OH	$\geq 99.0\%$	Bachem	81
Z-Gly-Gly-OH	$\geq 99.0\%$	Bachem	82
Z-Phe-OH	$\geq 99.0\%$	Bachem	79

Remarque importante : toutes les phases aqueuses ayant été en contact avec NaN₃ sont soigneusement conservées puis traitées avant d'être éliminées à l'évier. La procédure est la suivante [212] : dans un tricol muni d'une agitation magnétique, d'un thermomètre, d'une ampoule à brome et d'une sortie de gaz, on introduit les phases aqueuses à détruire. Une solution de nitrite de sodium dans l'eau (7.5 g de NaNO₂ dans 38 ml d'eau pour 5 g de NaN₃) est ajoutée goutte à goutte. A la fin de l'ajout, on introduit lentement une solution à 20 % de H₂SO₄, jusqu'à ce que le pH de la solution résultante soit acide. Il y a alors dégagement progressif d'oxydes d'azote. La destruction de l'azoture est complète lorsque la solution fait virer au bleu un papier ioduroamidonné (présence d'un excès de nitrite). La solution est éliminée sous courant d'eau.



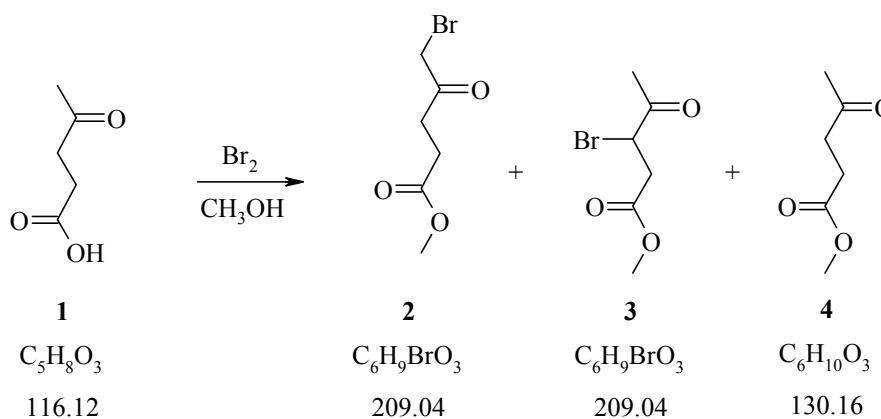
Lors de cette réaction, il se dégage de l'oxyde nitrique (NO) qui, au contact de l'air s'oxyde en partie en dioxyde d'azote (NO₂) dont les vapeurs brunes sont irritantes et toxiques. Il est donc impératif de travailler sous la hotte.

2.3 Synthèses

2.3.1 Synthèse de l'acide 5-aminolevulinique (ALA)

Cette synthèse a été faite de nombreuses fois, aussi bien dans le cadre de ce travail de thèse, ou lors de travaux réalisés par des étudiants avancés de 4^{ème} année. Cette synthèse n'est pas la seule méthode [213] qui permet d'obtenir ALA, mais elle a l'avantage de permettre l'engagement de grande quantité de réactifs, pour un coût raisonnable.

2.3.1.1 Synthèse du 3- et du 5-bromolévulinate de méthyle (2 et 3)



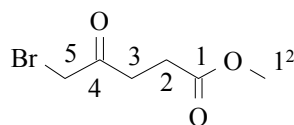
Dans un ballon de sulfonation de 2000 ml est placée une solution de 100 g (860 mmol, 1.0 éq.) d'acide lévulinique **1** dans 800 ml de méthanol. 44 ml (860 mmol, 1.0 éq.) de brome lui sont alors ajoutés, goutte à goutte et sous forte agitation, de manière à ce que la température ne dépasse pas 30°C. Le départ de la réaction, reconnaissable à la soudaine décoloration du mélange réactionnel et à une montée de la température. La durée de l'adjonction du brome est d'environ 7 heures.

La solution est laissée à température ambiante durant la nuit, puis elle est mise à reflux durant 90 minutes. Après refroidissement le méthanol est éliminé par évaporation. Le résidu est dissout dans 800 ml de chlorure de méthylène. La phase organique est lavée avec 200 ml de NaHCO₃, puis trois fois avec de l'eau. Elle est séchée sur MgSO₄ anhydre puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif (T_{bain} = 30°C).

La distillation fractionnée sur *colonne Widmer NS14* de 40 cm conduit à l'obtention de huit fractions principales d'une masse totale de 159.09 g. La pureté des produits est déterminée par chromatographie en phase gazeuse. Les fractions contenant le 5-bromo (3^{ème} pic du chromatogramme) sont récupérées.

Rendement : 82.0 g (391 mmol, 45 %)

Données analytiques de **2** :



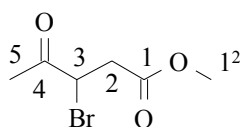
Rf : (Hexane/AcOEt 1:1) : 0.50. **Eb** : 65.0 °C à p = 0.001 Torr. **n_D²⁰** : 1.4820. **GC** (programme standard) : 10.8 min.

IR (film) : 3000_m, 2953_m, 2849_w, 1734_s, 1722_s, 1439_s, 1411_s, 1359_s, 1322_m, 1207_s, 1177_s, 1080_m, 988_m, 863_w.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 3.95 (s, 2H, H₂C(5)); 3.67 (s, 3H, H₃C(12)); 2.95 (t, ³J(2, 3) = 6.4, 2H, H₂C(3)); 2.65 (t, ³J(2, 3) = 6.6, 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 201.3 (C(4)); 173.4 (C(1)); 52.6 (C(12)); 35.1 (C(3)); 34.7 (C(2)); 28.8 (C(5)).

Données analytiques de **3** :



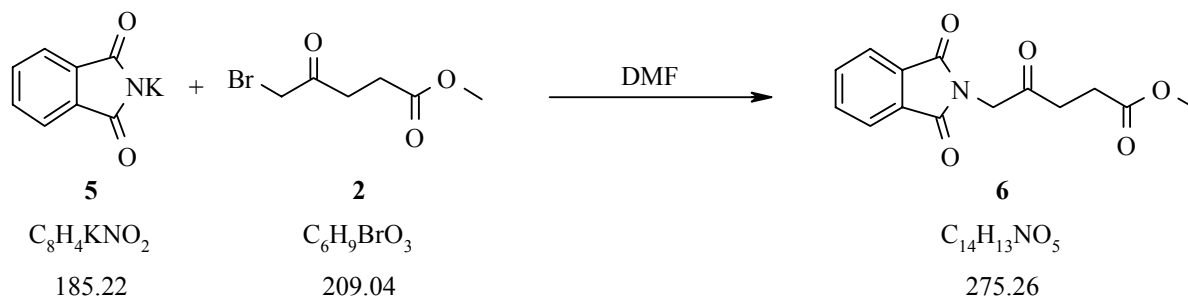
Rf : (Hexane/AcOEt 1:1) : 0.56. **Eb** : 35.0 °C à p = 0.001 Torr. **n_D²⁰** : 1.4684. **GC** (programme standard) : 8.1 min.

IR (film) : 2970_w, 2956_w, 2840_w, 1724_s, 1438_m, 1409_m, 1359_s, 1332_m, 1293_m, 1211_s, 1162_s, 997_w, 896_w, 650_w.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 4.65 (dd, ³J(2a, 3) = 8.5, ³J(2b, 3) = 5.9, 1H, HC(3)); 3.70 (s, 3H, H₃C(12)); 3.27 (dd, ²J(2a, 2b) = 17.1, ³J(2a, 3) = 8.7, 1H, H_a-C(2)); 2.90 (t, ²J(2a, 2b) = 17.3, ³J(2b, 3) = 5.9, 1H, H_b-C(2)); 2.42 (s, 3H, H₃C(5)).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃) δ 201.0 (C(4)); 171.3 (C(1)); 52.8 (C(12)); 45.6 (C(3)); 35.1 (C(2)); 27.7 (C(5)).

2.3.1.2 Synthèse du 5-(N-Phthalimido)-lévulinate de méthyle (6)

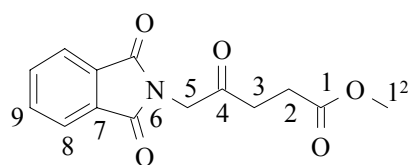


Dans un tricol de 1000ml sont placés 53g (0.24 mol) de **5**, ainsi que 400ml de DMF. La température du mélange est abaissée à 0°C. 49.2 (0.24 mol) de **2** sont ajoutés goutte à goutte en maintenant la température à 0°C. Le mélange réactionnel prend progressivement une coloration brunâtre. Après l'adjonction la solution est laissée à 0°C pendant 30 minutes. La réaction est ensuite suivie par CCM.

Après 4 heures, le précipité formé (KBr) est centrifugé et le surnageant mélangé avec de l'eau jusqu'à l'apparition d'un précipité jaunâtre. Le solide ainsi récolté est dissout dans 100 ml de CHCl₃. La phase organique est ensuite lavée avec 2 x 200 ml d'une solution 0.1 M de NaOH, puis avec 2 x 200 ml d'eau pour éliminer les traces de NaOH. La phase organique est alors séchée sur MgSO₄ anhydre, filtrée et concentrée. Après séchage à la pompe à huile, isolement d'un solide de couleur jaune pâle **6**.

Rendement : 45.7g (0.17 mol, 69 %)

Données analytiques de **6** :



R_f : (Hexane/AcOEt 1:1) : 0.51. **F** : 96.0 - 97.0°C.

IR (KBr) : 3473vw, 3049vw, 3029vw, 2957w, 1776m, 1741s, 1730vs, 1718vs, 1615w, 1468m, 1447m, 1417s, 1388m, 1354m, 1314s, 1269m, 1200s, 1179m, 1103s, 1056w, 1017m, 993m, 972w, 925w, 906m, 796vw, 746m, 713s, 689vw, 605w.

¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃) δ 7.90 - 7.86 (*m*, 2H, HC(8, 8')); 7.76 - 7.71 (*m*, 2H, HC(9, 9')); 4.56 (*s*, 2H, H₂C(5)); 3.69 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 2.86 (*t*, ³*J*(2, 3) = 6.6, 2H, H₂C(3)); 2.67 (*t*, ³*J*(2, 3) = 6.6, 2H, H₂C(2)).

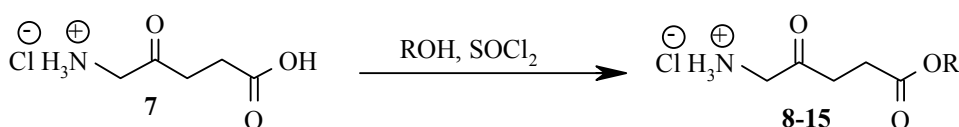
¹H-NMR (200 MHz, D₂O) δ 4.10 (*s*, 2H, H₂C(1)); 2.87 (*m*, 2H, H₂C(3)); 2.67 (*m*, 2H, H₂C(4)).

¹³C-NMR (50 MHz, D₂O) δ 206.7 (C(2)); 179.4 (C(5)); 49.7 (C(1)); 36.9 (C(3)); 30.0 (C(4)).

2.3.2 Synthèses de dérivés de l'acide 5-aminolévulinique

2.3.2.1 Synthèses de chlorhydrates d'esters de l'acide 5-aminolévulinique

Mode opératoire - Type I



Composé	R	Durée	Température	PM [g/mol]
8	-Me	15 heures	70°C	181.64
9	- <i>n</i> (CH ₂) ₅ Me	4 heures	70°C	251.78
10	- <i>c</i> (CH ₂) ₆	30 heures	70°C	249.76
11	-CH ₂ (CH) ₆	4 heures	70°C	257.72
12	-((CH ₂) ₂ O)Me	4 heures	50°C	225.67
13	-((CH ₂) ₂ O)Et	4 heures	50°C	239.70
14	-((CH ₂) ₂ O) ₂ Et	4 heures	50°C	283.75
15	-((CH ₂) ₂ O) ₃ Et	4 heures	50°C	327.80

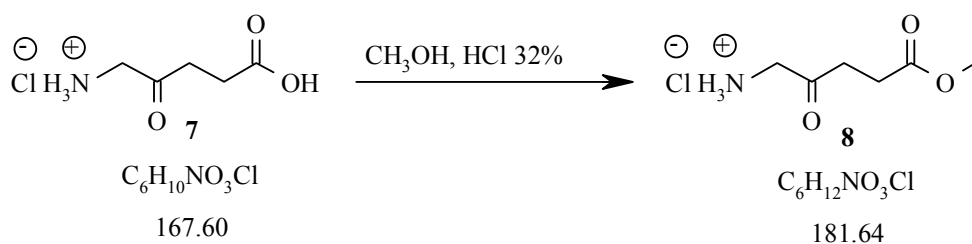
Dans un ballon bicol de 25 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, sont versés 3.0 ml de l'alcool ROH correspondant. Après refroidissement à l'aide d'un bain de glace et sous agitation magnétique, 0.5 ml (7 mmol, 2.3 éq.) de chlorure de thionyle SOCl₂ sont ajoutés goutte à goutte au liquide. Après 5 minutes d'agitation à 0°C, 500 mg (3 mmol, 1.0 éq.) d'acide 5-aminolévulinique (ALA) **7** sont versés dans le récipient. Le mélange réactionnel est alors réchauffé à RT, puis est chauffé à une température allant de 50°C à 70°C pour une durée variant de 4 heure à 30 heures selon l'alcool utilisé.

Le contrôle de l'avancement de la réaction se fait par CCM (CH₂Cl₂/CH₃OH/H₂O : 70:30:5). Une fois la totalité de **7** disparue sur CCM, le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif, si son point d'ébullition le permet et le résidu pâteux séché à la pompe à huile.

Si le point d'ébullition est trop élevé, le résidu pâteux contenant de l'alcool résiduel est purifié à l'aide d'une flash-chromatographie, dont les caractéristiques sont les suivantes : hauteur de 30 cm et diamètre de 3 cm; 100g de gel de silice 60, grosseur de grains 0.040 - 0.063 mm (Merck, Darmstadt); L'éluant utilisé est un gradient de dichlorométhane et de méthanol (5% à 50%) qui varie en fonction de l'ester synthétisé.

Après concentration des fractions récoltées, le résidu pâteux est dissout dans un volume minimum de méthanol, puis sa précipitation est provoquée par l'addition d'éther jusqu'au troublement de la solution et par la réfrigération du mélange à -21°C . Le solide amorphe récupéré est séché à la pompe à huile.

2.3.2.1.1 Synthèse de ALA-OMe (8)

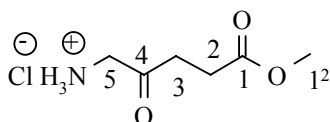


Dans un ballon de 200 ml sont placés 300ml (25 mol) de méthanol, ainsi que 7.2 g (45 mmol) de **YB115**. Après dissolution, 30 ml de HCl 32% sont ajoutés. Le tout est chauffé à reflux durant 15 heures. Le solvant est éliminé à l'évaporateur rotatif et la pâte obtenue est séchée à la pompe à huile.

Le produit est purifié par dissolution dans un minimum de méthanol, il est ensuite précipité par adjonction d'éther. Le précipité est filtré et est séché à la pompe à huile.

Rendement : 4.9 g (41 mmol, 90 %).

Données analytiques de **8** :



R_f : (CH₂Cl₂/CH₃OH/H₂O : 70:30:5) : 0.33. **F** : 144.0 - 146.0°C.

IR (KBr) : 2991 s_{br} , 1723 s , 1588 m , 1474 m , 1420 m , 1326 m , 1280 m , 1201 m , 1140 m , 1057 m , 978 m , 739 m .

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) : 4.09 (s , 2H, H₂C(5)); 3.66 (s , 3H, H₃C(1²)); 2.90-2.85 (m , AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.70-2.66 (m , BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) : 206.7 (C(4)); 178.1 (C(1)); 55.1 (C(1²)); 49.7 (C(5)); 37.0 (C(3)); 30.0 (C(2)).

MS (EI, 70 eV) : 146 (47, [M - Cl]⁺), 117 (42), 114 (90), 86 (100), 82 (37), 59 (63), 55 (98).

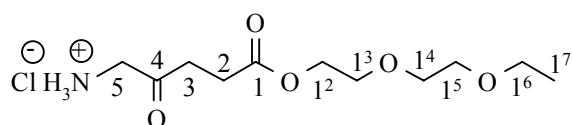
C₆H₁₂NO₃Cl (181.64) : calc. : C 39.68, H 6.66, N 7.71;
 obs. : C 38.07, H 6.44, N 7.74.

2.3.2.1.7 Synthèse de ALA-O((CH₂)O)₂Et (14)

La synthèse de **13** est effectuée selon le Mode opératoire - Type I. Addition de 0.7 ml (9 mmol) de SOCl₂ à 3.0 ml (22 mmol) de diéthylène glycol monoéthyléther, puis, après refroidissement à 0°C, adjonction de 500 mg (3 mmol) d'ALA. Le mélange est chauffé à 50°C durant 5 heures. Le résidu pâteux brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est chromatographié comme indiqué plus haut. Isolement d'un solide pâteux jaunâtre.

Rendement : 647 mg (76 %).

Données analytiques de **14** :



R_f : (CH₂Cl₂/CH₃OH/H₂O : 70:30:5) : 0.48. **F** : 25.0 - 30.0°C.

IR (MeOH) : 3446_m, 2800_m, 2330_w, 1730_{vs}, 1643_w, 1557_w, 1505_w, 1489_w, 1456_w, 1391_m, 1350_w, 1314_w, 1246_m, 1211_m, 1186_m, 1125_m, 1055_w, 996_w, 959_w.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.20-4.18 (*m*, 2H, H₂C(1²)); 4.05 (*s*, 2H, H₂C(5)); 3.70-3.68 (*m*, 2H, H₂C(1³)); 3.63-3.61 (*m*, 2H; H₂C(1⁴) ou H₂C(1⁵)); 3.59-3.56 (*m*, 2H; H₂C(1⁴) ou H₂C(1⁵)); 3.51 (*q*, ³*J*(1⁶, 1⁷)=7.1, 2H, H₂C(1⁶)); 2.87-2.83 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.68-2.65 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.11 (*t*, ³*J*(1⁶, 1⁷) = 7.1, 3H, H₃C(1⁷)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 206.6 (C(4)); 177.3 (C(1)); 72.2; 71.5 (C(1⁴); (C(1⁵))); 71.0 (C(1³)); 69.2 (C(1⁶)); 66.7 (C(1²)); 49.7 (C(5)); 36.9 (C(3)); 30.0 (C(2)); 16.7 (C(1⁷))

MS (EI, 70 eV) : 248 (46, [M-Cl]⁺), 190 (5), 174 (7), 146 (7), 117 (25), 99 (68), 86 (45), 72 (100), 59 (63), 55 (35).

HRMS (ESI) calc C₁₁H₂₂NO₅⁺: 248.1491; obs. 248.1495

C₁₂H₁₆N₂O₄ (252.26) : calc. : C 57.13, H 6.39, N 11.10;

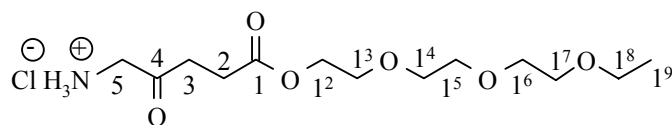
obs. : C 57.36, H 6.38, N 11.00.

2.3.2.1.8 Synthèse de ALA-O((CH₂)O)₃Et (15)

La synthèse de **15** est effectuée selon le Mode opératoire - Type I. Addition de 0.7 ml (9 mmol) de SOCl₂ à 3.0 ml (19 mmol) de triéthylène glycol monoéthyléther, puis, après refroidissement à 0°C, adjonction de 500 mg (3 mmol) d'ALA. Le mélange est chauffé à 50°C durant 5 heures. Le résidu pâteux brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est chromatographié comme indiqué plus haut. Isolement d'un solide pâteux jaunâtre.

Rendement : 860 mg (87 %).

Données analytiques de **15** :



R_f : (CH₂Cl₂/CH₃OH/H₂O : 70:30:5) : 0.49.

IR : 2873 m , 1965 w , 1732 vs , 1597 m , 1489 s , 1476 m , 1418 s , 1387 m , 1349 m , 1308 m , 1246 m , 1211 m , 1108 m , 1000 m , 996 w , 953 w , 867 m .

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.31-4.28 (m , 2H, H₂C(1²)); 4.15 (s , 2H, H₂C(5)); 3.79-3.77 (m , 2H, H₂C(1³)); 3.75-3.67 (m , 8H; H₂C(1⁷), H₂C(1⁶), H₂C(1⁵), H₂C(1⁴)); 3.64 (q , ³ J (1⁸, 1⁹) = 7.0, 2H, H₂C(1⁸)); 2.95-2.92 (m , AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.82-2.79 (m , BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.28 (t , ³ J (1⁹, 1⁸) = 7.1, 3H, H₃C(1⁹)).

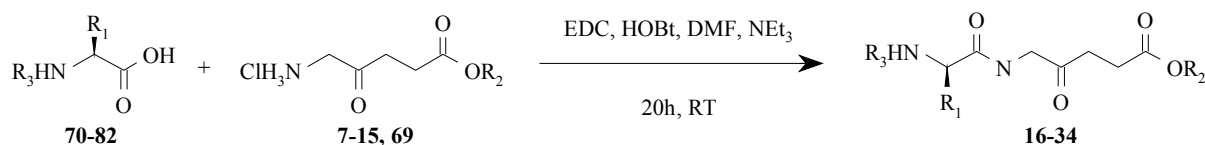
¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 203.5 (C(2)); 174.0 (C(1)); 71.8; 71.7; 71.1 (C(1⁴), C(1⁵), C(1⁶), C(1⁷)); 70.3 (C(1³)); 67.8 (C(1⁸)); 65.2 (C(1²)); 48.6 (C(5)); 35.6 (C(3)); 29.0 (C(2)); 15.7 (C(1⁹)).

MS (ESI⁺) m/z intensité relative : 315 (25, [M-HCl+Na]⁺), 293 (100, [M-Cl]⁺), 201 (27), 196 (56), 179 (99), 149 (37).

HRMS (ESI) calc. C₁₃H₂₆NO₆⁺: 292.1755; obs. 292.1751.

2.3.2.2 Synthèses de dipeptides contenant l'acide 5-aminolévulinique

Mode opératoire - Type II



Produit	R ₁	Acide aminé	R ₂	R ₃	PM [g/mol]
16	CH ₃	Ala	Me	Boc	316.35
17	CH ₂ C ₆ H ₅	Phe	Me	Boc	392.45
18	CH ₂ COO ^t Bu	Asp	Me	Boc	473.56
19	(CH ₂) ₂ COO ^t Bu	Glu	Et	Boc	444.52
20	(CH ₂) ₄ NHBoc	Lys	Me	Boc	416.47
21	(CH ₂) ₃ NHC(NBoc)(NHBoc)	Arg	Me	Boc	601.70
22	CH ₃	Ala	Hexyl	Boc	386.49
23	CH ₃	Ala	Et	Boc	330.38
24	CH ₃	Ala	Cyclohexyl	Boc	384.48
25	H	Ala	Et	Boc-Gly	373.41
26	(CH ₂) ₃ -N _(azote de l'aa)	Pro	Et	Boc-Gly	413.47
27	H	Gly	Me	Boc-Gly-Gly	416.43
28	CH ₂ C ₆ H ₅	Phe	Me	Z	426.47
29	CH ₂ COOBzl	Asp	Me	Z	484.50
30	CH ₂ COO ^t Bu	Asp	Me	Z	450.49
31	H	Gly	Me	Z-Gly	393.40
32	H	Gly	DEG	Boc-Gly	461.51
33	H	Gly	TEG	Boc-Gly	505.56
34	CH ₂ C ₆ H ₅	Phe	Ala-OMe	Boc	463.53
65	H	Gly	Me	Boc-Gly	350.40

Dans un ballon de 25 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, sont déposés 2.0 équivalents de l'acide aminé *N*-protégé **70-82**. Le solide est dissout dans 8 ml de DMF anhydre sous atmosphère inerte d'azote. Après 10 minutes d'agitation à RT, 1.1 équivalents d'HOBt (1-hydroxybenzotriazole) et 1.1 équivalents de EDC (N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride) sont successivement ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est alors agité à RT durant 45 à 50 minutes. Parallèlement, 1.0 équivalent de **7-15, 69** est placé dans un ballon de 10 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, puis dissout dans 4 ml de DMF distillé.

Après ce délai, le mélange hétérogène préactivé est ajouté à la solution de **7-15, 69** dans le DMF. La solution résultante est alors agitée à RT durant 10 minutes, puis 1.0 équivalent de triéthylamine est ajouté. Cette action se traduit par l'obtention d'un mélange réactionnel trouble, qui est ensuite agité à RT pour une durée de 20 heures.

Le contrôle de l'avancement de la réaction se fait par CCM (AcOEt ou CH₂Cl₂/MeOH 8 :2). Une fois la totalité du réactif **7-15, 69** disparus sur CCM, le solvant est éliminé à l'aide du four

à boules et le résidu pâteux dissout dans 200 ml d'un mélange 1:3 H₂O/AcOEt. Phase organique et phase aqueuse sont séparées et cette dernière est extraite avec trois portions successives de 50 ml d'AcOEt. Les phases organiques réunies sont alors lavées avec, successivement, 50 ml d'une solution 1N d'acide citrique, d'une solution saturée de NaHCO₃, et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique lavée et neutralisée est séchée sur MgSO₄ anhydre, puis le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'un solide amorphe de couleur jaune orange.

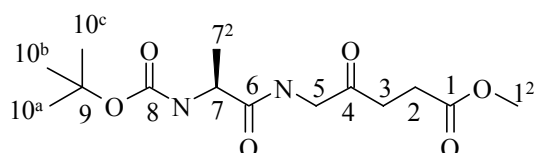
Une ou deux étapes de purification par chromatographie-éclair sur gel de silice (mélanges hexane/AcOEt de polarité croissante) sont, selon le cas, nécessaires pour la récupération du dérivé peptidique **16-34** correspondant sous sa forme cristalline

2.3.2.2.1 Synthèse de Boc-[Ala-(ALA)]-OMe (**16**)

La synthèse de **16** est effectuée selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1135 mg (2.0 éq.) de **70**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 633 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (1.0 éq.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 418 µl (1.0 éq.) de Net₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie-éclair (CH₂Cl₂-CH₂Cl₂/MeOH 1:3), récupération d'une pâte incolore.

Rendement : 767 mg (81 %).

Données analytiques de **16** :



R_f : (CH₂Cl₂/CH₃OH/H₂O : 70:30:5) : 0.71.

$[\alpha]_D^{23}$: -15.6° (λ = 589 nm, c = 0.016, CH₂Cl₂); - 59.3° (λ = 365 nm, c = 0.016, CH₂Cl₂).

IR (KBr) : 3336_w, 2979_m, 2935_w, 1723_{vs}, 1664_s, 1517_m, 1457_m, 1441_m, 1394_m, 1367_s, 1250_m, 1213_m, 1169_s, 1054_w.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.07 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(5)); 5.30 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 4.19-4.16 (*m*, 1H, HC(7)); 4.11 (*d*, ³J(5, NH) = 5.0, 2H, H₂C(5)); 3.60 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 2.71-2.67 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.59 - 2.55 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.37 (*s*, 9H, H₃C(10^a); H₃C(10^b); H₃C(10^c)); 1.30 (*d*, ³J(7, 7²) = 7.1, 3H, H₃C(7²)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 203.8 (C(4)); 173.0 (C(1)); 172.7 (C(6)); 155.3 (C(8)); 80 (C(9)); 51.7 (C(1²)); 49.9 (C(7)); 48.9 (C(5)); 34.3 (C(3)); 28.1 (C(10^a); C(10^b); C(10^c)); 27.4 (C(2)); 18.4 (C(7²)).

MS (EI, 70 eV) : 317 (29, [M + H]⁺), 261 (53), 217 (16), 145 (31), 144 (100), 140 (26), 115 (68), 88 (80), 87 (20), 70 (20).

HRMS (ESI) : calc. pour [C₁₄H₂₄N₂O₆ + Na]⁺ : 339.1526; obs. 339.1525.

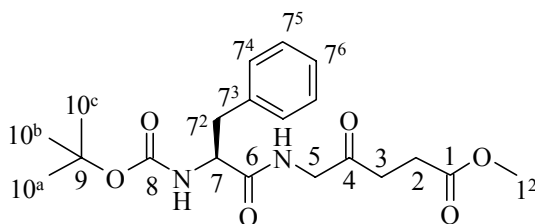
C₁₄H₂₄N₂O₆ (316.35) :	calc. :	C 53.15,	H 7.65,	N 8.86;
	obs. :	C 53.17,	H 7.91,	N 8.85.

2.3.2.2.2 Synthèse de Boc-[Phe-(ALA)]-OMe (17)

La synthèse de **17** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 2653 mg (2.0 éq.) de **71**, de 744 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 1056 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 908 mg (1.0 éq.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 697 µl (1.0 éq.) de Net₃ en une portion. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 2:1 - 1:5), récupération d'un solide cristallin sous la forme d'aiguilles blanches.

Rendement : 1550 mg (79 %).

Données analytiques de **17** :



R_f : (AcOEt) : 0.51. **F** : 83.0 - 85.0°C.

UV/VIS (MeOH) : λ_{max} = 258 nm, log(ε) = 2.32.

[α]_D²³ : - 2.0° (λ = 589 nm, c = 0.019, CH₂Cl₂); - 4.5° (λ = 365 nm, c = 0.019, CH₂Cl₂).

IR (KBr) : 3336_m, 2969_w, 1741_m, 1722_m, 1694_m, 1651_{vs}, 1525_m, 1444_w, 1390_w, 1366_m, 1249_w, 1206_m, 1172_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.17 (*m*, 5H, HC(7⁴); HC(7⁴); HC(7⁵); HC(7⁵); HC(7⁶)); 6.65 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(5)); 5.00 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 4.41 (*sbr*, 1H, HC(7)); 4.20-4.04 (*m*, 2H, H₂C(5)); 3.66 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 3.13-2.99 (*m*, 2H, H₂C(7²)); 2.70-2.66 (*m*, AA' d'un

2H, H₂C(3)); 2.61-2.54 (*m*, 3H, H₂C(2); HC(7^{2b})); 1.38 (*s*, 9H, H₃C(7^{5a}); H₃C(7^{5b}); H₃C(7^{5c})); 1.36 (*s*, 9H, H₃C(10^a); H₃C(10^b); H₃C(10^c)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 203.2 (C(4)); 172.6 (C(1)); 171.0 (C(6)); 170.7 (C(7³)); 155.3 (C(8)); 81.4 (C(7⁴)); 80.1 (C(9)); 51.7 (C(1²)); 50.6 (C(7)); 49.0 (C(5)); 37.2 (C(7²)); 34.2 (C(3)); 28.1; 27.8 (C(7^{5a}); C(7^{5b}); C(7^{5c})); C(10^a); C(10^b); C(10^c); 27.4 (C(2)).

MS (ESI) 439(21, [M+Na]⁺), 418 (20, [M+H]⁺), 417 (100, [M]^{+•}), 416 (11), 361 (16), 305 (7), 261 (4).

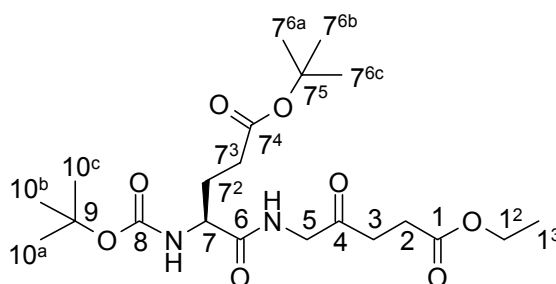
HRMS (ESI) : calc. pour [C₁₉H₃₂N₂O₈ + Na]⁺ : 439.2051; obs. 439.2053.

2.3.2.2.4 Synthèse de Boc-[Glu-(ALA)]-OEt (19)

La synthèse de **19** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 3000 mg (2.0 éq.) de **73**, de 745 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 1060 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 1000 mg (1.0 éq.) de **69** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 700 µl (1.0 éq.) de Net₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après 2 purifications par chromatographie-éclair (AcOEt/Hexane 1:5 à 1:2), récupération d'une pâte transparente.

Rendement : 1700 mg (75 %).

Données analytiques de **19** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) : 0.57.

[α]_D²³ : - 6.2° (λ = 589 nm, c = 0.628, CH₂Cl₂); - 25.8° (λ = 365 nm, c = 0.628, CH₂Cl₂).

RP-HPLC (80% MECN, C₁₈) : t_R = 4.5 min., pureté >87%.

IR (KBr) : 3355_w, 2980_m, 2933_w, 1729_{vs}, 1521_m, 1457_w, 1392_m, 1368_m, 1251_m, 1166_s, 1093_w, 1027_w.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.97 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(5)); 5.34 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 4.21-4.19 (*m*, 3H, HC(7), H₂C(5)); 4.15 (*q*, ³J(1², 1³)=7.14, 2H, H₂C(1²)); 2.76-2.73 (*m*, AA' d'un

AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.67-2.64 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 2.43-2.31 (*m*, 2H, H₂C(7²)); 2.14-2.08 (*m*, 1H, HC(7^{1a})); 1.94-1.89 (*m*, 1H, HC(7^{1b})); 1.46, 1.45 (*s*, 18H, H₃C(10^a); H₃C(10^b); H₃C(10^c), H₃C(7^{6a}); H₃C(7^{6b}); H₃C(7^{6c})); 1.26 (*t*, ³J(1³, 1²)=7.15, 3H, H₃C(1³)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 203.8 (C(4)); 173.1, 172.8, 172.2 (C(1), C(6), C(7⁴)); 156.0 (C(8)); 81.3, 80.5 (C(7⁵), C(9)); 61.2 (C(1²)); 54.5 (C(7)); 49.5 (C(5)); 34.9 (C(3)); 32.2 (C(7³)), 28.7, 28.5 (C(7²), C(7^{6a}), C(7^{6b}), C(7^{6c}), C(10^a); C(10^b); C(10^c)); 28.3 (C(2)); 14.5 (C(1³)).

MS (APCI)⁺ m/z intensité relative 468 (26), 467 (100, [M+Na]⁺).

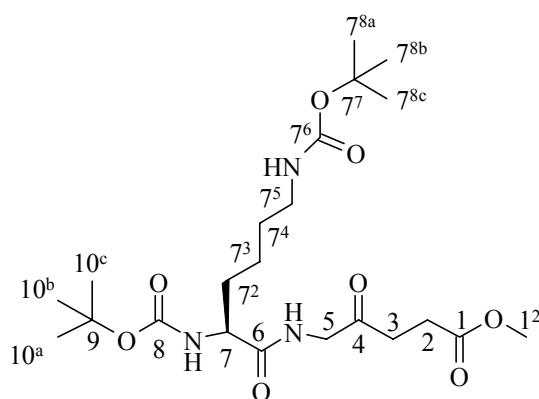
HRMS (ESI) : calc. Pour [C₂₁H₃₆N₂O₈Na]⁺ 467.2363 trouvé 467.2364.

2.3.2.2.5 Synthèse de Boc-[Lys(Boc)-(ALA)]-OMe (YB108) (20)

La synthèse de **20** est effectuée selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 2078 mg (2.0 éq.) de **74**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 633 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 50 minutes. Parallèlement, dissolution de 545 mg (1.0 éq.) de **8** dans 8 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 418 μl (1.0 éq.) de NEt₃. Agitation à RT sous Ar durant 30 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 2:1 - 1:10), récupération d'un solide compact légèrement jaune.

Rendement : 1006 mg (71 %).

Données analytiques de **20** :



R_f : (AcOEt) : 0.45. **F** : 99.0 - 100.0°C.

[α]_D²³ : - 10.5° (λ = 589 nm, c = 0.024, CH₂Cl₂); - 37.3° (λ = 365 nm, c = 0.024, CH₂Cl₂).

IR (KBr) : 3363_m, 2979_w, 2943_w, 1741_s, 1718_m, 1687_{vs}, 1652_{vs}, 1520_s, 1393_m, 1367_m, 1249_m, 1207_m, 1171_s,

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.23-4.09 (*m*, 3H, H₂C(5); HC(7)); 3.74 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 3.15-3.11 (*m*, 2H, H₂C(7²)); 2.88-2.84 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.70-2.66 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.92-1.84 (*m*, 1H, HC(7^{2a})); 1.76-1.67 (*m*, 1H, HC(7^{2b})); 1.54 (*s*, 18H, H₃C(7^{8a}); H₃C(7^{8b}); H₃C(7^{8c}); H₃C(10^a); H₃C(10^b); H₃C(10^c)); 1.64-1.40 (*m*, 4H, H₂C(7³); H₂C(7³)).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 206.4 (C(4)); 175.9 (C(1)); 175.1 (C(6)); 158.8; 158.2 (C(7⁶); C(8)); 80.9; 80.1 (C(7⁷); C(9)); 56.3 (C(7)); 52.5 (C(1²)); 49.9 (C(5)); 41.3 (C(7⁵)); 35.5 (C(3)); 33.2 (C(7²)); 30.9 (*s*, C(7⁴)); 29.1 (C(7^{8a}); C(7^{8b}); C(7^{8c}) ou C(10^a); C(10^b); C(10^c)); 29.0 (C(10^a); C(10^b); C(10^c) or C(7^{8a}); C(7^{8b}); C(7^{8c})); 28.7 (C(2)); 24.4 (C(7³)).

MS (ESI⁺) *m/z* intensité relative 475 (23, [M+H]⁺), 474 (100, [M]⁺), 418 (8), 374 (11), 318 (3), 300.

HRMS (ESI) calc. C₂₂H₃₉N₃O₈Na⁺ 496.2629; obs. 496.2631.

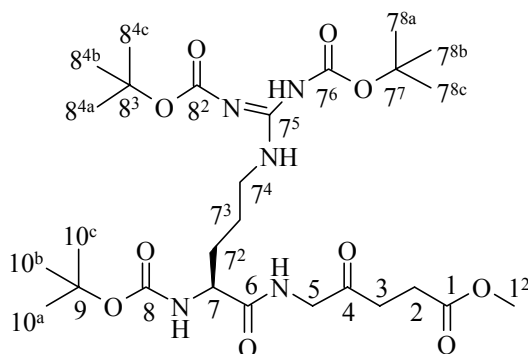
C₂₂H₃₉N₃O₈ (473.56) :	calc. :	C 55.80,	H 8.30,	N 8.87;
	obs. :	C 55.27,	H 8.40,	N 8.56.

2.3.2.2.6 Synthèse de Boc-[Arg(Boc₂)-(ALA)]-OMe (21)

La synthèse de **21** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 500 mg (1.0 équ.) de **75**, de 180 mg (1.3 équ.) d'HOBt et de 255 mg (1.3 équ.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 220 mg (1.2 équ.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 170 µl (1.2 équ.) de Net₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction, récupération d'une pâte brunâtre. Après purification par chromatographie-éclair (AcOEt/Hexane 1:3 à 2:1), récupération d'un solide jaunâtre.

Rendement : 370 mg (59 %).

Données analytiques de **21** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) : 0.69. **F** : 45-50 °C.

$[\alpha]_D^{23}$: - 8.9° ($\lambda = 589$ nm, $c = 0.564$, MeOH); - 37.2° ($\lambda = 365$ nm, $c = 0.564$, MeOH).

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : $t_R = 5.1$ min., pureté >98%.

IR (KBr) : 3350 m , 3091 w , 1862 m , 1781 vs , 1709 s , 1632 m , 1605 m , 1560 w , 1505 s , 1430 m , 1370 m , 1344 m , 1317 s , 1273 m , 1237 m , 1209 s , 1039 m , 899 s , 733 s .

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.16-4.06 (m , 3H, H₂C(5), HC(7)); 3.93-3.87 (m , H₂C(7⁴)); 3.66 (s , 3H, H₃C(1²)); 2.80-2.76 (m , AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.62-2.59 (m , BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.77-1.59 (m , 4H, H₂C(7²), H₂C(7³)); 1.57, 1.50, 1.46 (s , 9H, H₃C(10^a), H₃C(10^b), H₃C(10^c) ou H₃C(8^{4a}), H₃C(8^{4b}), H₃C(8^{4c}) ou H₃C(7^{8a}), H₃C(7^{8b}), H₃C(7^{8c})).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 204.8 (C(4)); 174.3, 173.7, C(1), C(6); 156.8, 155.1 (C(8), C(8²), C(7⁶)); 84.2, 79.6, 79.0 (C(7⁷), C(8³), C(9)); 60.5 (C(7)); 51.2 (C(1²)); 48.6 (C(5)); 44.5 (C(7³)); 34.2 (C(3)); 27.7-27.2 ((C(7¹) or C(7²)), (C(7^{8a}), C(7^{8b}), C(7^{8c}), (C(8^{4a}), C(8^{4b}), C(8^{4c}), (C(10^a), C(10^b), C(10^c)); 27.3 (C(2)), 25.3(C(7¹) or C(7²)).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 625 (32), 624 (100, [M+Na]⁺).

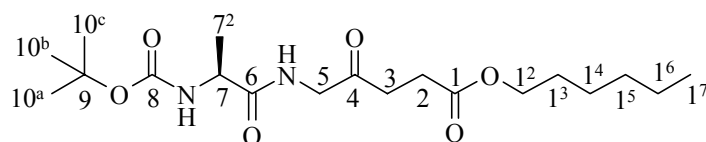
HRMS (ESI) : calc. Pour [C₂₇H₄₈N₅O₁₀]⁺ 602.3396 trouvé 602.3397.

2.3.2.2.7 Synthèse de Boc-[Ala-(ALA)]-O(CH₂)₅Me (22)

La synthèse de **22** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 977 mg (2.0 équ.) de **70**, de 446 mg (1.1 équ.) d'HOBt et de 633 mg (1.1 équ.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 384 mg (1.0 équ.) de **9** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 360 μ l (1.0 équ.) de Net₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 2:1-1:5), récupération d'une pâte jaune pâle transparente.

Rendement : 796 mg (80 %).

Données analytiques de **22** :



R_f (AcOEt) : 0.52; **F** : 47-48 °C.

$[\alpha]_D^{23}$: - 55.0° ($\lambda = 589$ nm, $c = 0.400$, CH₂Cl₂); - 14.5° ($\lambda = 365$ nm, $c = 0.400$, CH₂Cl₂).

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.22 - 4.09 (*m*, 5H, H₂C(1²), H₂C(5), HC(7)); 2.85 (*t*, ³*J*(3, 2) ≈ 6.4, 2H, H₂C(3)); 2.66 (*t*, ³*J*(2, 3) ≈ 6.4, 2H, H₂C(2)); 1.53 (*s*, 9H, H₃C(10^a); H₃C(10^b); H₃C(10^c)); 1.42 (*d*, ³*J*(7², 7) = 6.9, 3H, H₃C(7²)); 1.32 (*t*, ³*J*(1³, 1²) = 6.9, 3H, H₃C(1³)).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 206.5 (C(4)); 176.6 (C(1)); 174.6 (C(6)); 157.9 (C(8)); 80.9 (C(9)); 62.0 (C(1²)); 51.9 (C(7)); 49.9 (C(5)); 35.4 (C(3)); 29.0 (C(2)); C(10^a); C(10^b); C(10^c); 18.7 (C(7²)); 14.8 (C(1³)).

MS (DCI)⁺ *m/z* intensité relative 331(15, [M]^{+•}), 292 (19), 276 (45), 275 (100), 257 (29), 232 (51), 231 (96), 214 (21), 213 (55), 144 (16), 100 (20).

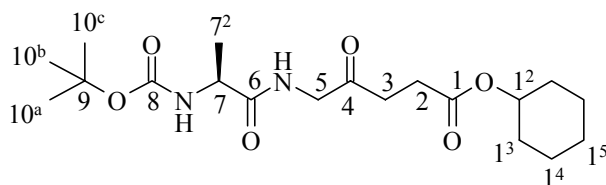
HRMS (ESI) : calc. pour [C₁₅H₂₆N₂O₈ + Na]⁺ : 353.3741; obs. 353.3739.

2.3.2.2.9 Synthèse de Boc-[Ala-(ALA)]-O(CH₂)₆ (YB206) (24)

La synthèse de **24** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1135 mg (2.0 éq.) de **70**, de 446 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 633 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 747 mg (1.0 éq.) de **10** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 418 µl (1.0 éq.) de Net₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie-éclair (hexane/AcOEt 2:1-1:5), récupération d'un solide blanc jaunâtre.

Rendement : 820 mg (72 %).

Données analytiques de **24** :



R_f : (CH₃COOCH₂CH₃) : 0.42. **F** : 146.5 °C.

[α]_D²³ : - 13.1° (λ = 589 nm, c = 0.978, CH₂Cl₂); - 50.3° (λ = 365 nm, c = 0.978, CH₂Cl₂).

IR (KBr) : 3392_s, 3280_m, 2983_w, 2972_w, 2942_m, 2858_w, 2356_{vw}, 1726_s, 1698_{vs}, 1674_m, 1647_{vs}, 1453_m, 1515_s, 1448_m, 1390_m, 1363_m, 1318_m, 1273_m, 1262_s, 1223_m, 1164_m, 1095_m, 1046_m, 1024_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.87 (*sbr*, 1H, NH); 5.06 (*sbr*, 1H, NH); 4.71 (*tt*, ³*J*(1², 1³) = (1², 1³) ≈ 4.0, ³*J*(1², 1³) = (1², 1³) = 9.1, 1H, HC(1²)); 4.23 (*q*, ³*J*(7, 7¹) = 4.7, 1H, HC(7)); 4.19-4.17 (*m*, 2H, H₂C(5)); 2.73-2.70 (*m*, 2H, AA' d'un AA'BB', H₂C(3)); 2.64-2.60 (*m*, 2H, BB' d'un AA'BB', H₂C(2)); 1.83-1.67 (*m*, 4H, H₂C(1³), H₂C(1³)); 1.59-1.31 (*m*, 6H,

$\text{H}_2\text{C}(1^4)$, $\text{H}_2\text{C}(1^4')$, $\text{H}_2\text{C}(1^5)$); 1.43 (*s*, 9H, $\text{H}_3\text{C}(10^a)$; $\text{H}_3\text{C}(10^b)$; $\text{H}_3\text{C}(10^c)$); 1.36 (*d*, $^3J(7^1, 7) = 7.1$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^1)$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 203.6 (C(4)); 172.7 (C(1)); 171.7 (C(6)); 155.3 (C(8)); 80.1 (C(9)); 73.2 (C(12)); 50.0 (C(7)); 49.1 (C(5)); 34.6 (C(3)); 31.5 (C(1³), C(1^{3'})); 28.2 (C(10^a); C(10^b); C(10^c)); 28.1 (C(2)); 25.2 (C(1⁵)); 23.7 (C(1⁴), C(1^{4'})); 18.5 (C(7²)).

MS (ESI⁺) intensité relative *m/z* : 407 (18, $[\text{M-HCl}+\text{Na}]^+$), 385 (63, $[\text{M-Cl}]^+$), 329 (88), 285 (100), 247 (37), 203 (36), 177 (15), 149 (19).

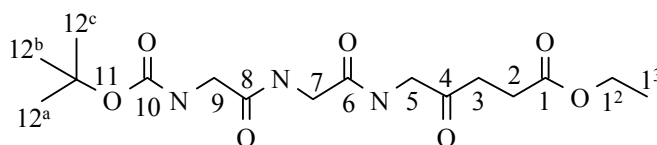
HRMS (ESI) : calc. pour $[\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_6\text{Na}]^+$: 407.4665; obs. 407.4661.

2.3.2.2.10 Synthèse de Boc-[Gly-Gly-(ALA)]-OEt (25)

La synthèse de **25** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1860 mg (2.0 éq.) de **76**, de 600 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 843 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 780 mg (1.0 éq.) de **69** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 558 μl (1.0 éq.) de Net_3 en une portion. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction en utilisant un rapport 5:1 entre la phase organique et les différentes phases aqueuses et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie-éclair ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 1 à 5%), récupération d'un solide blanc.

Rendement : 1200 mg (80 %).

Données analytiques de **25** :



R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8 :2) : 0.72. **F** : 120 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C_{18}) : $t_R = 3.6$ min., pureté >91%.

IR (KBr) : 3373*m*, 3331*m*, 3270*m*, 3059*w*, 2983*w*, 2934*w*, 1733*m*, 1708*s*, 1642*vs*, 1532*m*, 1509*m*, 1428*m*, 1392*m*, 1366*m*, 1339*w*, 1310*w*, 1240*m*, 1214*m*, 1173*m*, 1052*m*.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CD_3OD) δ 4.12 (*q*, $^3J(1^2, 1^3) = 7.14$, 2H, $\text{H}_2\text{C}(1^2)$); 4.11 (*s*, 2H, $\text{H}_2\text{C}(5)$); 3.95 (*s*, 2H, $\text{H}_2\text{C}(7)$); 3.76 (*s*, 2H, $\text{H}_2\text{C}(9)$); 2.80-2.77 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, $\text{H}_2\text{C}(3)$); 2.61-2.58 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, $\text{H}_2\text{C}(2)$); 1.47 (*s*, 9H, $\text{H}_3\text{C}(12^a)$, $\text{H}_3\text{C}(12^b)$, $\text{H}_3\text{C}(12^c)$); 1.25 (*t*, $^3J(1^3, 1^2) = 7.14$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(1^3)$).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 205.3 (C(4)); 173.3(C(1)); 172.2, 171.0 (C(6)), (C(8)); 157.7 (C(10)); 79.9 (C(11)); 60.7 (C(1²)); 48.7 (C(5)); 43.8 (C(9)); 42.3 (C(7)); 34.1 (C(3)); 27.7 (C(2)), (C(12^a)), (C(12^b)), (C(12^c)); 13.5 (C(1³)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 396 (100, [M+Na]⁺).

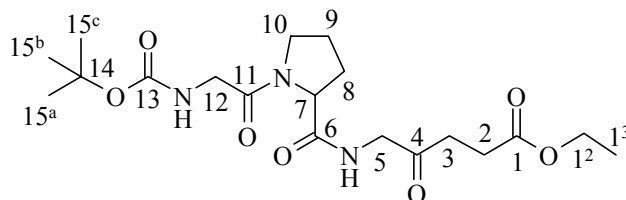
HRMS (ESI)⁺ : calc. pour [C₁₆H₂₇N₃O₄Na]⁺ 396.1741 trouvé 396.1745.

2.3.2.2.11 Synthèse de Boc-[Gly-Pro-(ALA)]-OEt (26)

La synthèse de **26** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 500 mg (1.0 éq.) de **77**, de 300 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 420 mg (1.1 éq.) de EDC dans 6 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 3600 mg (1.0 éq.) de **69** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 250 µl (1.0 éq.) de Net₃ en une portion. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction en utilisant un rapport 5:1 entre la phase organique et les différentes phases aqueuses et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie-éclair (CH₂Cl₂/MeOH 1 à 5%), récupération d'un solide blanc.

Rendement : 610 mg (80 %).

Données analytiques de **26** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) : 0.45. **F** : 123.4-123.6 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.4 min., pureté >98%.

[α]_D²³ : - 77.2° (λ = 589 nm, c = 0.906, CH₂Cl₂); - 305° (λ = 365 nm, c = 0.906, CH₂Cl₂).

IR (KBr) : 3303_m, 2979_w, 1740_m, 1706_m, 1674_{vs}, 1654_s, 1641_{vs}, 1540_m, 1460_m, 1438_m, 1412_w, 1370_w, 1352_w, 1275_m, 1254_w, 1210_m, 1168_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34 (*sbr*, 1H, NH-HC(5)); 5.49 (*sbr*, 1H, NH-HC(12)); 4.60-4.57 (*m*, 1H, HC(7)); 4.17-4.07 (*m*, 2H, H₂C(5)); 4.11 (*q*, ³J(1³,1²)=7.14, 2H, H₂C(1²)); 3.96-3.87 (*m*, 2H, H₂C(12)); 3.61-3.54 (*m*, 1H, H_AC(10)); 3.44-3.38 (*m*, 1H, H_BC(10)); 2.73-2.69 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.62-2.59 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 2.32-2.05 (*m*, 2H, H₂C(8)); 2.04-1.89 (*m*, 2H, H₂C(9)); 1.43 (*s*, 9H, H₃C(15^a), H₃C(15^b), H₃C(15^c)); 1.23 (*t*, ³J(1³,1²)=7.15, 3H, H₂C(1³)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 204.2 (C(4)), 172.8, 171.6, 169.1 (C(1), C(6), C(13)), 156.3 (C(11)), 80.1 (C(14)), 61.1 (C(1²)), 60.4 (C(7)), 49.5 (C(5)), 46.7 (C(10)), 43.5 (C(12)), 34.8 (C(3)), 28.7 (C(15^a), C(15^b), C(15^c)), 28.3 (C(8)), 28.2 (C(2)), 25.1 (C(9)), 14.5 (C(1³)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 437 (27), 436 (100, [M+Na]⁺), 380 (8), 336 (7).

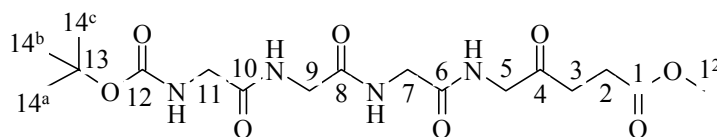
HRMS (ESI) : calc. pour [C₁₉H₃₁N₃O₇Na]⁺ 436.2054 trouvé 436.2058.

2.3.2.2.12 Synthèse de Boc-[Gly-Gly-Gly-(ALA)]-OMe (27)

La synthèse de **27** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1590 mg (2.0 éq.) de **78**, de 410 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 580 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 500 mg (1.0 éq.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 390 µl (1.0 éq.) de Net₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration et absorption du produit brut sur silice. Après purification par chromatographie-éclair (50g de gel de silice, CH₂Cl₂/MeOH 20 %), récupération d'une solide jaunâtre qui est recristallisé dans MeOH à chaud.

Rendement : 913 mg (80 %).

Données analytiques de **27** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 8:2) : 0.62. **F** : décomposition 197-198°C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.1 min., pureté >92%.

IR (KBr) : 3402_w, 3363_w, 3308_m, 2978_w, 1708_m, 1684_m, 1669_m, 1636_{vs}, 1528_m, 1440_w, 1425_w, 1366_w, 1249_w, 1179_w.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.19-8.16 (m, 1H, HN-H₂C(9 ou 7)); 8.14-8.12 (m, 1H, HN-H₂C(5)); 8.06-8.03 (m, 1H, HN-H₂C(9 ou 7)); 7.02-6.99 (m, 1H, HN-H₂C(11)); 3.97-3.95 (m, 2H, H₂C(5)); 3.76-3.74 (m, 4H, H₂C(9), H₂C(7)); 3.59-3.58 (m, 5H, H₂C(11), H₃C(1²)); 2.72-2.69 (m, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.51-2.47 (m, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.38 (s, 9H, H₃C(14^a), H₃C(14^b), H₃C(14^c)).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 206.1 (C(4)); 173.5, 170.6, 170.0, 169.9 (C(1), C(6), C(8), C(10)), 156.7 (C(12)); 79.0 (C(13)); 52.3 (C(1²)); 49.1 (C(5)); 44.2 (C(11)); 42.9, 42.7 (C(7), C(9)); 34.7 (C(3)); 29.0 (C(14^a), C(14^b), C(14^c)), 28.0 (C(2)).

MS (APCI)⁺ *m/z* intensité relative 440 (23), 439 (100, [M+Na]⁺), 483 (20).

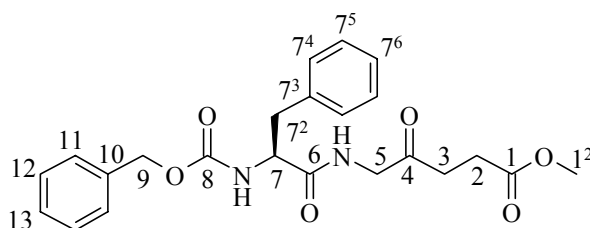
HRMS (ESI) : calc. pour $[C_{17}H_{28}N_4O_8Na]^+$ 439.1799 trouvé 439.1802.

2.3.2.2.13 Synthèse de Z-[Phe-(ALA)]-OMe (28)

La synthèse de **28** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1650 mg (2.0 éq.) de **79**, de 410 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 580 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 500 mg (1.0 éq.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 380 μ l (1.0 éq.) de Net_3 . Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction, récupération d'une pâte orangeâtre. Après purification par chromatographie-éclair (AcOEt/Hexane 1:2 à 2:1), récupération d'un solide blanc.

Rendement : 844 mg (72 %).

Données analytiques de **28** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) : 0.63. **F** : 116°C.

$[\alpha]_D^{23}$: 3.8° (λ = 589 nm, c = 0.616, CH₂Cl₂); 10.7° (λ = 365 nm, c = 0.616, CH₂Cl₂).

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.7 min., pureté >97%.

IR (KBr) : 3311_s, 3034_{vw}, 2952_{vw}, 1731_{vs}, 1690_{vs}, 1662_{vs}, 1558_m, 1539_m, 1455_w, 1436_w, 1403_m, 1362_m, 1309_w, 1263_m, 1221_m, 1176_w.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.37-7.18 (*m*, 10H, HC(7⁴); HC(7^{4'}); HC(7⁵); HC(7^{5'}); HC(7⁶), HC(11); HC(11'); HC(12); HC(12'); HC(13)); 6.76 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(5)); 5.52 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 5.11-5.03 (*m*, 2H, H₂C(9)); 4.55-4.53 (*mr*, 1H, HC(7)); 4.20- 4.05 (*m*, 2H, H₂C(5)); 3.67 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 3.14-3.03 (*m*, 2H, H₂C(7²)); 2.70-2.67 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.64- 2.60 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 203.3 (C(4)); 172.7 (C(1)); 171.1 (C(6)); 155.9 (C(8)); 136.2,136.0 (C(7³) or C(10)); 129.2 (C(7⁴), C(7^{4'})); 128.6 (C(11), C(11')); 128.4, 128.1, 127.9, 126.9 (C(7⁵), C(7^{5'}), (7⁶), C(12), C(12'), C(13)); 67.0 (C(9)); 56.0 (C(7)); 51.9 (C(1²)); 49.0 (C(5)); 38.4 (C(7²)); 34.3 (C(3)); 27.4 (C(2)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 450(25), 449(100[M+Na]⁺, 427(12), 487(16).

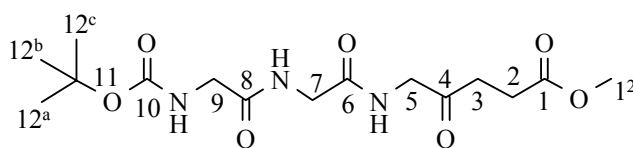
HRMS (ESI) : calc. Pour [C₂₃H₂₆N₂O₆Na]⁺ 449.1683 trouvé 449.1687.

2.3.2.2.14 Synthèse de Boc-[Gly-Gly-(ALA)]-OMe (65)

La synthèse de **65** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1860 mg (2.0 éq.) de **76**, de 600 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 843 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 750 mg (1.0 éq.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 558 µl (1.0 éq.) de Net₃ en une portion. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction en utilisant un rapport 5:1 entre la phase organique et les différentes phases aqueuses et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie-éclair (CH₂Cl₂/MeOH 1 à 5%), récupération d'un solide blanc.

Rendement : 1200 mg (82 %).

Données analytiques de **65** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 8 :2) : 0.71. **F** : 124 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.5 min., pureté >93%.

IR (KBr) : 3373*m*, 3331*m*, 3270*m*, 3059*w*, 2983*w*, 2934*w*, 1733*m*, 1708*s*, 1642*vs*, 1532*m*, 1509*m*, 1428*m*, 1392*m*, 1366*m*, 1339*w*, 1310*w*, 1240*m*, 1214*m*, 1173*m*, 1052*m*.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.18 (*s*, 2H, H₂C(5)); 4.02 (*s*, 2H, H₂C(7)); 3.83 (*s*, 2H, H₂C(9)); 3.73 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 2.88-2.84 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.69-2.66 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.54 (*s*, 9H, H₃C(12^a), H₃C(12^b), H₃C(12^c)).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 206.6 (C(4)); 173.3, 172.2, 171.0 (C(1)), (C(6)), (C(8)); 159.0 (C(10)); 81.2 (C(11)); 52.5 (C(1²)); 49.9 (C(5)); 45.1 (C(9)); 43.6 (C(7)); 35.4 (C(3)); 29.0 (C(2)), (C(12^a)), (C(12^b)), (C(12^c)); 13.5 (C(1³)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 382 (100, [M+Na]⁺).

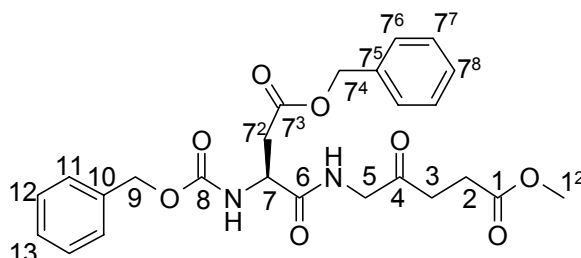
HRMS (ESI)⁺ : calc. pour [C₁₅H₂₅N₃O₄Na]⁺ 382.1473 trouvé 382.1471.

2.3.2.2.15 Synthèse de Z-[Asp(OBzl)-(ALA)]-OMe (29)

La synthèse de **29** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1960 mg (2.0 éq.) de **80**, de 410 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 580 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 500 mg (1.0 éq.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 380 μ l (1.0 éq.) de Net_3 . Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction, récupération d'une pâte orangeâtre. Après purification par chromatographie-éclair (AcOEt/Hexane 1:2 à 2:1), récupération d'un solide blanc.

Rendement : 945 mg (71 %).

Données analytiques de **29** :



R_f (AcOEt) : 0.54. **F** : 87-90 °C.

$[\alpha]_D^{23}$: - 8.6° (λ = 589 nm, c = 0.778, MeOH); - 31.1° (λ = 365 nm, c = 0.400, MeOH).

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 5.1 min., pureté >98%.

IR (KBr) : 3312_m, 3032_w, 2951_w, 1740_s, 1724_{vs}, 1697_m, 1688_m, 1648_{vs}, 1531_m, 1454_w, 1435_m, 1394_m, 1366_m, 1311_m, 1255_m, 1207_m, 1162_m, 752_m, 698_m.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.39-7.28 (*m*, 10H, HC(7⁶); HC(7^{6'}); HC(7⁷); HC(7^{7'}); HC(7⁸), HC(11); HC(11'); HC(12); HC(12'); HC(13)); 5.13-5.10 (*m*, 4H, H₂C(7⁴), H₂C(9)); 4.68-4.65 (*m*, 1H, HC(7)); 4.04 (*s*, 2H, H₂C(5)); 3.64 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 2.98-2.82 (*m*, 1H, H₂C(7^{2a})); 2.80-2.76 (*m*, 1H, H₂C(7^{2b})); 2.76-2.73 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.59-2.55 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 205.1 (C(4)); 173.8, 172.5, 171.0 (C(1)) ou (C(6)) ou (C(7³)); 157.3 (C(8)); 137.0, 136.3 (C(7⁵) or C(7¹⁰)); 128.5-127.9 (C(7⁶), C(7^{6'}), C(7⁷), C(7^{7'}), C(7⁸), C(11), C(11'), C(12), C(12'), C(13)); 66.9, 66.7 (C(7⁴), C(9)); 51.9 (C(7)); 51.2 (C(1²)); \approx 48.0 (C(5)); 36.4 (C(7²)); 34.1 (C(3)); 27.4 (C(2)).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 508.4 (33), 507.5 (100[M+Na]⁺), 483.6 (8).

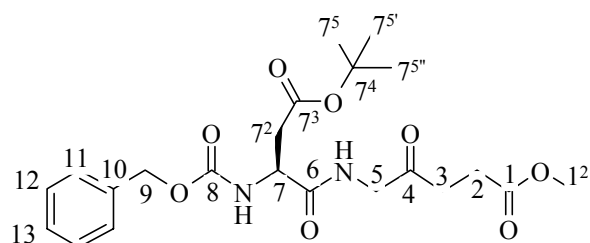
HRMS (ESI) : calc. Pour [C₂₅H₂₈N₂O₈Na]⁺ 507.1738 trouvé 507.1744.

2.3.2.2.16 Synthèse de Z-[Asp(OtBu)-(ALA)]-OMe (30)

La synthèse de **30** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1780 mg (2.0 éq.) de **81**, de 410 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 580 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 500 mg (1.0 éq.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 380 μ l (1.0 éq.) de NEt₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction, récupération d'une pâte orangeâtre. Après purification par chromatographie-éclair (AcOEt/Hexane 1:2 à 2:1), récupération d'un solide blanc.

Rendement : 860 mg (70 %).

Données analytiques de **30** :



R_f (AcOEt) : 0.48. **F** : 90-92 °C.

$[\alpha]_D^{23}$: - 14.0° (λ = 589 nm, c = 0.712, MeOH); - 51.1° (λ = 365 nm, c = 0.712, MeOH).

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.8 min., pureté >96%.

IR (KBr) : 3423_m, 3276_w, 2980_w, 2931_w, 1744_s, 1711_{vs}, 1666_s, 1528_s, 1452_w, 1435_m, 1396_m, 1368_m, 1323_m, 1290_w, 1230_s, 1202_m, 1160_m, 1057_m.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.40-7.29 (*m*, 5H, HC(11); HC(11'); HC(12); HC(12'); HC(13)); 5.17-5.08 (*m*, 2H, H₂C(9)); 4.62-4.59 (*m*, 1H, HC(7)); 4.07 (*s*, 2H, H₂C(5)); 3.66 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 2.86-2.75 (*m*, 3H, H₂C(7^{2a}), AA' d'un AA'BB', H₂C(3)); 2.64-2.57 (*m*, 3H, H₂C(7^{2b}), BB' d'un AA'BB', H₂C(2)); 1.43 (*s*, 9H, H₃C(7⁵), H₃C(7^{5'}), H₃C(7^{5''})).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 205.1 (C(4)); 173.8, 172.7, 170.4 (C(1)) ou (C(6)) ou (C(7³)); 157.3 (C(8)); 137.1 (C(7¹⁰)); 128.5-127.9 (C(11), C(11'), C(12), C(12'), C(13)); 81.4 (C(7⁴)), 66.9 (C(9)); 52.1 (C(7)); 51.2 (C(1²)); 48.9 (C(5)); 37.7 (C(7²)); 34.2 (C(3)); 27.4 (C(2)); 27.3 (C(7⁵), C(7^{5'}), C(7^{5''})).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative : 489.1 (7), 474.2 (23), 473.2 (100[M+Na]⁺).

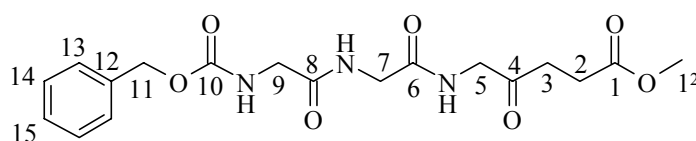
HRMS (ESI) : calc. pour [C₂₂H₃₀N₂O₈Na]⁺ 473.1894, trouvé 473.1891.

2.3.2.2.17 Synthèse de Z-[Gly-Gly-(ALA)]-OMe (31)

La synthèse de **31** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 1460 mg (2.0 éq.) de **82**, de 410 mg (1.1 éq.) d'HOBt et de 580 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 500 mg (1.0 éq.) de **8** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 380 μ l (1.0 éq.) de NEt₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, récupération d'une pâte orangeâtre. Après recristallisation à chaud dans du méthanol, récupération d'un solide blanc.

Rendement : 700 mg (65 %).

Données analytiques de **31** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 8 :2) : 0.45. **F** : 164-166 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.3 min., pureté >82%.

IR (KBr) : 3337 m , 3299 s , 3081 w , 2956 w , 1718 m , 1689 s , 1653 vs , 1551 s , 1420 m , 1381 m , 1293 m , 1248 m , 1164 w , 698 m .

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.20-8.14 (m , 2H, NH-H₂C(5), NH-H₂C(7) ou NH-H₂C(9)); 7.52-7.49 (m , 2H, NH-H₂C(7) ou NH-H₂C(9)); 7.40-7.31 (m , 5H, HC(13); HC(13'); HC(14); HC(14'); HC(15)); 5.04 (s , 2H, H₂C(11)); 3.98-3.96 (m , 2H, H₂C(5)); 3.77-3.75 (m , 2H, H₂C(7) ou H₂C(9)); 3.68-3.67 (m , 2H, H₂C(7) ou H₂C(9)); 3.57 (s , 3H, H₃C(1²)); 2.72-2.69 (m , AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.64-2.57 (m , BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 206.1 (C(4)); 173.5, 170.3, 170.0 (C(1)), (C(6)), (C(8)); 157.4 (C(10)); 137.9 (C(12)); 129.2-128.0 (C(13), C(13'), C(14), C(14'), C(15)); 66.4 (C(11)); 52.3 (C(1²)); 49.1 (C(5)); 44.4 (C(7) ou C(9)); 42.7 (C(7) ou C(9)); 34.8 (C(3)); 28.0 (C(2)).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 438 (15), 424 (11), 417 (20), 416 (100[M+Na]⁺).

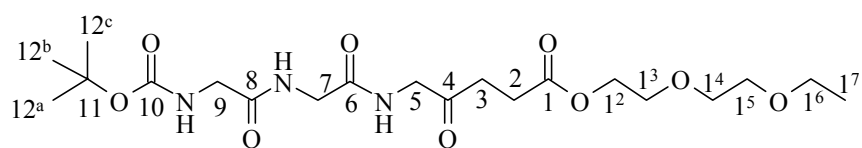
HRMS (ESI) cal pour [C₁₈H₂₃N₃O₇Na]⁺ 416.1428; trouvé 416.1428.

2.3.2.2.18 Synthèse de Boc-[Gly-Gly-(ALA)]-O((CH₂)₂O)₂Et (32)

La synthèse de **32** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 836 mg (2.0 éq.) de **76** et de 380 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 500 mg (1.0 éq.) de **14** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 250 µl (1.0 éq.) de NEt₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction, récupération d'une pâte orangeâtre. Le résidu est chromatographié (CH₂Cl₂/isopropanol 10 à 20 %), récupération d'une pâte légèrement jaune.

Rendement : 190 mg (25 %).

Données analytiques de **32** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) : 0.51 .

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.4 min., pureté >96%.

IR (KBr) : 3357s, 3333m, 2973w, 2929w, 2869w, 1715s, 1692s, 1667s, 1654vs, 1505vs, 1445m, 1426w, 1392m, 1368m, 1344m, 1254m, 1219m, 1203m, 1166m, 1133m, 1111m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.18-7.15 (*sbr*, 2H, NH-H₂C(5), NH-H₂C(7)); 5.50 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(9)); 4.24-4.22 (*m*, 2H, H₂C(1²)); 4.18-4.17 (*d*, ³J(5,NH)=4.8, 2H, H₂C(5)); 4.02 (*d*, ³J(7,NH)=5.4, 2H, H₂C(7)); 3.85-3.84 (*d*, ³J(9,NH)=4.8, 2H, H₂C(9)); 3.71-3.78 (*m*, 2H, H₂C(1³)); 3.66-3.63 (*m*, 2H, H₂C(1⁴)); 3.61-3.58 (*m*, 2H, H₂C(1⁵)); 3.54 (*q*, ³J(1⁶,1⁷)=7.02, 2H, H₂C(1⁶)); 2.76-2.73 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.69-2.66 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.45(*s*, 9H, H₃C(12^a), H₃C(12^b), H₃C(12^c)); 1.22 (*t*, ³J(1⁷,1⁶)=7.02, 3H, H₃C(1⁷)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 204.4 (C(4)); 172.8, 170.7, 169.5 (C(1), (C(6), (C(8))); 156.7 (C(10)); 80.8 (C(11)); 71.0 (C(1⁴)); 70.1 (C(1⁵)); 69.4 (C(1³)); 67.1 (C(1⁶)); 64.3 (C(1²)); 49.4 (C(5)); 44.7 (C(9)); 43.1 (C(7)); 34.8 (C(3)); 28.7 (C(12^a), C(12^b), C(12^c)); 28.2 (C(2)), 15.5(C(1⁷)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 485 (30) [M+Na+H]⁺; 484 (100) [M+Na]⁺.

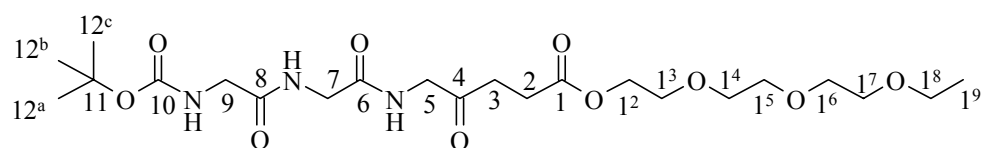
HRMS (ESI) cal pour [C₂₀H₃₅N₃O₉Na]⁺ 484.2265; trouvé 484.2266.

2.3.2.2.19 Synthèse de Boc-[Gly-Gly-(ALA)]-O((CH₂)₂O)₃Et (33)

La synthèse de **33** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 720 mg (2.0 éq.) de **76** et de 350 mg (1.1 éq.) de EDC dans 8 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 500 mg (1.0 éq.) de **15** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 210 μ l (1.0 éq.) de NEt₃. Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction, récupération d'une pâte orangeâtre. Le résidu est chromatographié (CH₂Cl₂/isopropanol 10 à 20 %), récupération d'une pâte légèrement jaune.

Rendement : 180 mg (25 %).

Données analytiques de **33** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 9:1) : 0.48.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.5 min., pureté >90%.

IR (KBr) : 3359 m , 3337 m , 2977 m , 2929 m , 2873 m , 1724 s , 1691 s , 1668 vs , 1655 vs , 1509 s , 1445 m , 1393 m , 1368 m , 1348 m , 1253 m , 1168 s , 1144 m .

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.14-7.11 (*sbr*, 2H, NH-H₂C(5), NH-H₂C(7)); 5.44 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(9)); 4.24-4.21 (*m*, 2H, H₂C(1²)); 4.19-4.18 (*d*, ³*J*(5,NH)=5.0, 2H, H₂C(5)); 4.04-4.02 (*d*, ³*J*(7,NH)=5.6, 2H, H₂C(7)); 3.86 (*s*, 2H, H₂C(9)); 3.70-3.65 (*m*, 8H, H₂C(1³), H₂C(1⁴), H₂C(1⁵), H₂C(1⁶)); 3.62-3.60 (*m*, 8H, H₂C(1⁷)); 3.55 (*q*, ³*J*(1⁸,1⁹)=7.02, 2H, H₂C(1⁸)); 2.76-2.73 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.70-2.67 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.45(*s*, 9H, H₃C(12^a), H₃C(12^b), H₃C(12^c)); 1.22 (*t*, ³*J*(1⁹,1⁸)=7.01, 3H, H₃C(1⁸)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 204.3 (C(4)); 172.7, 170.7, 169.5 (C(1), (C(6), (C(8))); 156.6 (C(10)); 80.8 (C(11)); 71.0, 70.9, 70.8, 70.1, 69.4 (C(1³), (C(1⁴)), (C(1⁵), (C(1⁶)), (C(1⁷))); 67.1 (C(1⁸)), 64.2 (C(1²)); 49.5 (C(5)); 44.7 (C(9)); 43.2 (C(7)); 34.7 (C(3)); 28.7 (C(12^a), C(12^b), C(12^c)); 28.4 (C(2)), 15.5(C(1⁷)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 529 (23) [M+Na+H]⁺; 528 (100) [M+Na]⁺.

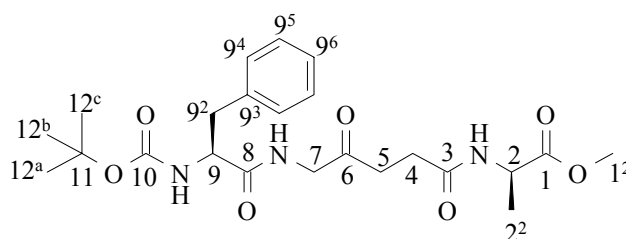
HRMS (ESI) : calc. Pour [C₂₂H₃₉N₃O₁₀Na]⁺ 528.2528 trouvé 528.2530.

2.3.2.2.20 Synthèse de Boc-[Phe-(ALA)-Ala]-OMe (34)

La synthèse de **34** s'effectue selon le Mode opératoire - Type II. Préactivation de 500 mg (1.0 éq.) de **49**, 214 mg (1.2 éq.) de HOBt et de 303 mg (1.2 éq.) de EDC dans 6 ml de DMF durant 45 minutes. Parallèlement, dissolution de 190 mg (1 éq.) de **86** dans 4 ml de DMF. Mélange des deux solutions et addition de 140 mg (1.0 éq.) de NEt_3 . Agitation à RT sous Ar durant 20 heures. Concentration, extraction, récupération d'une pâte orangée. Le résidu est chromatographié (AcOEt/Hexane 1:1 à 1:0), récupération d'une pâte légèrement jaune.

Rendement : 336 mg (55 %).

Données analytiques de **34** :



R_f (AcOEt) : 0.14. **F** : 88-92 °C.

$[\alpha]_D^{23}$: - 19.0° ($\lambda = 589 \text{ nm}$, $c = 0.669$, CH_2Cl_2); - 62.6° ($\lambda = 365 \text{ nm}$, $c = 0.669$, CH_2Cl_2).

RP-HPLC (80% MeCN, C_{18}) : $t_R = 3.6 \text{ min.}$, pureté >99%.

IR (KBr) : 3322s, 2957w, 1738m, 1692s, 1651vs, 1528s, 1453m, 1367m, 1322w, 1270w, 1251m, 1218m, 1168m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.32-7.19 (*m*, 5H, HC(9⁴); HC(9^{4'}); HC(9⁵); HC(9^{5'}); HC(9⁶)); 6.77 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(7)); 6.33 (*sbr*, 1H, NH-HC(9)); 5.09 (*sbr*, 1H, NH-HC(2)) 4.58-4.51 (*m*, 1H, HC(2)); 4.74 (*s*, 1H, HC(9)); 4.24-4.06 (*m*, 2H, H₂C(7)); 3.76 (*s*, 3H, H₃C(1²)), 3.16-2.99 (*m*, 2H, H₂C(9²)); 2.81-2.66 (*m*, 2H, H₂C(5)); 2.58-2.52 (*m*, 2H, H₂C(4)); 1.40 (*d*, $^3j(2^2,2) = 7.14$, 3H, H₃C(2²)); 1.40 (*s*, 9H, H₃C(12^a); H₃C(12^b); H₃C(12^c)).

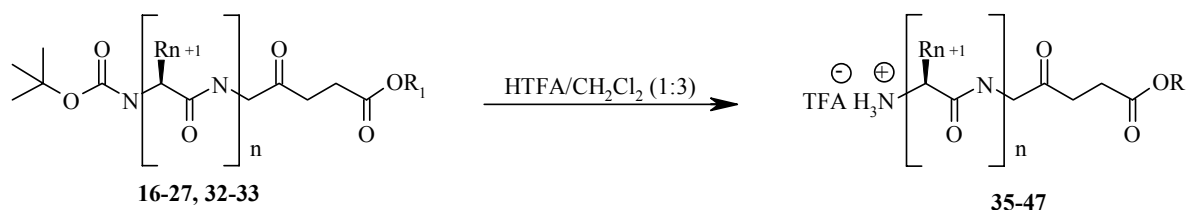
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 204.6 (C(6)); 173.9, 171.9, 171.3 (C(1), C(3),C(8)); 155.8 (C(10)); 137.0 (C(9³)); 129.7 (C(9⁴), C(9^{4'})); 129.0 (C(9⁵), C(9^{5'})); 127.3 (C(9⁶)); 80.6 (C(11)); 56.0 (C(9)); 52.9 (C(1²)); 49.5 (C(7)); 48.5(C(2)); 38.9 (C(9²)); 35.0 (C(5)); 29.0 (C(4)); 28.6 (C(12^a); C(12^b); C(12^c)); 18.7 (C(2²)).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 502 (22), 487 (25), 486 (100, [M+Na]⁺), 430 (15).

HRMS (ESI) : calc. Pour $[\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{N}_3\text{O}_7]^+$ 464.2391, trouvé 464.2395.

2.3.2.3 Déprotection de pseudo peptidiques protégés Boc contenant l'acide 5-aminolévulinique

Mode opératoire - Type III



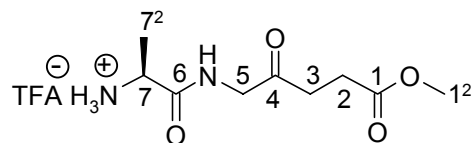
Composé	n	R ₁	R ₂	R ₃	Acides aminés	R ₄	PM [g/mol]
35	1	Me	CH ₃	-	Ala	-	330.26
36	1	H	CH ₃	-	Ala	-	316.23
37	1	Et	CH ₃	-	Ala	-	344.29
38	1	(CH ₂) ₅ Me	CH ₃	-	Ala	-	400.39
39	1	(CH ₂) ₆	CH ₃	-	Ala	-	398.37
40	1	Me	CH ₂ C ₆ H ₅	-	Phe	-	406.35
41	1	Me	(CH ₂) ₄ NH ₃ Cl	-	Lys	-	499.38
42	1	Me	CH ₂ COOH	-	Asp	-	376.28
43	2	Me	H	H	(Gly) ₂	-	387.31
44	2	Et	H	(CH ₂) ₃ -N	Gly-Pro	-	427.37
45	2	((CH ₂) ₂ O) ₂ Et	H	H	(Gly) ₂	-	475.41
46	2	((CH ₂) ₂ O) ₃ Et	H	H	(Gly) ₂	-	519.47
47	3	Me	H	H	(Gly) ₃	H	430.36

Dans un bicol de 10 ml placé sous argon et refroidi dans un bain de glace, sont placés 100 mg de **16-27**, **32-34**. 3 ml de dichlorométhane et 1 ml d'acide trifluoroacétique (TFA) sont ajoutés. La réaction est agitée à 0°C durant 30 minutes, puis elle est laissée 30 minutes à RT. L'avancement de la réaction est confirmé par CCM (CH₂Cl₂/MeOH 8:2). Le solvant est éliminé à l'aide d'une trompe à eau munie d'un piège à azote liquide. Le résidu allant d'un solide blanc à une huile brunâtre est séché à la pompe à huile. En fonction de la stabilité du produit, une étape de purification est rajoutée. Récupération d'un produit **35-47** plus ou moins stable en fonction du nombre et de la nature des acides aminés greffés.

2.3.2.3.1 Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-OMe (35)

La synthèse de **35** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **16** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte brunâtre. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **35** :



$[\alpha]_D^{23}$: - 14.7° ($\lambda = 589$ nm, $c = 0.673$, MeOH); - 54.3° ($\lambda = 365$ nm, $c = 0.673$, MeOH).

IR (KBr) : 3357 m br, 2979 m , 2931 w , 1713 vs , 1655 vs , 1558 s , 1419 m , 1394 m , 1363 s , 1248 m , 1171 m .

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.81 (t , $^3J(5, \text{NH}) = 5.6$, 1H, $\text{NH-H}_2\text{C}(5)$); 8.26 (s br, 3H, H_3N^+); 4.24 (dxd , $^3J(5, \text{NH}) = 5.7$, $^2J(5^a, 5^b) = 12.7$, 1H, $\text{HC}(5^a)$); 4.16 (dxd , $^3J(5, \text{NH}) = 5.5$, $^2J(5^a, 5^b) = 12.9$, 1H, $\text{HC}(5^b)$); 4.07 - 4.00 (m , 1H, $\text{HC}(7)$); 3.68 (s , 3H, $\text{H}_3\text{C}(1^2)$); 2.86 - 2.82 (m , AA' d'un système AA'BB', 2H, $\text{H}_2\text{C}(3)$); 2.62 (m , BB' d'un système AA'BB', 2H, $\text{H}_2\text{C}(2)$); 1.49 (d , $^3J(7, 7^2) = 7.0$, 3H, $\text{H}_3\text{C}(7^2)$).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 204.9 (C(4)); 172.9 (C(1)); 170.2 (C(6)); 51.6 (C(1²)); 48.5 (C(7)); 48.4 (C(5)); 34.2 (C(3)); 27.4 (C(2)); 17.5 (C(7²)).

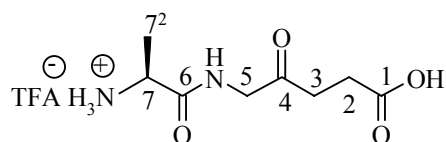
MS (ESI) m/z intensité relative 239 (4, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 217 (100, $[\text{M} + \text{H}]^+$), 199 (38), 171, 167, 146 (18).

HRMS (ESI) Calc. pour $[\text{C}_9\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_4]^+$ 217.1183; trouvé 217.1191.

2.3.2.3.2 Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-OH (**36**)

La synthèse de **36** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg dans un mélange de ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{TFA}$ 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte orangeâtre. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **36** :



IR (KBr) : 3346 m , 3227 m , 2995 m , 2927 m , 1674 vs , 1563 m , 1554 m , 1406 m , 1384 m , 1202 s , 1138 m , 724 m .

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.02 (*s*, 2H, HC(5)); 3.94 (*q*, ³*J*(7, 7²) = 7.1, 1H, HC(7)); 2.64 (*t*, ³*J*(3, 2) = 6.3, 2H, HC(3)); 2.44 (*t*, ³*J*(2, 3) = 6.3, 2H, HC(2)); 1.34 (*d*, ³*J*(7², 7) = 6.3, 1H, HC(7²)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 207.9 (C(4)); 177.2 (C(1)); 172.8 (C(6)); 49.3 (C(7)); 48.9 (C(5)); 34.4 (C(3)); 27.7 (C(2)); 16.7 (C(7²)).

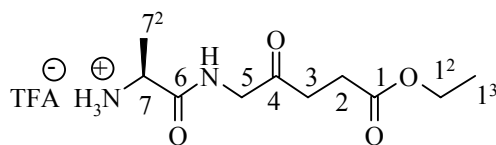
MS (ESI⁺) *m/z* intensité relative 225 (53, [M-HTFA+Na]⁺), 203 (100, [M-TFA]⁺), 185 (63), 145 (17), 132 (22).

HRMS (ESI) calc pour [C₈H₁₅N₂O₄]⁺ 203.1026; trouvé 203.1031.

2.3.2.3.3 Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-OEt (37)

La synthèse de **37** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **19** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte jaunâtre. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **37** :



R_f : (CH₂Cl₂/MeOH 5%) : 0.41.

IR (KBr) : 3353*m*, 3257*m*, 3100*m*, 2988*m*, 2600*m*, 2330*w*, 1780*m*, 1721*s*, 1678*vs*, 1558*m*, 1410*m*, 1380*m*, 1354*m*, 1204*vs*, 1178*vs*, 1028*m*, 840*m*, 800*m*, 724*m*, 707*m*.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.70 (*s*, 2H, H₂C(5)); 3.65 (*q*, ³*J*(7, 7²) = 7.08, 1H, HC(7)); 3.59 (*q*, ³*J*(1², 1³) = 7.17, 2H, H₂C(1²)); 2.33 (*t*, ³*J*(3, 2) ≈ 6.4, 2H, H₂C(3)); 2.08 (*t*, ³*J*(2, 3) ≈ 6.4, 2H, H₂C(2)); 1.05 (*d*, ³*J*(7², 7) = 7.12, 3H, H₃C(7²)); 0.69 (*t*, ³*J*(1³, 1²) = 7.16, 3H, H₃C(1³)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 206.7 (C(4)); 174.4 (C(1)); 170.5 (C(6)); 61.3 (C(1²)); 48.6 (C(7)); 48.1 (C(5)); 33.7 (C(3)); 27.2 (C(2)); 16.0 (C(7²)); 12.7 (C(1³)).

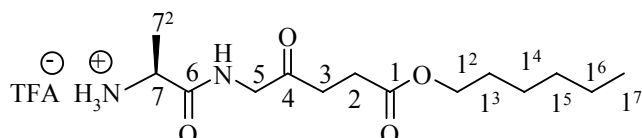
MS (ESI⁺) : 253 (18, [M-HTFA+Na]⁺), 231 (100, [M-TFA]⁺), 213 (9), 185 (5), 169 (20)

HRMS (ESI) calc pour [C₁₀H₁₈N₂O₄]⁺ 231.2739; trouvé 231.2735.

2.3.2.3.4 Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-O(CH₂)₅Me (38)

La synthèse de **38** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **22** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte jaune pâle. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **38** :



IR (KBr) : 3096 m , 2961 m , 2936 m , 2864 m , 1724 s , , 1667 vs , 1562 m , 1470 m , 1402 m , 1359 m , 1204 vs , 724 m , 492 m .

1H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 3.66-3.65 (AB-système, $^2J \approx 18.4$, 2H, H₂C(5)); 3.63 (q, $^3J(7, 7^2) = 7.3$, 1H, HC(7)); 3.47 (t, $^3J(1^2, 1^3) = 6.7$, 2H, H₂C(1²)); 2.25-2.22 (m, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.04-2.01 (m, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.05-0.96 (m, 2H, H₂C(1³)); 1.01 (d, $^3J(7^2, 7) = 7.1$, 3H, H₃C(7²)); 0.80-0.73 (m, 6H, H₂C(1⁴); H₂C(1⁵); H₂C(1⁶)); 0.32 (t, $^3J(1^7, 1^6) = 6.8$, 3H, H₃C(1⁷)).

13C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 205.5(C(4)); 173.8 (C(1)); 170.4 (C(6)); 64.8 (C(1²)); 48.6 (C(7)); 48.1 (C(5)); 33.5 (C(3)); 30.7 (C(1⁵)); 27.6 (C(1³)); 26.8 (C(2)); 24.7 (C(1⁴)); 21.7 (C(1⁶)); 16.0 (C(7²)); 12.7 (C(1⁷)).

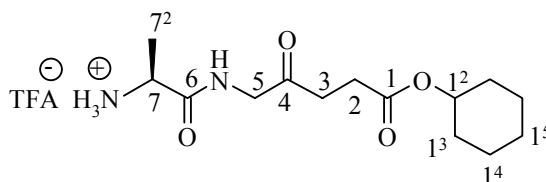
MS (ESI+) m/z intensité relative 309 (12, [M-HTFA+Na]⁺), 287 (100, [M-TFA]⁺), 269 (6), 216 (6).

HRMS (ESI) cal pour [C₁₄H₂₇N₂O₄]⁺ 287.3822; trouvé 287.3819.

2.3.2.3.5 Synthèse de H-[Ala-(ALA)]-O(CH₂)₆ (39)

La synthèse de **39** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **24** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte jaune pâle. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **39** :



IR (KBr) : 3347 m , 3098 m , 2942 s , 2865 m , 2725 m , 2568 m , 1922 m , 1782 s , 1713 s , 1699 s , 1652 s , 1558 m , 1505 m , 1471 m , 1456 m , 1411 m , 1332 m , 1173 vs , 1038 m , 1011 m , 843 m , 814 m , 799 m , 784 m , 725 m , 706 m .

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.03 (*txt*, $^3J(1^2, 1^3) = (1^2, 1^3) \approx 4.0$, $^3J(1^2, 1^3) = (1^2, 1^3) = 8.7$, 1H, HC(1²)); 3.55 (*s*, 2H, H₂C(5)); 3.52 (*q*, $^3J(7, 7^2) = 7.1$, 1H, HC(7)); 2.13 (*t*, $^3J(3, 2) = 6.5$, 2H, H₂C(3)); 1.92 (*t*, $^3J(2, 3) = 6.5$, 2H, H₂C(2)); 1.19-0.94 (*m*, 4H, H₂C(1³), H₂C(1^{3'})); 0.90 (*d*, $^3J(7^2, 7) = 7.1$, 3H, H₃C(7²)); 0.83-0.58 (*m*, 6H, H₂C(1⁴), H₂C(1^{4'}), H₂C(1⁵)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 205.6 (C(4)); 173.1 (C(1)); 170.3 (C(6)); 73.2 (C(1²)); 48.6 (C(7)); 48.0 (C(5)); 33.5 (C(3)); 30.3 (C(1³), C(1^{3'})); 27.3 (C(2)); 24.3 (C(1⁵)); 22.5 (C(1⁴), C(1^{4'})); 15.9 (C(7²)).

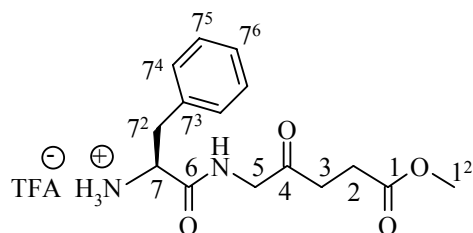
MS (ESI⁺) : 307 (67, [M-HTFA+Na]⁺), 285 (100, [M-TFA]⁺), 267 (7), 203 (7), 185 (4).

HRMS (ESI) cal pour [C₁₄H₂₅N₂O₄]⁺ 285.3625; trouvé 285.3624.

2.3.2.3.6 Synthèse de H-[Phe-(ALA)]-OMe (40)

La synthèse de **40** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **17** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte jaune pâle. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **40** :



IR (KBr) : 3067m, 2961m, 2364w, 1729s, 1674vs, 1556m, 1499m, 1441m, 1366m, 1203vs, 1178vs, 800m, 723m, 704m.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 7.19-7.07 (*m*, 5H, HC(7⁴); HC(7^{4'}); HC(7⁵); HC(7^{5'}); HC(7⁶)); 4.10 (*t* ³*J*(7, 7²) = 7.3, 1H, HC(7)); 3.91-3.90 (*AB*-système, ²*J* ≈ 18.5, 2H, H₂C(5)); 3.44 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 3.02 (*dxd*, ²*J*(7²_a, 7²_b) = 14, ³*J*(7²_a, 7) = 7.1, 1H, HC(7²_a)); 2.96 (*dd*, ²*J*(7²_b, 7²_a) = 14, ³*J*(7²_b, 7) = 7.1, 1H, HC(7²_b)); 2.53-2.48 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.39- 2.36 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 207.5 (C(4)); 175.7 (C(1)); 169.4 (C(6)); 134.0 (C(7³)); 129.7; 129.4 ((C(7⁴); 7^{4'}; 7⁵; 7^{5'})); 128.2 (C(7⁶)); 54.6 (C(7)); 52.7 (C(1²)); 48.8 (C(5)); 37.1 (C(7²)); 34.3 (C(3)); 27.6 (C(2)).

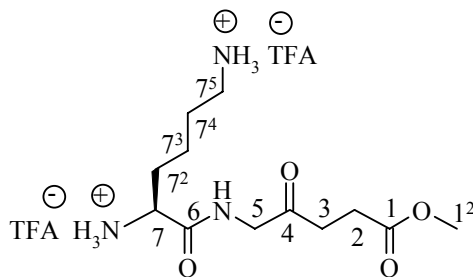
MS (ESI⁺) *m/z* intensité relative 315 (43, [M-TFA]⁺), 293 (100, [M-HTFA+Na]⁺), 275 (15), 120 (8).

HRMS (ESI) cal pour [C₁₅H₂₁N₂O₄]⁺ 293.3419; trouvé 293.3417.

2.3.2.3.7 Synthèse de H-[Lys-(ALA)]-OMe (41)

La synthèse de **41** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **20** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte orangeâtre. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **41** :



IR (KBr) : 3090 m , 2964 m , 1782 m , 1729 m , 1677 s , 1444 m , 1175 vs , 725 m , 708 m .

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.01 (d , $^2J(5_a, 5_b) = 18.8$, 1H, HC(5_a)); 3.91 (d , $^2J(5_b, 5_a) = 18.8$, 1H, HC(5_b)); 3.79 (t , $^3J(7, 7^2) = 6.6$ 1H, HC(7)); 3.38 (s , 3H, H₃C(1²)); 2.72 (t , $^3J(7^5, 7^4) = 7.6$, 2H, H₂C(7⁵)); 2.58-2.55 (m , AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.37-2.34 (m , BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.68-1.62 (m , 2H, H₃C(7²)); 1.44 ($quin.$, $^3J(7^4, 7^5) = (7^4, 7^3) = 6.6$ 2H, H₂C(7⁴)); 1.26-1.17 (m , 2H, H₂C(7³)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 209.6 (C(4)); 177.9 (C(1)); 172.3 (C(6)); 55.4 (C(7)); 54.7 (C(1²)); 51.0 (C(5)); 41.4 (C(7⁵)); 36.6 (C(3)); 32.7 (C(7²)); 29.8 (C(2)); 28.7 (C(7⁴)); 23.5 (C(7³)).

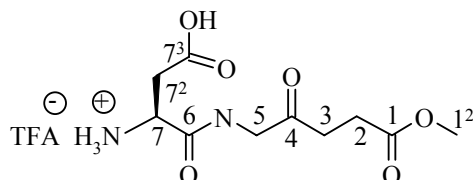
MS (ESI⁺) m/z intensité relative 296 (5, [M-2HTFA+Na]⁺), 274 (100, [M-2TFA-H]⁺), 256, (34), 239 (9), 211 (3).

HRMS (ESI) cal pour [C₁₂H₂₃N₂O₄Na]⁺ 296.3212; trouvé 296.3216.

2.3.2.3.8 Synthèse de H-[Asp-(ALA)]-OMe (42)

La synthèse de **42** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **18** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte brunâtre. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **42** :



IR (KBr) : 3084_m, 1723_s, 1678_{vs}, 1442_m, 1412_w, 1203_{vs}, 1140_s, 801_m, 724_m.

¹H-NMR (400 MHz, D₂O) δ 4.22 (*dd*, ³*J*(7, 7^{2a}) = 5.1, ³*J*(7, 7^{2b}) = 7.5, 1H, HC(7)); 4.03-3.99 (*AB* système, ²*J* ≈ 18.3, 2H, H₂C(5)); 3.44 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 2.89 (*dd*, ²*J*(7^{2a}, 7^{2b}) = 18.1, ³*J*(7^{2a}, 7) = 5.1, 1H, HC(7^{2a})); 2.83 (*dd*, ²*J*(7^{2b}, 7^{2a}) = 18.1, ³*J*(7^{2b}, 7) = 5.1, 1H, HC(7^{2b})); 2.65-2.62 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.44-2.41 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) δ 207.6 (C(4)); 175.8 (C(1)); 172.7(C(6)); 169.1 (C(7³)); 52.6 (C(1²)); 49.7 (C(7)); 49.0 (C(5)); 35.0 (C(7³)); 34.4 (C(3)); 27.6 (C(2)).

MS (ESI⁺) *m/z* intensité relative 283 (39, [M-HTFA+Na]⁺), 261 (100, [M-TFA]⁺), 243 (65), 225 (9), 183 (13), 146 (5).

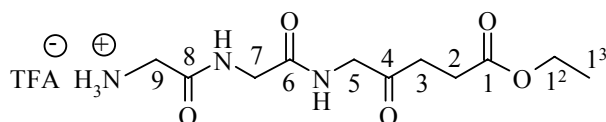
HRMS (ESI) cal pour [C₁₀H₁₉N₂O₆]⁺ 263.2699; trouvé 296.2701.

2.3.2.3.9 Synthèse de H-[Gly-Gly-(ALA)]-OEt (43)

La synthèse de **43** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **25** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, récupération d'un solide blanc jaune pâle. Le solide est dissout dans un minimum de méthanol, la recristallisation est favorisée par adjonction d'éther. Filtration, séchage du produit, récupération d'un solide blanc.

Rendement : 123 mg (84 %).

Données analytiques de **43** :



F : 127 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 2.6 min., pureté >94%.

IR (KBr) : 3350m, 3008m, 2917m, 1713vs, 1653vs, 1531m, 1426m, 1350w, 1308m, 1266m, 1197s, 1182s, 1129m, 1005m, 841m, 802m, 726m, 567m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.13 (s, 2H, H₂C(5)); 4.12 (q, ³J(1², 1³)=7.14, 2H, H₂C(1²)); 4.02 (s, 2H, H₂C(7)); 3.78 (s, 2H, H₂C(9)); 2.80-2.77 (m, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.62-2.58 (m, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.25 (t, ³J(1³, 1²)=7.14, 3H, H₃C(1³)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 205.2 (C(4)); 173.4, 170.6, 167.1 (C(1)), (C(6)), (C(8)); 60.7 (C(1²)); 48.7 (C(5)); 42.1 (C(7)); 40.5 (C(9)); 34.2 (C(3)); 27.7 (C(2)); 13.5 (C(1³)).

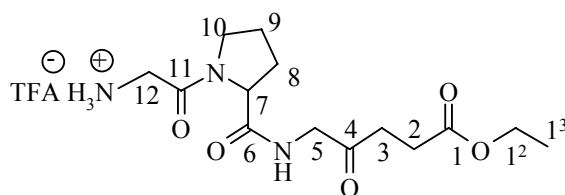
MS (ESI⁺) m/z intensité relative 296 (7, [M-HTFA+Na]⁺), 275 (5) 274 (100, [M-TFA]⁺), 217 (5), 179 (4).

HRMS (ESI) : calc. pour [C₁₁H₂₀N₃O₅]⁺ 274.1397 trouvé 274.1397.

2.3.2.3.10 Synthèse de H-[Gly-Pro-(ALA)]-OEt (44)

La synthèse de **44** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **26** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage et récupération quantitative d'une huile jaune pâle.

Données analytiques de **44** :



[α]_D²³ : - 56.3° (λ = 589 nm, c = 0.206, MeOH); - 196.1° (λ = 365 nm, c = 0.206, MeOH).

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 2.8 min., pureté >87%.

IR (KBr) : 3426m, 2988m, 1725s, 1675vs, 1540m, 1472m, 1429w, 1370w, 1354w, 1204s, 1136m.

¹H-NMR (400 MHz, MeOH) δ 4.56-4.49 (m, 1H, HC(7)); 4.16 (s, 2H, H₂C(5)); 4.11 (q, ³J(1³, 1²)=7.2, 2H, H₂C(1²)); 3.92 (s, 2H, H₂C(12)); 3.69-3.52 (m, 2H, H₂C(10)); 2.80-2.77 (m,

AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.63-2.58 (m, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 2.43-2.24 (m, 2H, H₂C(8)); 2.14-1.98 (m, 2H, H₂C(9)); 1.25 (t, ³J(1³,1²)=7.15, 3H, H₂C(1³)).

¹³C-NMR (100 MHz, MeOH) δ 205.2 (C(4)), 173.6, 173.4, (C(1), C(6)), 165.3 (C(11)), 60.7 (C(1²)), 60.6 (C(7)), 48.8 (C(5)), 46.6 (C(10)), 40.5 (C(12)), 34.1 (C(3)), 29.9 (C(8)), 27.7 (C(2)), 24.5 (C(9)), 13.5 (C(1³)).

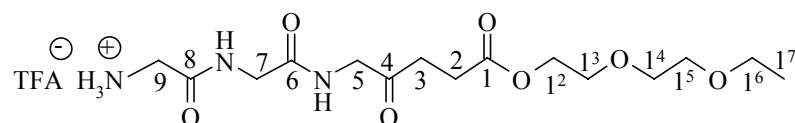
MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 336 (7, [M-HTFA+Na]⁺), 315 (57), 314 (100, [M-TFA]⁺).

HRMS (ESI) cal pour [C₁₄H₂₄N₃O₅]⁺ 314.1710; trouvé 314.1712.

2.3.2.3.11 Synthèse de H-[Gly-Gly-(ALA)]- O((CH₂)₂O)₂Et (45)

La synthèse de **45** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **32** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte jaune pâle. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **45** :



RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 2.8 min., pureté >93%.

IR (KBr) : 3336m, 3236m, 3091m, 2928m, 2869m, 1721s, 1676vs, 1640vs, 1553m, 1484m, 1432m, 1367m, 1347m, 1208vs, 1170s, 1132s, 836m, 723m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.33 (sbr, 1H, NH-H₂C(7)); 7.98-7.90 (sbr, 4H, NH-H₂C(5), NH₃-H₂C(9)); 4.19 (s, 2H, H₂C(1²)); 4.12 (s, 2H, H₂C(5)); 4.00 (s, 2H, H₂C(7)); 3.89 (s, 2H, H₂C(9)); 3.69-3.67 (m, 2H, H₂C(1³)); 3.64-3.63 (m, 2H, H₂C(1⁴)); 3.60-3.58 (m, 2H, H₂C(1⁵)); 3.54 (q, ³J(1⁶,1⁷)=7.02, 2H, H₂C(1⁶)); 2.75-2.72 (m, 2H, H₂C(3)); 2.63-2.59 (m, 2H, H₂C(2)); 1.20 (t, ³J(1⁷,1⁶)=7.01, 3H, H₃C(1⁷)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 205.8 (C(4)); 173.6, 170.7, 168.0 (C(1), (C(6), (C(8))); 161.1 (q, ³J(CCF₃)=37, F₃C-C(TFA)); 115.0 (q, ²J(CF₃)=285, F₃C(TFA)); 70.8 (C(1⁴)); 69.9 (C(1⁵)); 69.2 (C(1³)); 67.0 (C(1⁶)); 64.3 (C(1²)); 49.2 (C(5)); 42.3 (C(7)); 41.5 (C(9)); 34.6 (C(3)); 28.0 (C(2)), 15.3 (C(1⁷)).

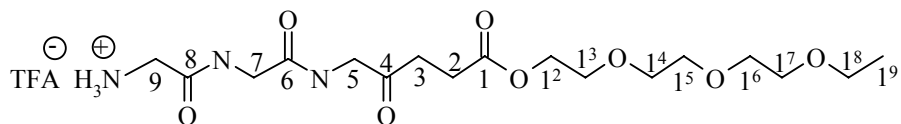
MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 424 (30); 403 (41); 402 (100) [M-HTFA+K]⁺.

HRMS (ESI) : calc. Pour [C₁₅H₂₈N₃O₇]⁺ 362.1922 trouvé 362.1925.

2.3.2.3.12 Synthèse de H-[Gly-Gly-(ALA)]- O((CH₂)₂O)₃Et (46)

La synthèse de **46** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **33** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte jaune pâle. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **46** :



RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 2.9 min., pureté >94%.

IR (KBr) : 3326_m, 3236_w, 3090_w, 2927_m, 2873_m, 1723_s, 1673_s, 1639_{vs}, 1208_{vs}, 1170_s, 1141_s.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (*sbr*, 2H, NH-H₂C(7)); 7.87 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(5)); 7.71 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(9)); 4.22 (s, 2H, H₂C(1²)); 4.16 (s, 2H, H₂C(5)); 4.07 (s, 2H, H₂C(7)); 3.95 (s, 2H, H₂C(9)); 3.70-3.64 (m, 10H, H₂C(1³), H₂C(1⁴), H₂C(1⁵), H₂C(1⁶), H₂C(1⁷)); 3.59 (q, ³J(1⁸,1⁹)=7.02, 2H, H₂C(1⁸)); 2.77-2.75 (m, 2H, H₂C(3)); 2.64-2.62 (m, 2H, H₂C(2)); 1.20 (t, ³J(1⁹,1⁸)=7.03, 3H, H₃C(1⁸)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 205.8 (C(4)); 173.8, 171.3, 168.0 (C(1), (C(6), (C(8))); 160.4 (q, ³J(CCF₃)=40, F₃C-C(TFA)); 115.0 (q, ²J(CF₃)=284, F₃C(TFA)); 70.5, 70.4, 70.3, 69.6, 69.4 (C(1³), (C(1⁴), (C(1⁵), (C(1⁶), (C(1⁷)); 67.2 (C(1⁸)), 64.1 (C(1²)); 49.3 (C(5)); 43.0 (C(9)); 43.0 (C(7)); 34.6 (C(3)); 27.9 (C(2)), 14.9 (C(1⁷)).

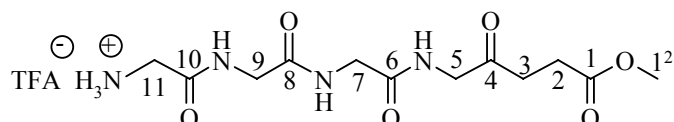
MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 469, 468, 447, 446 (100, [M-TFA+K]⁺, 406 (11, [M-TFA]⁺

HRMS (ESI) : calc. Pour [C₁₇H₃₂N₃O₈]⁺ 406.2205 trouvé 406.2201.

2.3.2.3.13 Synthèse de H-[Gly-Gly-Gly-(ALA)]-OMe (47)

La synthèse de **47** s'effectue selon le Mode opératoire - Type III. Dissolution de 100 mg de **27** dans un mélange de (CH₂Cl₂/TFA 3:1). La réaction est laissée 30 minutes à 0°C, puis à 30 minutes à température ambiante. Concentration, séchage du produit, récupération d'une pâte jaune pâle. La réaction est quantitative.

Données analytiques de **47** :



F : 78-82 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.4 min., pureté >89%.

IR (KBr) : 3323_m, 3084_w, 1726_m, 1677_{vs}, 1545_m, 1412_w, 1370_w, 1204_s, 1136_m.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.12 (s, 2H, H₂C(5)); 4.00 (s, 2H, H₂C(9)); 3.96 (s, 2H, H₂C(7)); 3.78 (s, 2H, H₂C(11)); 3.67 (m, 3H, H₃C(1²)); 2.81-2.77 (m, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.63-2.60 (m, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)).

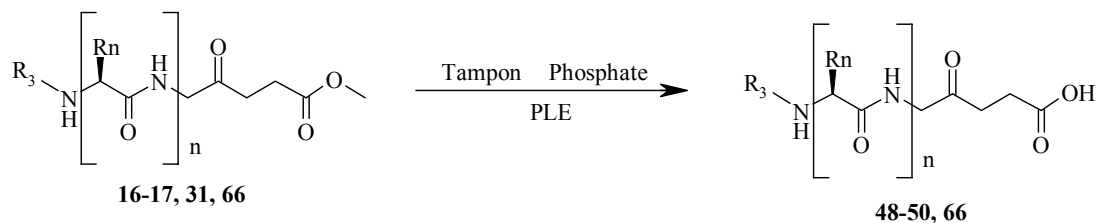
¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 205.3 (C(4)); 173.9, 170.9, 170.8, 167.2 (C(1), C(6), C(8), C(10)); 160.4 (q, ³J(CCF₃)=40, F₃C-C(TFA)); 115.0 (q, ²J(CF₃)=284, F₃C(TFA)); 51.2 (C(1²)); 48.6 (C(5)); 42.6 (C(9)); 42.2 (C(7)); 40.5(C(11)); 34.1 (C(3)); 27.4 (C(2)).

MS (ESI⁺) m/z intensité relative 358 (100, [M-TFA+Na+H₂O]⁺), 357 (52, [M-HTFA+Na+H₂O]⁺), 341 (6, [M-HTFA+Na]⁺), 318 (19), 203(7).

HRMS (ESI) cal pour [C₁₂H₂₁N₄O₆]⁺ 317.1456; trouvé 317.1450.

2.3.2.4 Déprotection enzymatique de l'ester méthylique

Mode opératoire - Type IV



Composé	n	R ₁	R ₂	Acides aminés	R ₃	PM [g/mol]
48	1	CH ₃	-	Gly	Boc	302.33
49	1	CH ₂ C ₆ H ₅	-	Phe	Boc	378.42
50	2	H	H	(Gly) ₂	Boc	345.35
66	2	H	H	(Gly) ₂	Z	345.35

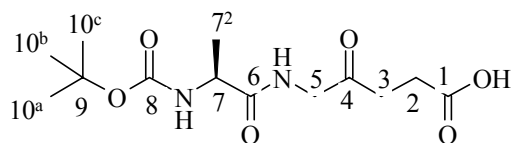
Dans un erlenmeyer de 100 ml sont dissous 200 mg de **16-17, 68** dans 40 ml de solution tampon phosphate (Phosphate Buffer). 200 µl (750 units) de la solution enzymatique de PLE (**Pig Liver Esterase** (*estérase de foie de porc*); 15 mg de protéine/ml, 250 units/mg protéine) sont alors ajoutés en une portion à la solution incolore. La libération de l'acide est suivie par titration au pH-stat (pH = 8.0) à l'aide d'une solution 0.1N de NaOH. Le mélange réactionnel est agité à RT durant 48 heures. L'avancement de la réaction d'hydrolyse est confirmé par CCM (CH₂Cl₂/CH₃OH/H₂O 70:30:5 et AcOEt). Le pH est alors baissé à 1.5 à l'aide d'HCl 32%, la solution est saturée à l'aide de NaCl et elle est extraite avec trois portions successives de 75 ml d'AcOEt. Les phases organiques réunies sont ensuite séchées sur MgSO₄ anhydre puis concentrées à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, isolement du produit brut. Il est ensuite purifiée par chromatographie-éclair sur gel de silice ou par recristallisation en fonction du produit obtenu **48-50**.

2.3.2.4.1 Synthèse de Boc-[Ala-(ALA)]-OH (**48**)

La synthèse de **48** s'effectue selon le Mode opératoire - Type IV. Déprotection de 200 mg de **16** à l'aide de PLE, en solution dans un tampon phosphate. La réaction est arrêtée après 48 heures. Extraction, séchage du produit, récupération d'une pâte, qui est purifiée par chromatographie-éclair (AcOEt, puis MeOH). Isolement d'une pâte incolore.

Rendement : 170 mg (88%).

Données analytiques de **48** :



R_f (AcOEt/hexane/CH₃COOH : 100:20:1) 0.67. **F** : 97.0 - 98.0°C.

[α]_D²³ : - 27.0° (λ = 589 nm, c = 0.700, MeOH); - 91.4° (λ = 365 nm, c = 0.700, MeOH).

IR (KBr) : 3357mbr, 2981m, 2934w, 1718vs, 1665vs, 1561s, 1413m, 1394m, 1368s, 1251m, 1168s.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.26-4.13 (*m*, 3H, H₂C(5); HC(7)); 2.80 - 2.75 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.64-2.60 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.53 (*s*, 9H, H₃C(10^a); H₃C(10^b); H₃C(10^c)); 1.43 (*d*, ³*J*(7, 7²) = 7.2, 3H, H₃C(7²)).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 179.7 (C(1)); 176.6 (C(6)); 157.9 (C(8)); 81.0 (C(9)); 51.9 (C(7)); 50.2 (C(5)); 36.2 (C(3)); 31.0 (C(2)); 29.0 (C(10^a); C(10^b); C(10^c)); 18.8 (C(7²)).

MS (APCI) *m/z* intensité relative 304 (17, [M+H]⁺), 303 (81, [M]⁺), 247 (100), 229 (12), 203 (10)

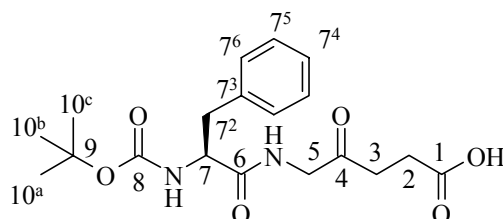
Anal. (C₁₃H₂₂N₂O₆) C, H, N.

2.3.2.4.2 Synthèse de Boc-[Phe-(ALA)]-OH (**49**)

La synthèse de **49** s'effectue selon le Mode opératoire - Type IV. Déprotection de 800 mg de **17** à l'aide de PLE, en solution dans un tampon phosphate. La réaction est arrêtée après 7 jours. Extraction, séchage du produit, récupération d'une pâte, qui est purifiée par chromatographie-éclair (CH₂Cl₂/MeOH 15%). Isolement d'un solide très légèrement brun.

Rendement : 650 mg (84%).

Données analytiques de **49** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 8:2) : 0.38. **F** : 42-47 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.5 min., pureté >93%.

IR (KBr) : 3328*m*, 2979*m*, 1718*vs*, 1654*s*, 1527*m*, 1455*m*, 1394*m*, 1368*m*, 1251*m*, 1167*s*, 701*m*.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.30-7.19 (*m*, 5H, HC(7⁴); HC(7⁴); HC(7⁵); HC(7⁵); HC(7⁶)); 7.05 (*sbr*, 1H, NH-H₂C(5)); 5.31 (*sbr*, 1H, NH-HC(7)); 4.54 (*s*, 1H, HC(7)); 4.18-4.07 (*m*, 2H, H₂C(5)); 3.20 - 3.00 (*m*, 2H, H₂C(7²)); 2.70-2.62 (*m*, 4H, H₂C(3), H₂C(2)); 1.38 (*s*, 9H, H₃C(10^a); H₃C(10^b); H₃C(10^c)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 204.3 (C(4)); 176.3, 172.4 (C(1), C(6)); 156.1 (C(8)); 136.9 (C(7³)); 129.7 (C(7⁴), C(7⁴)); 129.0 (C(7⁵), C(7⁵)); 127.3 (C(7⁶)); 81.0 (C(9)); 55.9 (C(7)); 49.4 (C(5)); 39.0 (C(7²)); 34.7 (C(3)); 28.6 (C(10^a); C(10^b); C(10^c)); 27.9 (C(2)).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 402 (22), 401 (100, [M+Na]⁺), 345 (8).

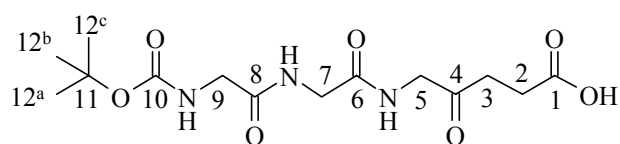
HRMS (ESI) : calc. Pour [C₁₉H₂₆N₂O₆Na]⁺ 401.1683 trouvé 401.1687.

2.3.2.4.3 Synthèse de Boc-[Gly-Gly-(ALA)]-OH (50)

La synthèse de **50** s'effectue selon le Mode opératoire - Type IV. Déprotection de 335 mg de **68** à l'aide de PLE, en solution dans un tampon phosphate. La réaction est arrêtée après 2 ou 3 jours. Extraction, séchage du produit, récupération d'une pâte, qui est purifiée par recristallisation, en dissolvant le solide dans un minimum de méthanol et en ajoutant de l'éther pour le faire recristalliser. Isolement d'un solide blanc.

Rendement : 260 mg (82%).

Données analytiques de **50** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 8 :2) : 0.30 (traîne). **F** : 139-142 °C (décomposition).

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 2.9 min., pureté >93%.

IR (KBr) : 3365*m*, 2981*w*, 1718*s*, 1684*vs*, 1658*vs*, 1532*s*, 1417*m*, 1368*m*, 1298*m*, 1247*m*, 1173*m*.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.11 (*s*, 2H, H₂C(5)); 3.95 (*s*, 2H, H₂C(7)); 3.76 (*s*, 2H, H₂C(9)); 2.80-2.74 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.62-2.57 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.47 (*s*, 9H, H₃C(12^a), H₃C(12^b), H₃C(12^c)).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 205.4 (C(4)); 175.1 (C(1)); 172.2, 171.0 (C(6)), (C(8)); 157.7 (C(10)); 79.9 (C(11)); 48.7 (C(5)); 43.8 (C(9)); 42.3 (C(7)); 34.1 (C(3)); 27.7 (C(12^a)), (C(12^b)), (C(12^c)); 27.5 (C(2)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 345 (16), 344 (100, [M-H]⁺), 284(19), 270(14).

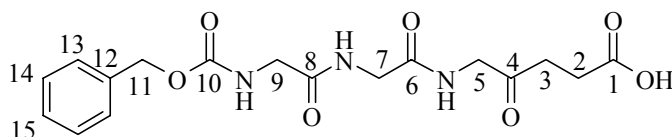
HRMS (ESI) : calc. pour [C₂₅H₃₃N₁₂O₁₂Na]⁺ 715.2155, trouvé 715.2147.

2.3.2.4.4 Synthèse de Z-[Gly-Gly-(ALA)]-OH (66)

La synthèse de **66** s'effectue selon le Mode opératoire - Type IV. Déprotection de 325 mg de **31** à l'aide de PLE, en solution dans un tampon phosphate. La réaction est arrêtée après 2 ou 3 jours. Extraction, séchage du produit, récupération d'une pâte, qui est purifiée par recristallisation, en dissolvant le solide dans un minimum de méthanol et en ajoutant de l'éther pour le faire recristalliser. Isolement d'un solide blanc.

Rendement : 255 mg (83%).

Données analytiques de **66** :



R_f (CH₂Cl₂/MeOH 8 :2) : 0.45. **F** : 155-156 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.1 min., pureté >89%.

IR (KBr) : 3337*m*, 3299*s*, 3081*w*, 2956*w*, 1718*m*, 1689*s*, 1653*vs*, 1551*s*, 1420*m*, 1381*m*, 1293*m*, 1248*m*, 1164*w*, 698*m*.

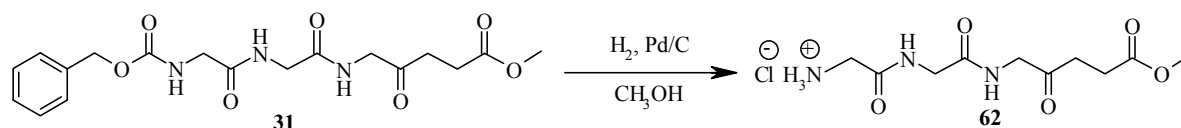
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.19-8.13 (*m*, 2H, NH-H₂C(5), NH-H₂C(7)); 7.49 (*t*, ³*J*(NH,9)=6.0, 1H, NH-H₂C(9)); 7.39-7.30 (*m*, 5H, HC(13); HC(13'); HC(14); HC(14'); HC(15)); 5.04 (*s*, 2H, H₂C(11)); 3.96 (*d*, ³*J*(5,NH)=5.6, 2H, H₂C(5)); 3.77 (*d*, ³*J*(7,NH)=5.8, 2H, H₂C(7)); 3.68 (*d*, ³*J*(9,NH)=6.1, 2H, H₂C(7)); 2.66-2.63 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.43-2.40 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 204.5 (C(4)); 174.5, 170.3, 170.0 (C(1)), (C(6)), (C(8)); 157.4 (C(10)); 137.9 (C(12)); 129.2, 128.7, 128.6 (C(13), C(13'), C(14), C(14'), C(15)); 66.4 (C(11)); 49.2 (C(5)); 44.4 (C(9)); 42.6 (C(7)); 34.9 (C(3)); 28.4 (C(2)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 378 (100[M-H]⁺).

HRMS (ESI) cal pour $[C_{17}H_{20}N_3O_7]^+$ 378.3609; trouvé 378.3611.

2.3.2.5 Synthèse de H-[Gly-Gly-(ALA)]-OMe (62)

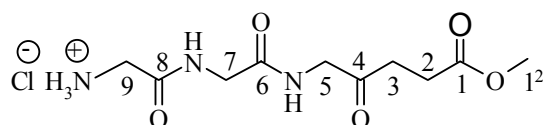


Dans un hydrogénateur de 150 ml sont placés 200 mg de **31**, 20 ml de méthanol, ainsi que 2 ml d'une solution 1.5 M de HCl dans du méthanol. L'hydrogénateur est purgé à l'aide d'argon, afin d'éviter l'inflammation du méthanol lors de l'adjonction du méthanol. 22 mg de Pd sur charbon actif sont ajoutés avec précaution au mélange. L'hydrogénateur est placé sous 4 bars d'hydrogène. La réaction est laissée sous agitation et à RT durant 4 heures.

Le mélange est filtré sur célite, afin d'éliminer le catalyseur. Le méthanol est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le solide orange pâle est dissout dans un minimum de méthanol, puis de l'éther est additionné jusqu'à la formation d'un précipité. Le précipité est filtré sur Büchner, puis il est lavé avec de l'éther. Le solide blanc obtenu **62** est séché à la pompe à huile.

Rendement : 120 mg (80 %).

Données analytiques de **62**:



F : 177-178 °C (bulle).

RP-HPLC (80% MeCN, C_{18}) : $t_R = 2.5$ min., pureté >90%.

IR (KBr) : 3321 m , 3082 m , 2927 m , 2878 m , 1727 s , 1702 w , 1640 vs , 1556 m , 1487 m , 1434 m , 1362 m , 1212 m .

1H -NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 8.80 (t , $^3J(NH-7)=5.7$, 1H, NH-H $_2$ C(7)); 8.42 (t , $^3J(NH-5)=5.6$, 1H, NH-H $_2$ C(5)); 8.24 (sbr , 3H, NH-H $_2$ C(9)); 3.96 (d , $^3J(5-NH)=5.7$, 2H, H $_2$ C(5)); 3.83 (d , $^3J(7-NH)=5.8$, 2H, H $_2$ C(7)); 3.60 (s , 2H, H $_2$ C(9)); 3.57 (s , 3H, H $_2$ C(1 2)); 2.73-2.69 (m , AA' d'un AA'BB', 2H, H $_2$ C(3)); 2.51-2.47 (m , BB' d'un AA'BB', 2H, H $_2$ C(2)).

^{13}C -NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 206.1 (C(4)); 173.5, 169.5, 167.2 (C(1)), (C(6)), (C(8)); 52.3 (C(1 2)); 49.1 (C(5)); 42.7 (C(7)); 41.0 (C(9)); 34.8 (C(3)); 28.0 (C(2)).

MS (ESI $^+$) m/z intensité relative 296 (7, [M-TFA+Na] $^+$), 283 (100 [M-HCl+Na] $^+$), 260(53 [M-Cl] $^+$), 221(11), 197(12), 187(17), 163(55), 149(52), 139(77).

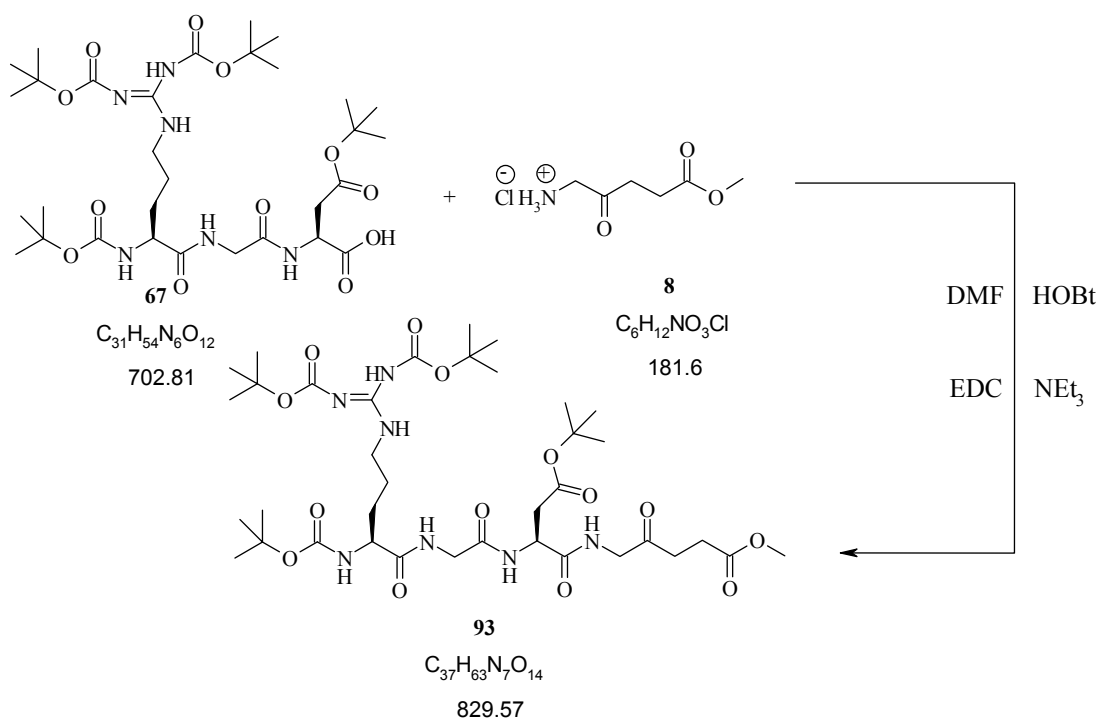
HRMS (ESI) cal pour $[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5]^+$ 260.1241; trouvé 260.1241.

3 Annexes

3.1 Partie théorique

3.1.1 Synthèse de Boc-Arg(Boc)₂-Gly_asp(OtBu)-ALA-OMe(RGD-ALA-OMe) (93)

Boc-Arg(Boc)₂-Gly-Asp(OtBu)-ALA-OMe a été synthétisée [186], par couplage de la séquence RGD protégée par le groupe Boc (fabriquée sur commande par Bachem) avec le méthyle ester de ALA. Il faut signaler que Bachem n'a pas pu livrer un produit pur, en effet selon eux le produit n'était pas stable. La réaction de couplage a été effectuée dans le DMF, en présence de HOBt (1-hydroxybenzotriazole) et d'EDC (N-(3-diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride). Après extraction, purification sur colonne, le produit est analysé par RMN, HPLC, MS et finalement purifié par HPLC préparative.



Lors de la synthèse de ce composé, le problème principal qui a été rencontré est le nombre de produit secondaire formé lors de la réaction. En effet, au contraire des autres dérivés synthétisés, l'extraction et la purification par chromatographie ne suffisent pas pour obtenir un produit avec une pureté suffisante. Comme le montre le spectre de masse (Figure 55), on peut supposer la présence du produit désiré, mais il est évident que l'on est en présence d'un mélange de produit et non pas d'un seul composé.

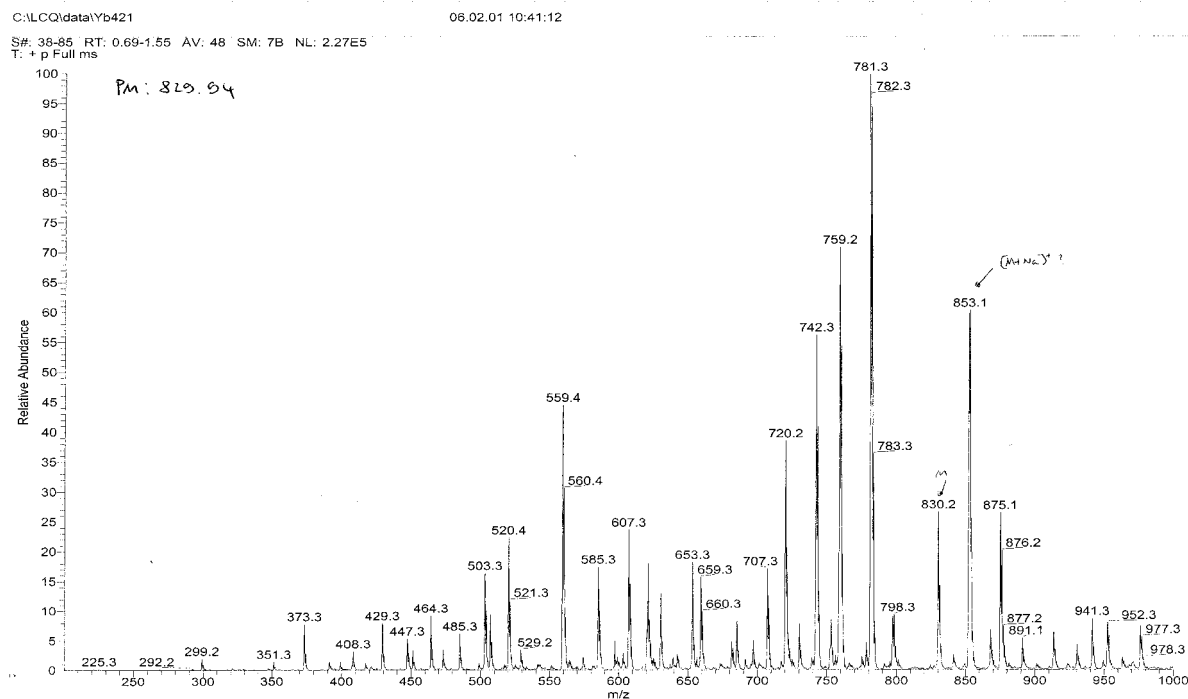


Figure 55 : Spectre de masse du produit obtenu, après purification. Deux pics ont retenu notre attention : 830 qui peut correspondre à $[M+H]^+$ et à 853 qui peut appartenir à $[M+Na]^+$.

Pour l'interprétation du spectre plusieurs pics peuvent appartenir au produit désiré. Il faut noter que chacun des pics mentionnés dans le Tableau 13 se trouve également dans le spectre de masse avec +23 qui peut provenir d'un sodium supplémentaire

Pic	853	830	731	630
Fragment	$[M+Na]^+$	$[M]^+$	$[M-Boc]^+$	$[M-2Boc]^+$

Tableau 14 : Interprétation du spectre de masse (ESI) du produit brut

Le produit a également été analysé par HPLC (Figure 56), ce qui a confirmé la présence d'un mélange de produits. Ce mélange peut être expliqué par le fait que le produit fourni par Bachem n'était pas pur et ne semblait pas être stable. Les produits secondaires peuvent donc être le fruit de réaction avec les produits de dégradations ou encore des dégradations survenues lors du couplage.

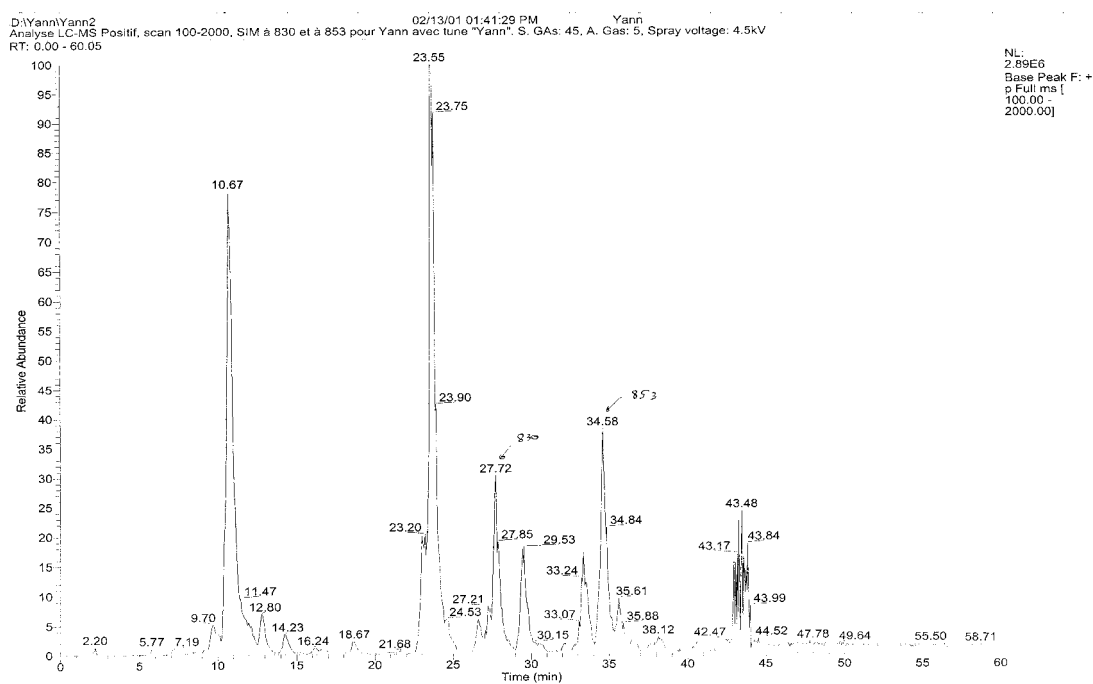


Figure 56 : Spectre HPLC du produit obtenu, après purification. Les pics qui sortent à $t_r = 27.72$ min et à $t_r = 34.58$ min correspondent respectivement au spectre de masse 830 et à 853.

Les fractions qui sortent à $t_r = 27.72$ min (Figure 57) et à $t_r = 34.58$ min (Figure 58), ont été identifiées par HPLC-MS.

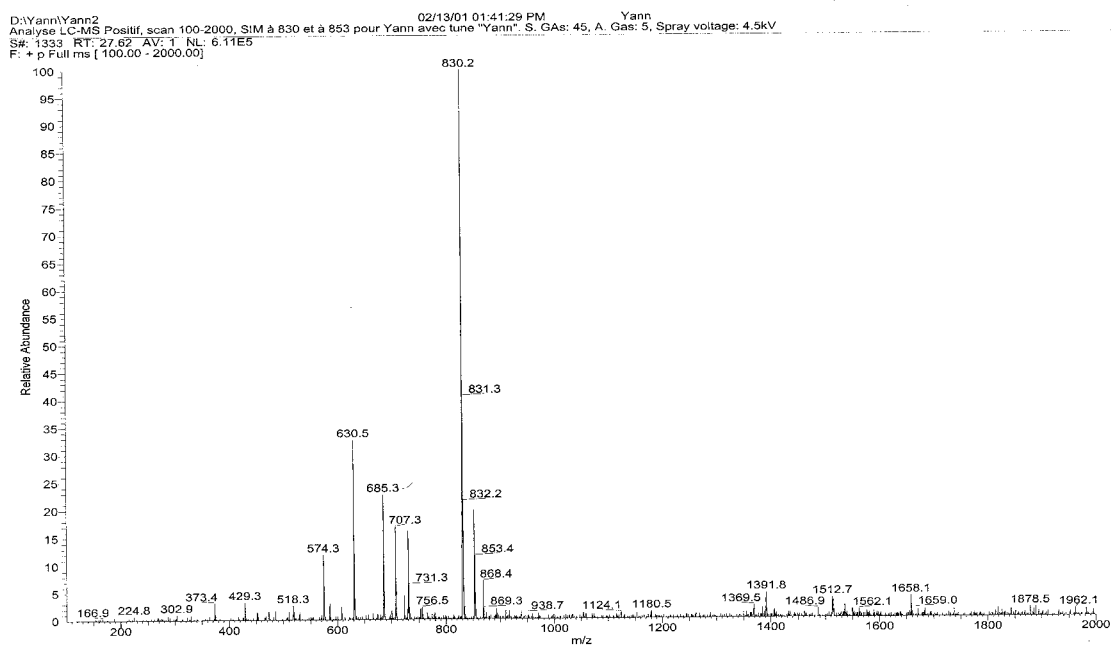
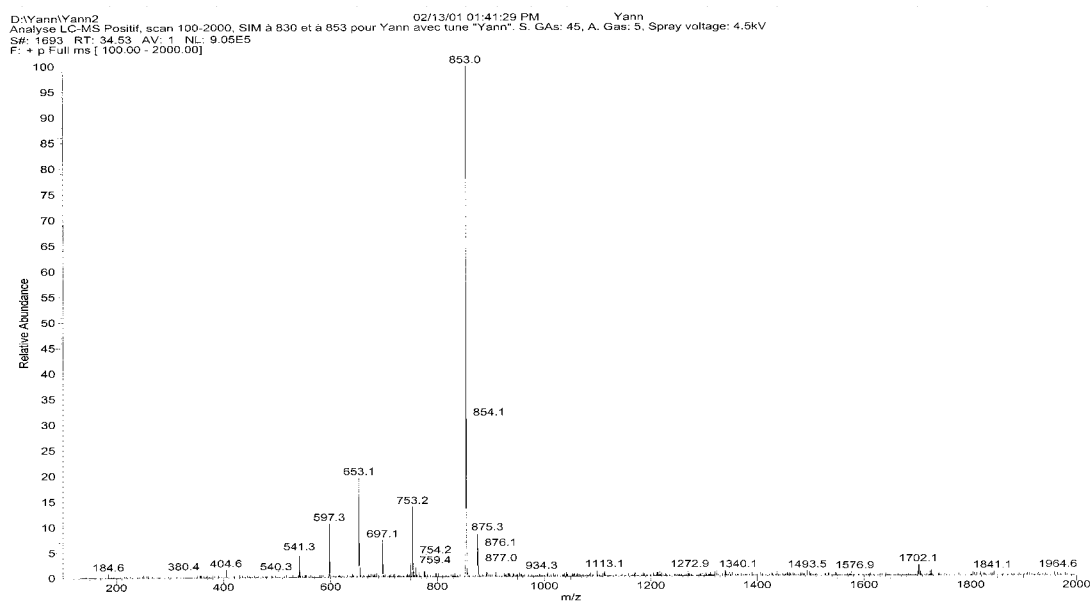


Figure 57 : Spectre de masse de la fraction avec $t_r = 27.72$ min.

Figure 58 : Spectre de masse de la fraction avec $t_r = 34.58$ min.

Le produit a donc été finalement purifié par HPLC semi préparative, ce qui a permis d'isoler une fraction dont le spectre de masse est donné à la Figure 58. L'autre fraction (Figure 57) n'a pas pu être isolée. Les spectres de masses réalisés après la séparation par HPLC semi préparative n'ont pas permis de retrouver une fraction qui donnait le même spectre de masse que celui observé pour la fraction $t_r = 34.58$ min. Un spectre RMN (Figure 59) a été réalisé sur le produit dont le spectre de masse à un maximum à 830 ($[M]^+$).

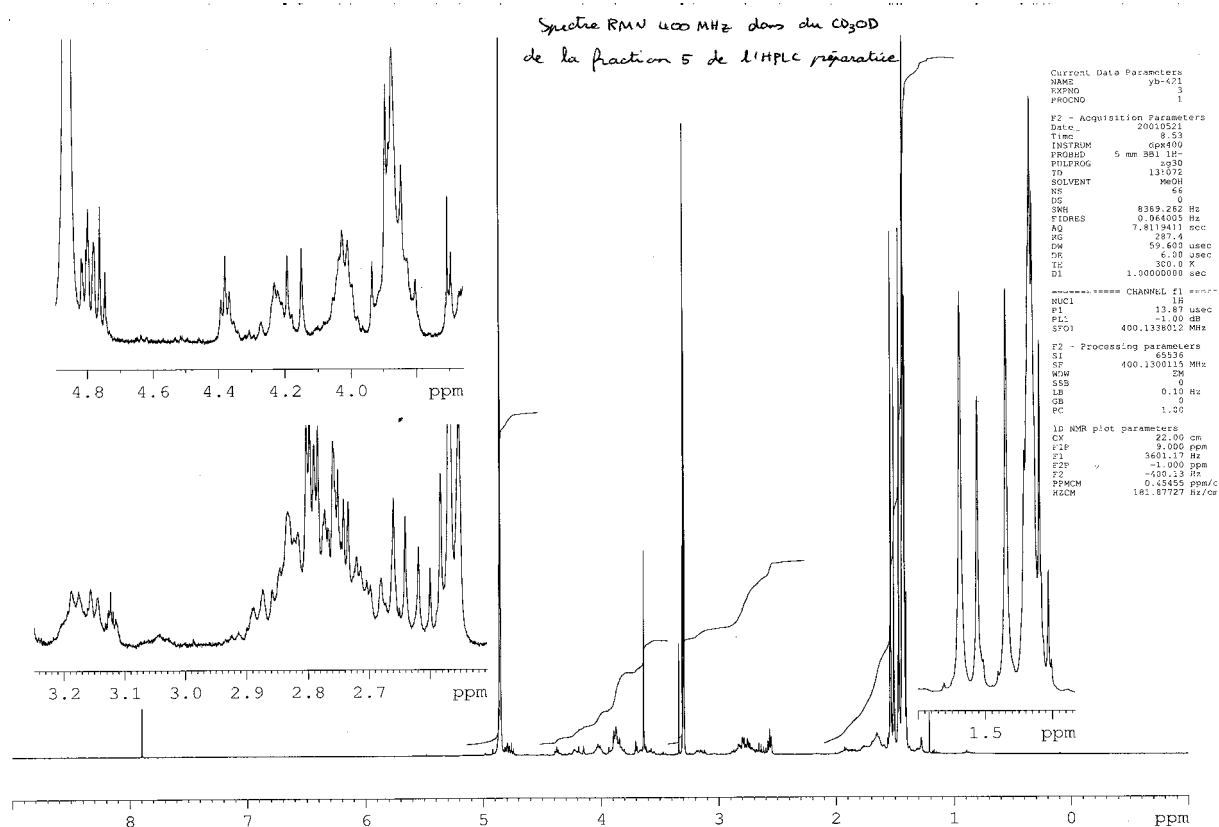


Figure 59 : Spectre RMN ^1H du produit final

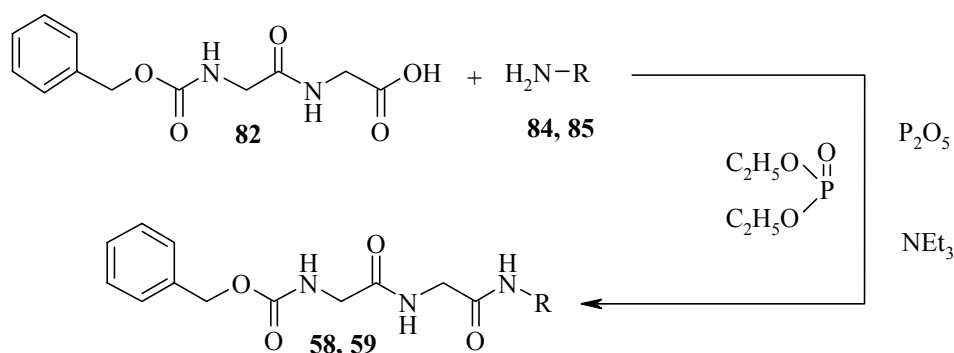
Le spectre RMN ^1H permet d'attribuer les signaux du produit désiré. Cependant les signaux se trouvant vers 1.5 ppm sont beaucoup trop intenses. Un signal supplémentaire important apparaît, il est déjà présent dans le spectre RMN ^1H du produit fourni par Bachem. Il est donc impossible de dire s'il est issu d'une réaction de dégradation ou s'il provient d'une impureté se retrouvant également dans le produit synthétisé par Bachem. Le produit obtenu a été déprotégé en présence de TFA selon la méthode standard et stocké immédiatement à -18°C . Les tests biologiques n'ont pas encore été réalisés sur ce composé.

Le problème de pureté qui est survenu avec le produit commandé chez Bachem provient certainement du type de groupes protecteurs que l'on a choisi. La séquence RGD est parfaitement connue et ne pose pas de problème de stabilité lors de sa synthèse. La synthèse de la séquence RGD n'utilise pas Boc. Selon Bachem, l'utilisation du groupe protecteur Z à la place de Boc aurait été plus judicieuse, pour obtenir un produit plus stable. Notre choix du groupe Boc comme moyen de protection avait été motivé par le fait que nous avons mis en place une chimie de synthèse des dérivés de ALA basé sur ce groupe protecteur et que les conditions de réaction étaient parfaitement maîtrisées. Vu les résultats obtenus, on peut donc envisager l'utilisation du groupe Z et revoir la stratégie de synthèse de ce dérivé, si cela s'avère nécessaire.

3.1.2 Synthèse de dérivés contenant la séquence Gly-Gly comme substrats pour l'élucidation par histoenzymographie (4Me- β -NA) ou par fluorescence (AMC) ou des activités protéolytiques cellulaires

3.1.2.1 Couplage de marqueurs sur Z-Gly-Gly-OH

Dans un mélange de pentoxyde de phosphore et de diéthyle phosphite chauffé à 100°C et placé sous argon, sont ajoutés AMC ou 4Me- β -NA placé en suspension dans un mélange de diéthyle phosphite et de triéthylamine. Après 20 minutes à 110°C Z-GlyGly-OH est ajouté au mélange. La réaction est laissée à 110°C durant deux heures. Le solvant est éliminé à l'aide du four à boules en chauffant à 50°C . Un résidu pâteux est purifié par chromatographie et une recristallisation dans du méthanol a été nécessaire pour la récupération du dérivé sous sa forme cristalline [198]. Le produit obtenu est entièrement caractérisé par spectroscopie. Les rendements sont reportés dans le Tableau 15.



Composé	Marqueur (R)	Temps	Température	Rendement
58	4-méthylcoumaryl-7-amine (AMC)	2 heures	110 °C	49 %
59	4-méthoxy-β-naphtylamine (4Me-β-NA)	2 heures	110 °C	33 %

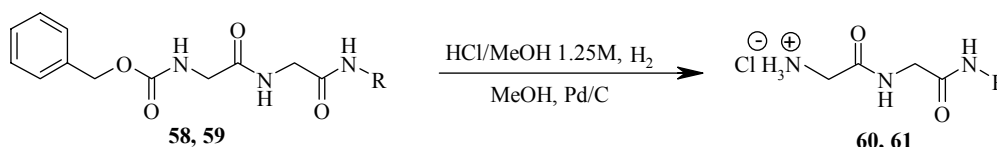
Tableau 15 : Récapitulation des rendements du couplage avec les marqueurs

Toutes les tentatives de condensation de l'amine et de l'acide, en présence d'un réactif de couplage tel que l'EDC, n'ont pas permis d'obtenir de produit. Bien que des modes opératoires décrivant la réaction du 4-méthylcoumaryl-7-amine (AMC) avec certains acides aminés se trouvent dans la littérature [199;200], il a été impossible de les reproduire : ce problème est sans doute dû au fait que l'amine utilisée lors de la réaction est fixée sur un cycle aromatique, ce qui a pour conséquence de réduire sa réactivité. Il a donc fallu se tourner vers un autre type de réaction avec des conditions moins douces [198].

Afin d'éviter tout problème lors de la réaction, le groupe protecteur Boc a été remplacé par Z, afin d'éviter la clivage du groupe protecteur. La réaction permet d'obtenir le produit désiré, mais avec des rendements faibles. Il faut également signaler que la solubilité de ces produits est très faible dans tous les solvants y compris le DMSO, mais leur purification sur colonne est possible, après adsorption du produit sur silice. L'utilisation du groupe Z à la place du groupe Boc, pose un problème lors des tests *in vitro*. Lors des tests *in vitro*, les dérivés Z protégés ne permettent pas d'observer de la fluorescence. Par contre les dérivés protégés Boc sont des précurseurs efficaces. Par conséquent, il est nécessaire de reprotéger le N-terminal avec un groupe Boc. Ce travail va être effectué dans la continuité de cette thèse.

3.1.2.2 Déprotection des marqueurs fixés sur Z-Gly-Gly-OH par hydrogénolyse

Le composé protégé par Z (**58** ou **59**) est ajouté au méthanol dans un hydrogénateur en verre de 200 ml. La réaction a lieu en quatre heures sous 4 bars d'hydrogène et en présence de HCl et de palladium sur charbon actif. La réaction est filtrée sur célite[®], afin d'éliminer le catalyseur. Après élimination du solvant, le résidu obtenu est recristallisé. Les produits obtenus sont entièrement caractérisés par spectroscopie. Les rendements sont récapitulés dans le Tableau 16.

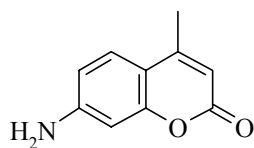


Composé				
60	4-méthylcoumaryl-7-amide	4 heures	t.a.	78 %
61	4-méthoxy-β-naphtylamine	4 heures	t.a.	83 %

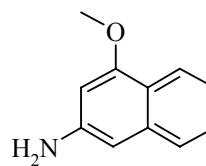
Tableau 16 : Récapitulation des rendements de la déprotection du groupe Boc

L'étape de déprotection [186] ne pose aucun problème, les recristallisations donnent de bon résultats par rapport à l'étape précédente, ce qui s'explique par le fait que la solubilité

n'engendre plus de difficulté. Ces produits sont également stables sous forme solide et en solution. Afin d'être stockés sur de longues périodes, ils sont conservés à 4 °C sous argon.



4-méthylcoumaryl-7-amide

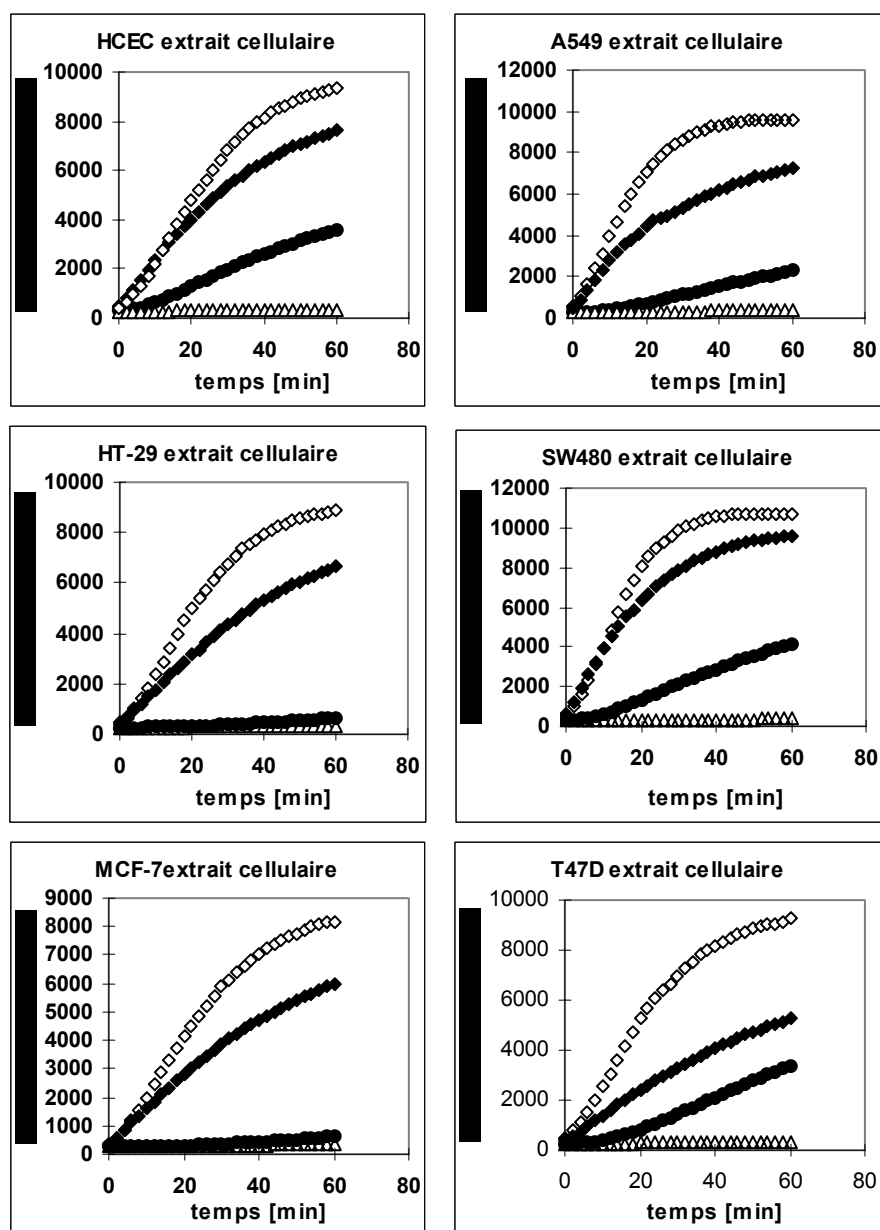


4-méthoxy-β-naphthylamine

Figure 60 : Structure des différents marqueurs

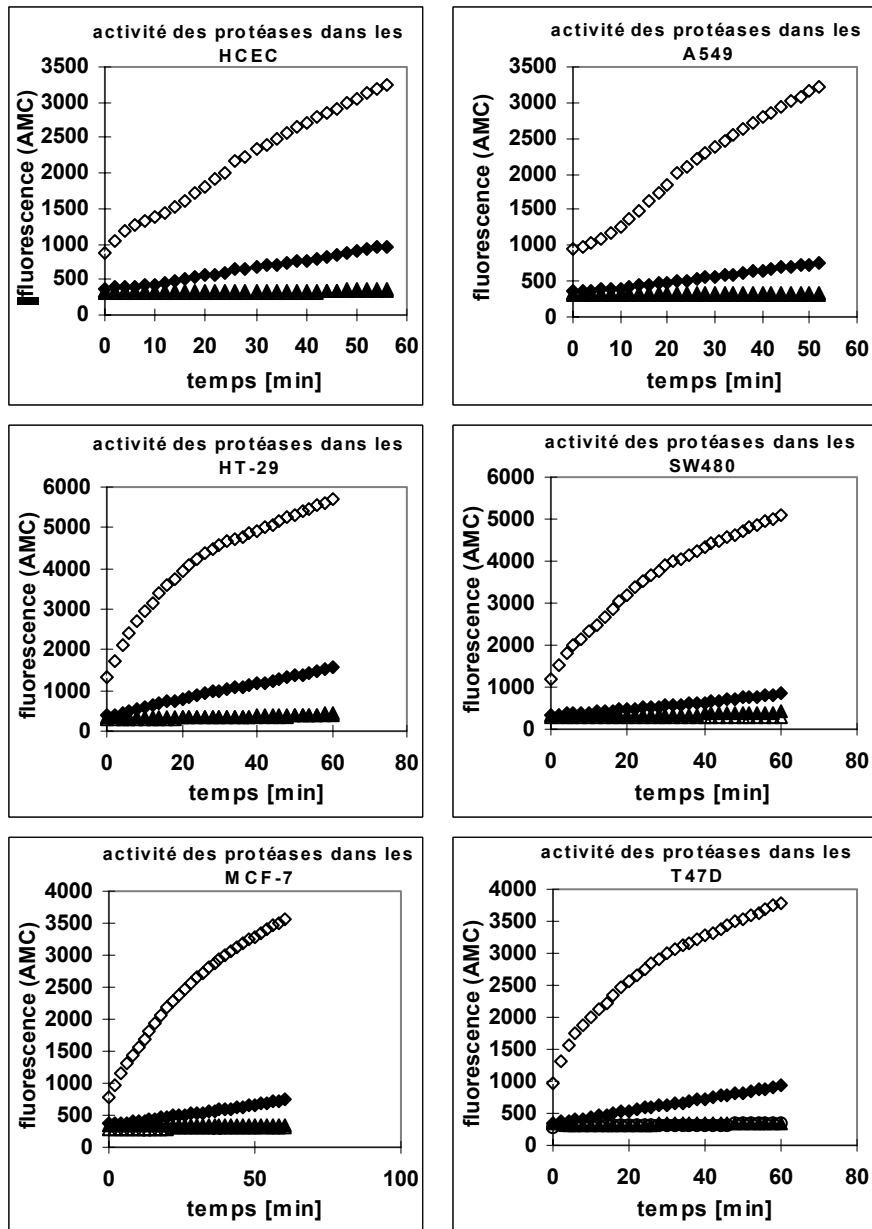
3.1.2.3 Discussion des résultats obtenus avec les dérivés à base 4-méthylcoumaryl-7-amine (AMC)

La localisation de l'étape d'hydrolyse a été confirmée en comparant l'activité enzymatique spécifique soit dans des cellules vivantes entières, soit des extraits de cellules avec la production réelle de PpIX dans différentes lignées cellulaires (Graphique 21 et Graphique 22). Pour ces mesures, les cellules ont été mises en culture jusqu'à l'obtention d'une mono couche confluente. Les mesures ont ensuite soit été faites sur les cellules vivantes ou sur des extraits cellulaires. Les cultures ou les extraits cellulaires ont été ensuite exposées à des concentrations variables de substrats dipeptidiques AMC. L'augmentation de la fluorescence induite par le relâchement du marqueur AMC a été mesurée de façon continue.



Graphique 21 : ◆ Z-Gly-Gly-AMC, ▲ Gly-Gly-AMC, ◇ Z-Gly-Pro-AMC, △ Gly-Pro-AMC

Une comparaison directe entre l'activité enzymatique exprimée sur la surface des cellules ou dans les extraits cellulaires (Tableau 17) avec la production de PpIX des dérivés de ALA **25**, **26**, **43** et **44** a indiqué que les protéases de surface des cellules ne montrent aucune corrélation entre leurs activités enzymatiques et la production de PpIX, alors que dans le cas des extraits cellulaires, une corrélation entre l'activité enzymatique et la production de PpIX a été obtenue. En particulier, Gly-Pro-ALA-OEt est potentiellement un substrat pour les protéases capables d'hydrolyser Gly-Gly et Gly-Pro. Les protéases capables d'hydrolyser Gly-Gly- peuvent quand à elle libérer ALA à partir de **25** et **26**. L'identité des autres activités protéolytiques impliquées ne peut pas être déterminées précisément par ce type d'approche.



Graphique 22 : ◆ Z-Gly-Gly-AMC, ● Gly-Gly-AMC, ◇ Z-Gly-Pro-AMC, △ Gly-Pro-AMC

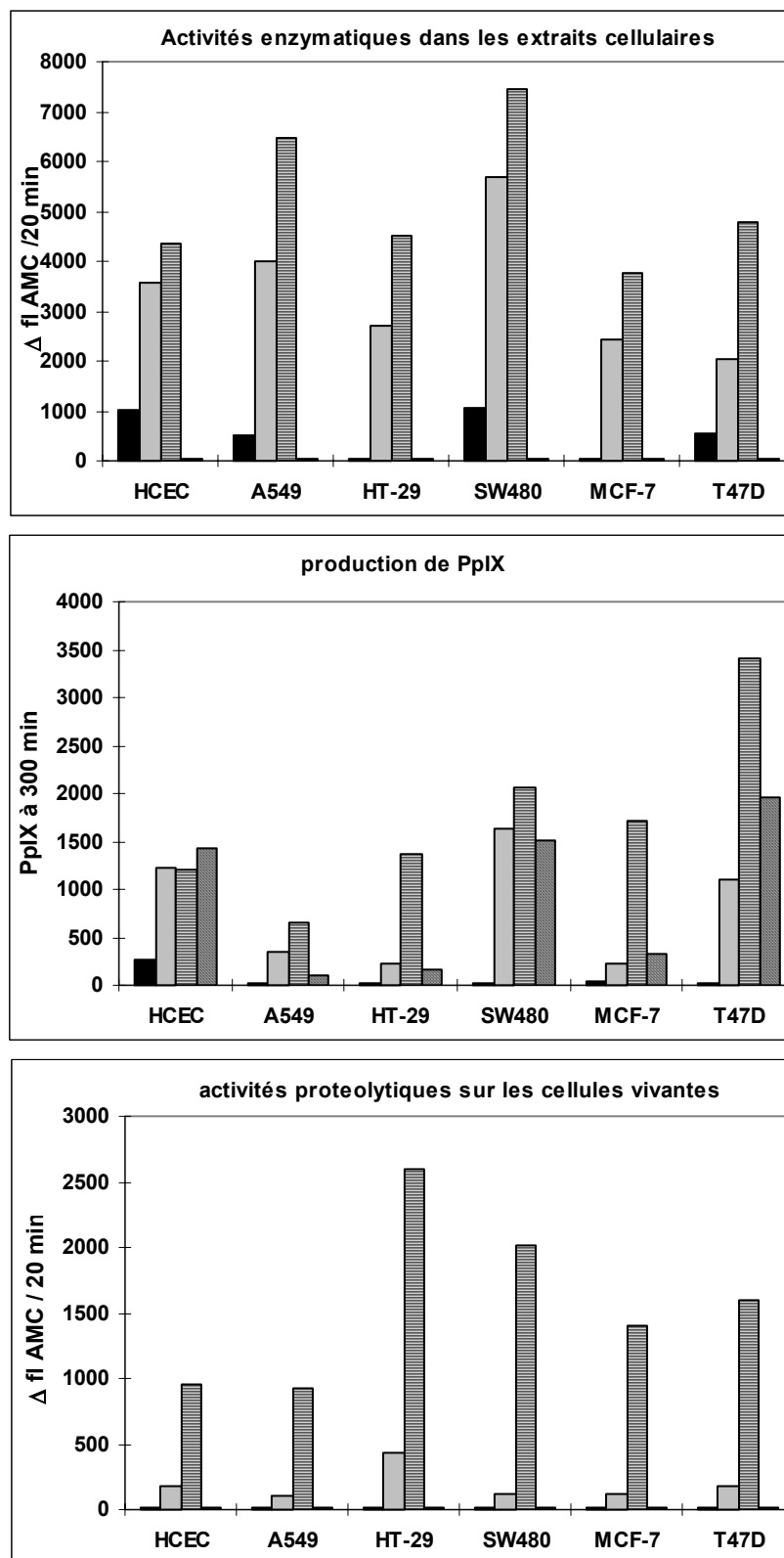


Figure 61 : Comparaison du coefficient de corrélation (R) entre les activités enzymatiques mesurées par l'hydrolyse des dérivés à base d'AMC (Δ fluorescence d'AMC/20min) sur des cellules entières (activités enzymatiques de la surface des cellules), sur des extraits cellulaires (activités enzymatiques de la surface et du cytoplasme de la cellules), et la fluorescence induite par la PpIX à 300 min. Colonne noire (Gly)₂-AMC ou (Gly)₂-ALA-OEt, Colonne grise Gly-Pro-AMC ou Gly-Pro-ALA-OEt, Colonne lignées horizontalement Z-Gly-Pro-AMC ou Boc-Gly-Pro-ALA-OEt, Colonne noire lignées verticalement Z-(Gly)₂-AMC ou Boc-(Gly)₂-ALA-OEt.

	GG-AMC	GP-AMC	Z-GP-AMC	GG-AMC	GP-AMC	Z-GP-AMC
Boc-GG-ALA-OEt	0.69	0.12	0.14	Pas d'activité	-0.22	-0.06
Boc-GP-ALA-OEt	0.08	-0.32	-0.09	Pas d'activité	-0.02	0.28
GP-ALA-OEt	0.90	0.55	0.48	Pas d'activité	-0.31	-0.04
GG-ALA-OEt	0.49	0.03	-0.33	Pas d'activité	-0.05	-0.50
	extraits cellulaires			cellules vivantes		

Tableau 17 : Coefficient de corrélation pour les différents types de cellules employées. Pour le calcul du coefficient de corrélation. Le coefficient (R) a été déterminé pour chaque type de cellules utilisées.

Ce coefficient de corrélation a été déterminé à l'aide de la fonction *coefficient de corrélation* du programme Excel de Microsoft. Ces valeurs ont été obtenues en appliquant cette fonction entre la différence de fluorescence obtenues avec AMC/20min et les valeurs de fluorescence induite par la PpIX à 300 min.

3.1.3 Synthèse de dérivés de l'acide 5-azidolévulinique

Lors de la synthèse de certains acides (travail avancé de Roger Mafua), l'utilisation de la méthode employant le chlorure de thionyl, afin de former le chlorure d'acide en présence de l'alcool servant à la fois de solvant et de réactif, a posé des problèmes. En effet, deux cas de figure nous ont empêchés d'utiliser cette méthode :

- Dans le cas de l'utilisation d'un alcool sensible tel que le géraniol ou le phytol, la présence du chlorure de thionyl dégradait l'alcool.
- Lorsqu'il est impossible d'utiliser un excès d'alcool, par exemple lorsque deux ou plusieurs molécule de ALA doivent être fixées sur le même alcool, ce qui implique un excès de ALA et non plus un excès d'alcool.

Afin de former ces esters qui sont plus délicats à obtenir, une autre méthode a dû être employée. Afin de pouvoir travailler dans des conditions les plus douces possibles, nous avons utilisé un réactif de couplage (EDC). Cette approche a le désavantage de nous obliger à protéger la fonction amine de ALA, afin d'éviter la formation de liaisons peptidiques. La première idée a été de tenter de protéger ALA à l'aide du groupe protecteur Boc. Les premières synthèses ont permis d'obtenir le produit désiré, mais avec des rendements faibles. La recherche d'une autre méthode, afin d'obtenir Boc-ALA avec un bon rendement s'est poursuivie lors du travail avancé de 4^{ème} année de Yasmine Wilder. Au vu du manque de résultats obtenus en essayant de protéger ALA avec Boc, il a fallu trouver un autre groupe protecteur. Le choix s'est porté sur le groupe azido. En effet, sa synthèse ne pose aucun problème et permet d'obtenir de bons rendements. La synthèse du 5-azidolévulinate de méthyle est suivie par une déprotection enzymatique du méthyle ester en présence de PLE. L'acide 5-azidolévulinique est obtenu avec des bons rendements.

La déprotection du groupe azido a cependant posé quelques problèmes. En effet, la déprotection habituelle se fait par hydrogénation catalytique [201]. Cette méthode n'est pas envisageable dans le cas des esters du géraniol et du phytol, car cela entraîne une hydrogénation des doubles liaisons. Il a donc fallu trouver une autre technique de déprotection [202;203]. Le choix s'est porté sur le traitement du produit par SnCl₂ dans du méthanol [204]. La réaction fonctionne bien, les esters restent intacts, mais la purification des produits obtenus

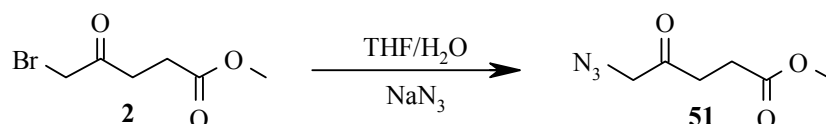
est problématique. En effet, la plupart des produits récupérés ne sont pas solides ce qui empêche une recristallisation. De plus comme ils sont extrêmement polaires, leur chromatographie exige l'utilisation d'éluants très polaires, tels que méthanol (5-30%) dans du dichlorométhane. Finalement l'extraction classique pose également des problèmes, puisqu'il faut utiliser une phase aqueuse basique avec ALA, ce qui entraîne la dégradation de ALA.

Des esters de ALA ont donc pu être obtenus à partir de l'azido, mais leur purification s'est révélée délicate. Pour obtenir de meilleurs résultats, il est nécessaire d'avoir une étape de déprotection qui exige un minimum de purification. Dans ce cas le candidat idéal est le groupe Boc. Nous avons donc repris la recherche d'une méthode permettant d'obtenir ALA protégé par Boc. C'est dans cette optique que la réaction de Staudinger [205-207] a été employée, afin de transformer le 5-azidolévalinate de méthyle en Boc-ALA-OMe.

3.1.3.1 Synthèse du 5-azidolévalinate de méthyle

A une solution contenant NaN_3 dans 15 ml d'eau désionisée, est ajouté progressivement le 5-bromolévalinate de méthyle dissout dans 15 ml de THF, sous forte agitation et de manière à ne pas dépasser 30°C . Le mélange trouble et jaunâtre est alors agité durant 60 min. à température ambiante, puis phase organique et phase aqueuse sont séparées. Cette dernière est ensuite extraite avec de l'AcOEt, puis les phases organiques sont lavées. Après séchage filtration et concentration, le produit est purifié par chromatographie. Le produit obtenu est entièrement caractérisé par spectroscopie.

Rendement : 4.09 g (80%)



Pour introduire un groupe amino sans carbone surnuméraire, il faut faire appel à un nucléophile azoté qui est non réactionnel après la première alkylation. Le ion azoture, N_3^- , est un nucléophile qui répond à ces exigences : il réagit avec les halogénoalcanes en engendrant des azotures d'alkyle. Le ion azoture, N_3^- est en fait un hybride de plusieurs formes de résonance (Figure 62), dont les contributions les plus importantes sont :

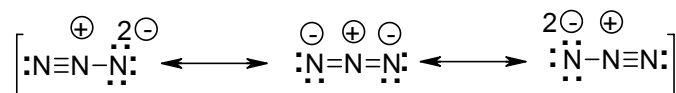


Figure 62 : Formes de résonance de N_3^-

Cet anion est relativement peu basique, en considérant une structure anionique à base d'azote (le $\text{p}K_a(\text{HN}_3) = 4.68$). C'est également un bon nucléophile qui va facilement réagir avec un halogénoalcane par $\text{S}_{\text{N}}2$.

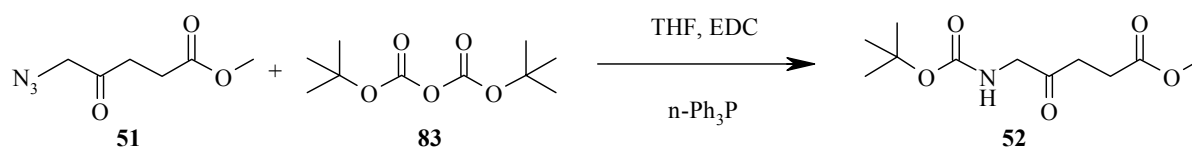
La réaction ne pose aucun problème et le produit est purifié par chromatographie. Lors du stockage du produit sur une longue durée, on observe une coloration du produit qui passe de

jaune pâle à jaune brun. Cependant par RMN aucune dégradation n'a été observée. Le produit a donc été utilisé tel quel sans que cela n'influence les rendements de la réaction ou la qualité du produit obtenu lors de l'étape suivante.

3.1.3.2 Synthèse de Boc-(ALA)-OMe

Le 5-azidolévulinate de méthyle est dissout sous agitation dans un mélange THF/H₂O (40 :1) et à température ambiante. A la solution sont ajoutés la triphényle phosphine, le Boc anhydride et l'EDC. Après cinq heures la réaction est stoppée. Le solvant est éliminé et le résidu est purifié par chromatographie. Le produit obtenu est entièrement caractérisé par spectroscopie.

Rendement : 47 %.

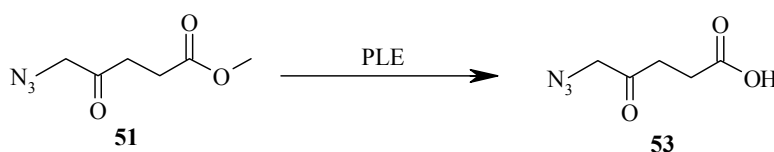


La réaction de Staudinger permet donc d'obtenir Boc-ALA-OMe à partir du 5-azidolévulinate, mais avec des rendements relativement faibles. Il aurait été intéressant d'essayer cette méthode avec le composé 57. En effet, si cette synthèse est applicable aux autres esters, cela permettra d'obtenir le produit protégé Boc et de le traiter avec TFA, afin d'obtenir le produit désiré.

3.1.3.3 Synthèse de l'acide 5-azidolévulinique

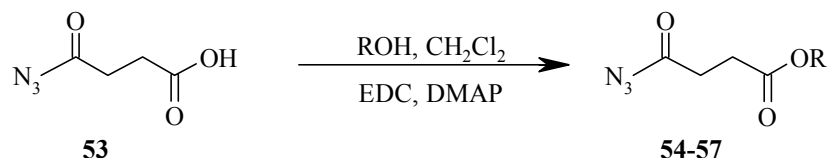
Le méthyle ester est éliminé en utilisant l'*estersase de foie de porc*. Le produit est traité avec la PLE dans une solution tampon de phosphate. La libération de l'acide est suivie par titration au pH-stat (pH = 8.0) à l'aide d'une solution NaOH 0.1N. Le mélange réactionnel est agité à température ambiante jusqu'à complétion de la réaction. Après purification par chromatographie le produit est entièrement caractérisé par spectroscopie.

Rendement : 791 mg 86%.



3.1.3.4 Estérification de l'acide 5-azidolévulinique

Le dichlorométhane anhydre placé sous atmosphère inerte d'azote est refroidi sur un bain de glace. Les réactifs sont ensuite rajoutés dans l'ordre suivant : l'alcool ROH correspondant, DMAP, EDC et finalement l'acide 5-azido lévulinique. La réaction est laissée à température ambiante durant la nuit. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie [208]. Le produit obtenu est entièrement caractérisé par spectroscopie. Les rendements sont récapitulés dans le Tableau 18.



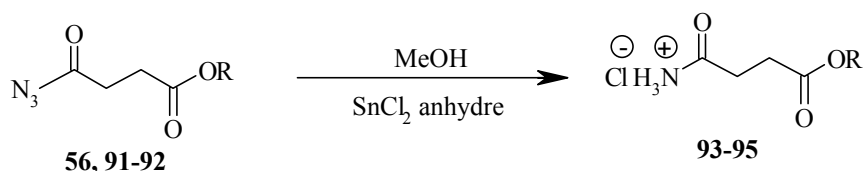
Composé	Alcool	Temps	Rendement
54	H ₃ C(CH ₂) ₅ -OH	12 heures	81 %
55	HO-(CH ₂) ₃ -OH	12 heures	83 %
56	HO-(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ -OH	20 heures	84 %
57	C(CH ₂ -OH) ₄	20 heures	64 %
91	Geraniol	12 heures	72 %
92	Phytol	12 heures	87 %

Tableau 18 : Récapitulation des rendements de l'estérification de l'acide 5-azidolévulinique

La réaction ne pose aucun problème et les produits obtenus sont facilement purifiés. Le seul problème rencontré est un problème de solubilité de l'alcool qui est solide lors de la synthèse du produit **57**.

3.1.3.5 Déprotection des dérivés de l'acide 5-azidolévulinique

Le méthanol anhydre est placé sous atmosphère inerte d'azote. Le SnCl₂ est ajouté au solvant, suivi par le dérivé azido. La réaction est laissée à température ambiante durant trois heures. Le résidu est ensuite purifié par chromatographie. Le produit obtenu est entièrement caractérisé par spectroscopie [204]. Les rendements sont récapitulés dans le Tableau 19.



Composé	Alcool	temps	Rendement
93	HO-(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ -OH	3 heures	96 %
94	Géraniol	3 heures	97 %
95	Phytol	3 heures	94 %

Tableau 19 : Récapitulation des rendements de la déprotection des dérivés de l'acide 5-azidolévulinique

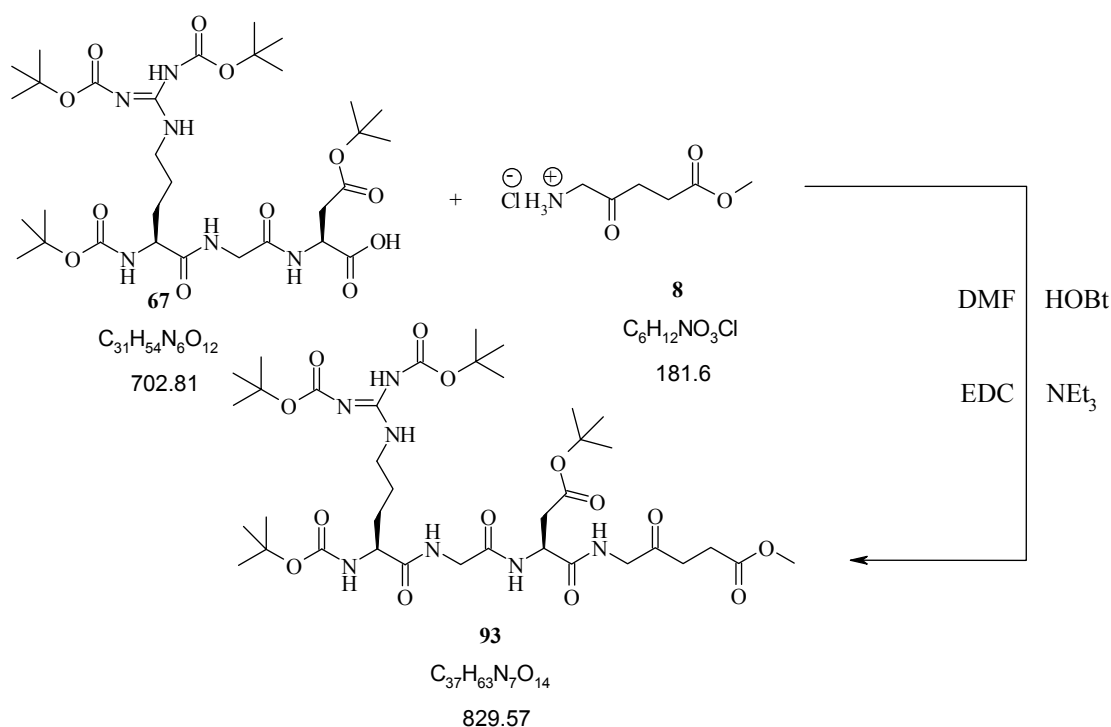
La déprotection fonctionne très bien, cependant la polarité élevée des produits obtenus, ainsi que leur sensibilité aux milieux basiques gêne leur purification. Les mesures spectroscopiques ont démontré que le produit obtenu était bien le réactif déprotégé. Cependant, il serait nécessaire de faire des mesures analytiques, afin de prouver qu'il ne reste plus de Sn dans le produit. Il faut donc optimiser les paramètres de la purification. Un moyen serait de faire une brève extraction avec une phase aqueuse basique, puis d'ajouter 1.2 éq. de HCl en solution dans du méthanol à la phase organique, afin de laisser la fonction amine libre le moins longtemps possible.

La méthode par hydrogénation catalytique a été employée avec succès lors de la déprotection de 5-azidolévulinate d'hexyl. Cette méthode de déprotection peut donc être utilisée lorsque l'alcool utilisé lors de l'estérification supporte une hydrogénation.

3.2 Partie expérimentale

3.2.1 Synthèse d'un dérivé de ALA contenant une séquence RGD

3.2.1.1 Synthèse de Boc-Arg(Boc)₂-Gly-Asp(OtBu)-ALA-OMe



Dans un ballon de 25 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, sont déposés 100 mg (0.14 mmol) de l'acide aminé *N*-protégé **67**. Le solide est dissout dans 3 ml de DMF anhydre sous atmosphère inerte d'azote. Après 10 minutes d'agitation à RT, 21 mg (0.15 mmol) d'HOBt (1-hydroxybenzotriazole) et 54 mg (0.28 mmol) de EDC (N-(3-Diméthylaminopropyl)-N'-éthylcarbodiimide hydrochloride) sont successivement ajoutés à la solution. Le mélange réactionnel est alors agité à RT durant 45 à 50 minutes. Parallèlement, 51 mg (0.28 mmol) de **8** sont placés dans un ballon de 10 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, puis dissout dans 4 ml de DMF distillé.

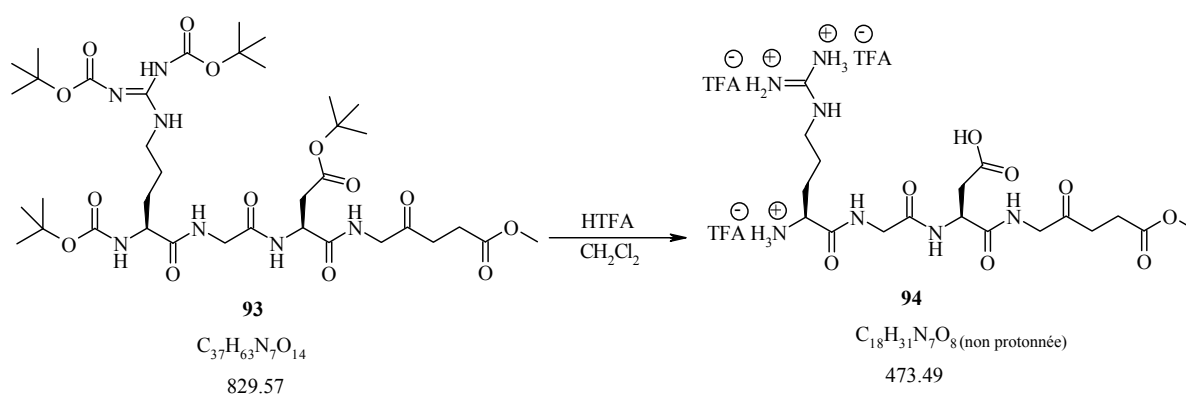
Après ce délai, la solution de **8** dans le DMF est ajoutée au mélange hétérogène préactivé. La solution résultante est alors agitée à RT durant 10 minutes, puis 28 mg (0.28 mmol) de triéthylamine sont ajoutés. Cette action se traduit par l'obtention d'un mélange réactionnel trouble, qui est ensuite agité à RT pour une durée de 6 heures.

Le contrôle de l'avancement de la réaction se fait par CCM (AcOEt et $CH_2Cl_2/MeOH$ 8 :2). Le solvant est ensuite éliminé à l'aide du four à boules et le résidu pâteux dissout dans 100 ml d'AcOEt. La phase organique est alors lavée avec, successivement, 20 ml d'une solution 1N d'acide citrique, d'une solution saturée de $NaHCO_3$, et d'une solution saturée de NaCl. La phase organique lavée et neutralisée est séchée sur $MgSO_4$ anhydre, puis le solvant est

éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif. Après séchage à la pompe à huile, le produit brut de réaction est isolé sous la forme d'une huile.

L'huile est ensuite purifiée par chromatographie-éclair sur gel de silice (mélange de 5% de CH_2Cl_2 dans MeOH). Le produit obtenu est analysé par RMN, MS, HPLC et par HPLC-MS. Finalement le mélange est séparé par HPLC et la fraction dont le spectre de masse correspond avec le produit désiré est récupérée.

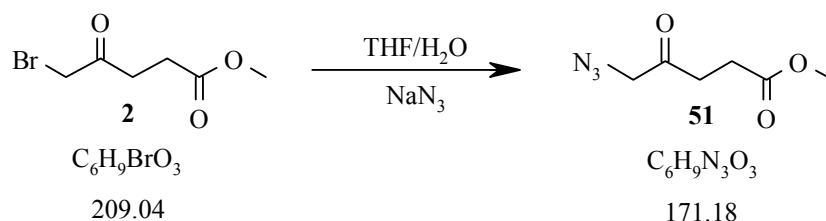
3.2.1.2 Synthèse de H-Arg-Gly-Asp-ALA-OMe



Dans un bicol de 5 ml placé sous argon et refroidi dans un bain de glace est placé de **93**, 3 ml de dichlorométhane et 1 ml d'acide trifluoroacétique (TFA) sont ajoutés. La réaction est agitée à 0°C durant 30 minutes, puis elle est laissée 30 minutes à température ambiante. L'avancement de la réaction est confirmé par CCM ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ 8:2). Le solvant est éliminé à l'aide d'une trompe à eau munie d'un piège à azote liquide. Le résidu est séché à la pompe à huile. Récupération d'un produit **94** qui est stocké à -18°C .

3.2.2 Synthèses de dérivés de l'acide 5-azidolévulinique

3.2.2.1 Synthèse du 5-azidolévulinate de méthyle (**51**)

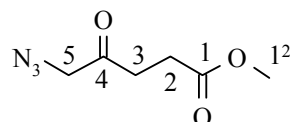


Dans un ballon tricol de 100 ml est placée une solution contenant 3.9 g (2.0 éq.) de NaN_3 dans 15 ml d'eau désionisée. 6.3 g (1.0 éq.) de **2** dissout dans 15 ml de THF sont alors ajoutés progressivement, sous forte agitation, de manière à ne pas dépasser 30°C . Le mélange trouble et jaunâtre est alors agité durant 60 min. à RT, puis phase organique et phase aqueuse sont séparées. Cette dernière est ensuite extraite avec trois portions de 45 ml d'AcOEt; les phases organiques réunies sont alors lavées avec deux portions successives de 45 ml d'eau désionisée

puis séchées sur MgSO₄ anhydre, filtrées et concentrées. Après séchage à la pompe à huile, isolement de 4.85 g (94 %) d'une huile de couleur jaune qui est purifiée par chromatographie-éclair (AcOEt, hexane (1:4) à (1:3)). Isolement d'un liquide transparent **51**.

Rendement : 4.09 g (80%)

Données analytiques de **51** :



R_f : (hexane/AcOEt 2:1) : 0.33.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.9 min., pureté >98%.

IR (film) : 3009s, 2928s, 2622m, 1723vs, 1591m, 1478m, 1407m, 1368s, 1356m, 1310m, 1238m, 1225m, 1184m, 1152m, 1100m, 1048m, 997m, 981m, 947m, 862m, 777m, 662w, 633w, 542w.

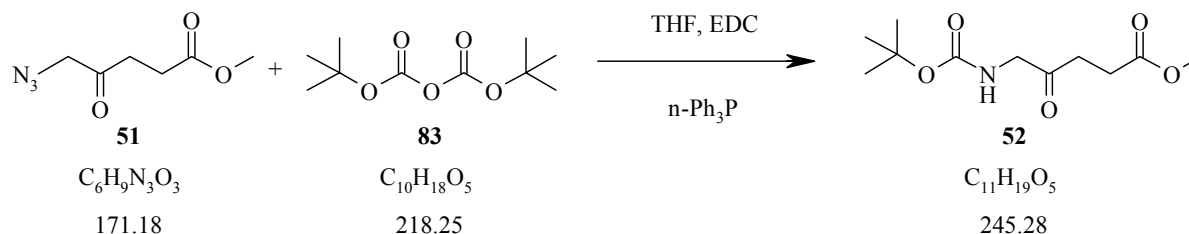
¹H-NMR (400 MHz, D₂O) : 4.10 (s, 2H, H₂C(5)); 2.87 (m, 2H, H₂C(3)); 2.67 (m, 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, D₂O) : 206.7 (C(4)); 179.4 (C(1)); 49.7 (C(5)); 36.9 (C(3)); 30.0 (C(2)).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 194 (100, [M+Na]⁺).

C₆H₉N₃O₃ (171.16) :	calc. :	C 42.11,	H 5.30,	N 24.55;
	obs. :	C 42.30,	H 5.40,	N 26.26.

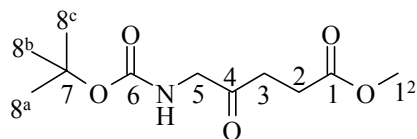
3.2.2.2 Synthèse de Boc-(ALA)-OMe (**52**)



Dans un bicol de 50 ml sont dissout sous agitation et à RT, 500 mg (1 éq.) de **51** dans un mélange THF/H₂O (40 :1) sous agitation et à température ambiante. 845 mg (1.1 éq.) de triphényle phosphine, 800 mg (1.3 éq.) de Boc anhydride et 840 mg (1.5 éq.) d' EDC sont ajoutés à la solution. Après 5 heures la réaction est stoppée. Le solvant est éliminé et le résidu est purifié par flash chromatographie (AcOEt/Hexane 1:1 à 3:1). Obtention d'un solide pâteux **52**.

Rendement : 335 mg (47 %).

Données analytiques de **52** :



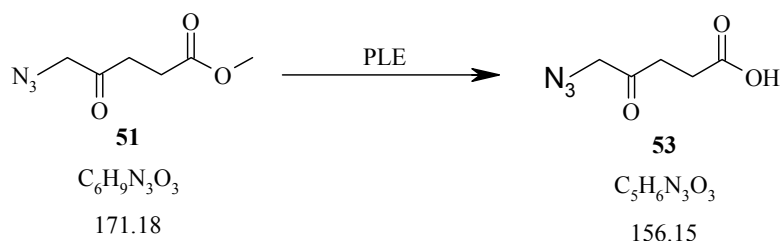
R_f (AcOEt) : 0.31.

IR (KBr) : 3387_s, 2979_s, 2932_s, 1735_s, 1719_s, 1701_s, 1997_s, 1523_s, 1518_s, 1508_s, 1500_s, 1438_s, 1412_s, 1392_s, 1365_s, 1252_s, 1209_s, 1165_s, 1098_m, 1060_m, 1024_m, 983_m, 737_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.29 (*sbr*, 1H, NH); 4.01 (*d*, 2H, ³J(5,NH)=4.78, H₂C(5)); 3.63 (*s*, 3H, H₃C(1²)); 2.71-2.68 (*m*, AA' d'un système AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.69-2.66 (*m*, BB' d'un système AA'BB', 2H, H₂C(2)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 204.8 (C(4)); 173.3 (C(1)); 156.0 (C(6)); 80.1 (C(7)); 52.2 (C(1²)); 50.6 (C(5)); 34.6 (C(3)); 28.6 (C(8^a), C(8^b), C(8^c)); 27.9 (C(2)).

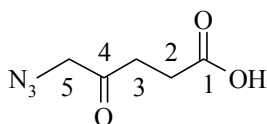
3.2.2.3 Synthèse de l'acide 5-azidolévulinique (**53**)



La synthèse de **53** s'effectue selon le Mode opératoire - Type IV. Déprotection de 1g de **51** à l'aide de PLE, en solution dans un tampon phosphate. La réaction est arrêtée après 24 heures. Extraction, séchage du produit, récupération d'un solide jaune, qui est purifiée par chromatographie-éclair (CH₂Cl₂/MeOH (2%)). Isolement d'un solide légèrement jaune **53**.

Rendement : 791 mg (86%).

Données analytiques de **53**:



R_f (AcOEt) : 0.52. **F** : 71 °C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.4 min., pureté >95%.

IR (KBr) : 3853_w, 3739_w, 3247_w, 3042_m, 2953_m, 2941_m, 2914_m, 2761_m, 2686_m, 2587_w, 2339_w, 2221_m, 2193_m, 2110_{vs}, 1720_{vs}; 1410_m, 1399_m, 1374_m, 1344_m, 1288_s, 1262_m, 1236_s, 1224_m, 1174_m, 1089_m, 1046_m, 931_m, 888_m, 796_m, 633_m, 558_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.01 (*s*, 2H, H₂C(5)); 2.73-2.21 (*m*, 4H, H₂C(3), H₂C(2)).

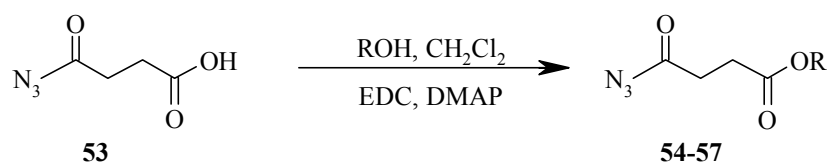
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 202.8 (C(4)); 178.1 (C(1)); 57.3 (C(5)); 34.1 (C(3)); 27.5 (C(2)).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 158 (100, [M+H]⁺), 139 (24).

HRMS (ESI) : calc. pour [C₅H₇N₃O₃Na]⁺ 180.0380 trouvé 180.0379.

3.2.2.4 Estérification de l'acide 5-azidolévulinique

Mode opératoire - Type V



Composé	Alcool	temps	Pm [g/mol]
54	H ₃ C(CH ₂) ₅ -OH	12 heures	241.29
55	HO-(CH ₂) ₃ -OH	12 heures	354.32
56	HO-(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ -OH	20 heures	384.35
57	C(CH ₂ -OH) ₄	20 heures	692.60
91	Géraniol	12 heures	293.36
92	Phytol	12 heures	435.64

Dans un bicol de 25 ml, préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, sont placés 10 ml de CH₂Cl₂ anhydre. Le solvant est ensuite refroidi sur un bain de glace. Les réactifs sont ensuite rajoutés dans l'ordre suivant : l'alcool ROH correspondant, DMAP, EDC et finalement **53**. La réaction est laissée à RT durant la nuit.

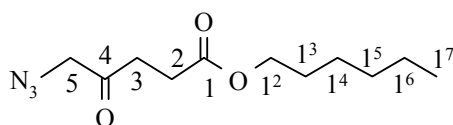
Le solvant est éliminé à l'aide de l'évaporateur rotatif, le résidu est ensuite purifié à l'aide d'une colonne de chromatographie, dont les caractéristiques sont les suivantes: hauteur 30 cm et de diamètre de 2.5 cm; 50g de silice 60, grosseur des grains 0.063-0.200; en utilisant comme éluant (AcOEt/hexane). Après évaporation du solvant, le produit obtenu est séché à la pompe à huile. Isolation de l'ester pur **54-57**.

3.2.2.4.1 Synthèse du 5-azido-4-oxo-pentanoic acide hexyle ester (54)

La synthèse de **54** est effectuée selon le Mode opératoire - Type V. 10 ml de CH₂Cl₂ sont refroidi à 0°C, adjonction de 650 mg (6.4 mmol) de hexanol, 390 mg (3.2 mmol) de DMAP, de 671 mg (3.5 mmol) EDC, puis de 500 mg (3.2 mmol) de **53**. Le mélange est laissé à t.a. durant 12 heures. Le liquide brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est adsorbé sur silice, puis chromatographié (AcOEt/Hexane 3:1 à 1:0), 2 colonnes sont nécessaire, afin d'éliminer totalement l'excès. Isolement d'un liquide jaune pâle **54**.

Rendement : 625 mg (81 %).

Données analytiques de **54**:



R_f (AcOEt) : 0.65

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.7 min., pureté >95%.

IR (KBr) : 3444_w, 2958_s, 2932_s, 2861_m, 2542_w, 2105_{vs}, 1729_{vs}, 1468_m, 1417_m, 1397_m, 1354_m, 1281_m, 1198_s, 1096_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.03 (*t*, ³*J*(1², 1³)=6.6, 2H, H₂C(1²)); 4.01 (*s*, 2H, H₂C(5)), 2.71-2.68 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.64-2.59 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 1.58 (*m*, 2H, H₂C(1³)); 1.34-1.24 (*m*, 6H, H₂C(1⁴), H₂C(1⁵), H₂C(1⁶)); 0.86 (*t*, ³*J*(1⁷, 1⁶)=6.8, 2H, H₂C(1⁷)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 203.5 (C(4)); 172.8 (C(1)); 65.5 (C(1²)); 57.8 (C(5)); 34.8 (C(3)); 31.8 (C(1⁵)); 28.9 (C(1³)); 28.2 (C(2)); 25.9 (C(1⁴)); 22.9 (C(1⁶)); 14.3 (C(1⁷)).

MS (ESI⁺) *m/z* intensité relative 265 (100, [M+Na]⁺), 242 (23, [M+H]⁺).

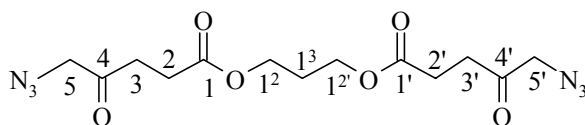
HRMS (ESI) cal pour [C₁₁H₁₉N₃O₃Na]⁺ 264.2792; trouvé 264.2791.

3.2.2.4.2 Synthèse du Bis(5-azido-4-oxo-pentanoyloxy)-propyle ester (55)

La synthèse de **55** est effectuée selon le Mode opératoire - Type V, en tenant compte du fait que deux molécules d'acide sont couplées à une molécule d'alcool. 10 ml de CH₂Cl₂ sont refroidi à 0°C, adjonction de 156 mg (2.1 mmol) de 1,2 propanediol, 561 mg (4.6 mmol) de DMAP, de 1058 mg (5.5 mmol) de EDC, puis de 780 mg (5 mmol) de **53**. Le mélange est laissé à température ambiante durant 12 heures. Le liquide brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est adsorbé sur silice, puis chromatographié (AcOEt/Hexane 3:1 à 1:0). Isolement d'un liquide jaune pâle **55**.

Rendement : 602 mg (83 %).

Données analytiques de **55** :



R_f (AcOEt) : 0.43

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.5 min., pureté >94%.

IR (KBr) : 3800_w, 3424_w, 3036_m, 2941_m, 2914_m, 2757_w, 2686_m, 2558_w, 2335_w, 2221_m, 2193_m, 2111_{vs}, 1720_{vs}, 1410_s, 1399_s, 1374_m, 1344_m, 1288_s, 1262_s, 1235_s, 1224_m, 1174_m, 1089_m, 1046_m, 932_m, 888_m, 634_m, 558_m, 526_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.07 (*t*, ³J(1², 1³) = (1^{2'}, 1^{3'}) = 6.3, 4H, H₂C(1²), H₂C(1^{2'})); 3.97 (*s*, 4H, H₂C(5), H₂C(5')); 2.69-2.62 (*m*, 4H, H₂C(3), H₂C(3')); 2.59-2.54 (*m*, 4H, H₂C(2), H₂C(2')); 1.88 (*quin*, ³J(1³, 1²) = (1^{3'}, 1^{2'}) = 6.3, 2H, H₂C(3)).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 203.0 (C(4), C(4')); 172.1 (C(1), C(1')); 57.1 (C(5), C(5')); 34.2 (C(3), C(3')); 27.6 (C(1³)); 27.5 (C(2), C(2')).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 377 (100, [M+Na]⁺).

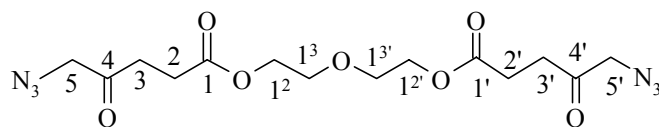
HRMS (ESI) cal pour [C₁₃H₁₈N₆O₆Na]⁺ 377.3116; trouvé 377.3119.

3.2.2.4.3 Synthèse du 5-Azido-4-oxo-pentanoic acide 2-[2-(5-azido-4-oxo-pentanoxy)-ethoxy]-ethyle ester (**56**)

La synthèse de **56** est effectuée selon le Mode opératoire - Type V, en tenant compte du fait que deux molécules d'acide sont couplées à une molécule d'alcool. 15 ml de CH₂Cl₂ sont refroidi à 0°C, adjonction de 280 mg (2.6 mmol) de diéthylène glycol, 152 mg (1.2 mmol) de DMAP, de 1300 mg (6.7 mmol) de EDC, puis de 1000 mg (6.4 mmol) de **53**. Le mélange est laissé à température ambiante durant 20 heures. Le brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est dissout dans un mélange de 30 ml d'eau et de 150 ml d'AcOEt. La phase organique est lavée avec 30 ml d'une solution d'acide citrique 1N, de NaHCO₃ sat. et de NaCl sat. Après élimination du solvant le résidu brunâtre est chromatographié (AcOEt/Hexane 1:1 à 3:1). Isolement d'un liquide jaune huileux **56**.

Rendement : 852 mg (84 %).

Données analytiques de **56** :



R_f (AcOEt) : 0.39

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.8 min., pureté >99%.

IR (KBr) : 3443w, 3375w, 2958m, 2913m, 2547w, 2105vs, 1729vs, 1643w, 1417m, 1385m, 1368m, 1349m, 1280s, 1199s, 1133s, 1095s, 1050m, 969m, 924m, 875m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.23-4.21 (*m*, 4H, H₂C(1²), H₂C(1^{2'})); 4.03 (*s*, 4H, H₂C(5), H₂C(5')); 3.68-3.66 (*m*, 4H, H₂C(1³), H₂C(1^{3'})); 2.67-2.74 (*m*, 8H, H₂C(3), H₂C(3'), H₂C(2), H₂C(2')).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 203.5 (C(4)), (C(4')); 172.6 (C(1)), (C(1')); 69.3 (C(1³)), (C(1^{3'})); 64.2 (C(1²)), (C(1^{2'})); 57.8 (C(5)), (C(5')); 34.8 (C(3)), (C(3')); 28.2 (C(2)), (C(2')).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 407 (100, [M+Na]⁺).

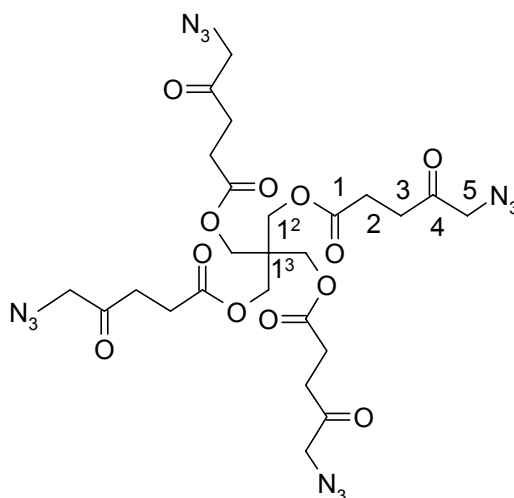
HRMS (ESI) cal pour [C₁₄H₂₀N₆O₇Na]⁺ 407.3378; trouvé 407.3374.

3.2.2.4.4 Synthèse d'un dendrimère contenant ALA (**57**)

La synthèse de **57** est effectuée selon le Mode opératoire - Type V, en tenant compte du fait que quatre molécules d'acide sont couplées à une molécule d'alcool. 10 ml de CH₂Cl₂ sont refroidi à 0°C, adjonction de 95 mg (1 éq.) de pentaerythritol, 360 mg (4.2 éq.) de DMAP, de 670 mg (5 éq.) de EDC, puis de 500 mg (4.5 éq.) de **53**. Le mélange est laissé à température ambiante durant 20 heures. Le brut, isolé après concentration du mélange réactionnel, est adsorbé sur silice, est dissout dans un mélange de 30 ml d'eau et de 150 ml d'AcOEt. La phase organique est lavée avec 30 ml d'une solution d'acide citrique 1N, de NaHCO₃ sat. et de NaCl sat. Après élimination du solvant le résidu est chromatographié (AcOEt/Hexane 2:1 à 5:1). Isolement d'un liquide jaune huileux **57**.

Rendement : 308 mg (64 %).

Données analytiques de **57** :



R_f (AcOEt) : 0.48.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 4.2 min., pureté >99%.

IR (KBr) : 3444_w, 2965_m, 2910_m, 2105_{vs}, 1730_{vs}, 1473_w, 1415_m, 1357_m, 1280_s, 1196_s, 1161_s, 1094_m, 1012_m, 922_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 4.12 (*s*, 8H, H₂C(5), H₂C(5'), H₂C(5''), H₂C(5''')); 4.04 (*s*, 8H, H₂C(1²), H₂C(1^{2'}), H₂C(1^{2''}), H₂C(1^{2'''})); 2.78-2.75 (*m*, AA' d'un AA'BB', 8H, H₂C(3), H₂C(3'), H₂C(3''), H₂C(3''')); 2.69-2.66 (*m*, BB' d'un AA'BB', 8H, H₂C(2), H₂C(2'), H₂C(2''), H₂C(2''')).

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 203.4 (C(4), C(4'), C(4''), C(4''')); 172.2 (C(1), C(1'), C(1''), C(1''')); 62.6 (C(1²), C(1^{2'}), C(1^{2''}), C(1^{2'''})); 57.7 (C(5), C(5'), C(5''), C(5''')); 42.6 (C(1³)); 34.8 (C(3), C(3'), C(3''), C(3''')); 27.9 (C(2), C(2'), C(2''), C(2''')).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 715 ([M+Na]⁺, 100), 690 (13), 299 (23).

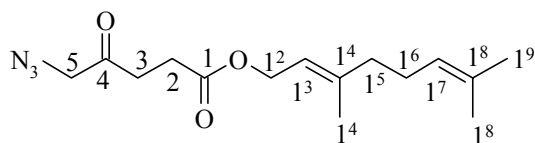
HRMS (ESI) : calc. Pour [C₂₅H₃₃N₁₂O₁₂Na]⁺ 715.2155, trouvé 715.2147.

3.2.2.4.5 Synthèse du 5-azoturelévulinate de géranyle **91**

La synthèse de **54** est effectuée selon le Mode opératoire - Type V.10 ml de CH₂Cl₂ sont refroidit à 0°C, adjonction de 650 mg (3.6 mmol) de Géraniol, 133 mg (1.09 mmol) de DMAP, de 665 mg (3.47 mmol) de EDC, puis de 500 mg (3.2 mmol) de **53**. Le mélange est laissé à température ambiante durant 12 heures. Le liquide brut, isolé après concentration du mélange réactionnel à la trompe à eau sans chauffer, est adsorbé sur silice, puis chromatographié (AcOEt/Hexane 1:9 à 1:0), deux colonnes sont nécessaires, afin d'éliminer totalement l'excès d'alcool. Isolement d'un liquide visqueux jaune pâle **91**.

Rendement : 671 mg (72 %).

Données analytiques de **91**



n_D^{20} : 1.491

R_f (AcOEt) : 0.7

IR (KBr) : 3444w; 2968m; 2919m; 2858w; 2555vw; 2105s; 1730s; 1672w; 1621vw; 1552vw; 1445m; 1384m; 1358m; 1280m; 1196s; 1171m; 1096m.

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ 5.33 (*t*, $^3J(1^3-1^2) = 7.1$ Hz, 1H, $\text{HC}(1^3)$); 5.09 (*m*, 1H, $\text{HC}(1^7)$); 4.61 (*d*, $^3J(1^2-1^3) = 7.1$ Hz, 2H, $\text{H}_2\text{C}(1^2)$); 4.04 (*s*, 2H, $\text{H}_2\text{C}(5)$); 2.75–2.62 (*m*, AA' d'un AA'BB'); 4H, $\text{H}_2\text{C}(3)$, $\text{H}_2\text{C}(2)$); 2.12–2.04 (*m*, 4H, $\text{H}_2\text{C}(1^6)$, $\text{H}_2\text{C}(1^5)$); 1.71 (*s*, 3H, $\text{H}_3\text{C}(1^{4a})$), 1.70 (*s*, 3H, $\text{H}_3\text{C}(1^{8a})$); 1.61 (*s*, 3H, $\text{H}_3\text{C}(1^9)$).

$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ 203.4 (C(4)); 172.7 (C(1)); 143.1 (C(1⁴)); 132.3 (C(1⁸)); 124.1 (C(1⁷)); 118.3 (C(1³)); 62.3 (C(1²)); 58.0 (C(5)); 39.9 (C(1⁵)); 34.9 (C(3)); 28.3 (C(2)); 26.7 (C(1⁶)); 26.1 (C(1^{8a})); 18.1 (C(1⁹)); 16.9 (C(1^{4a})).

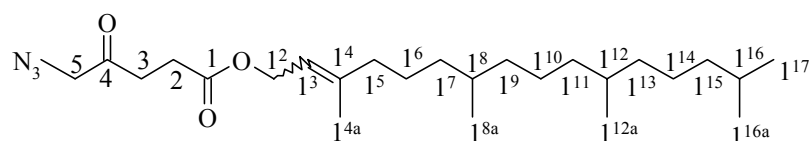
MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 335.1(10), 317.1(20), 316.1(100, $[\text{M} + \text{Na}]^+$), 242.5(10).

3.2.2.4.6 Synthèse du 5-azoturelévulinate de phytol **92**

La synthèse de **92** est effectuée selon le Mode opératoire - Type V.10 ml de CH_2Cl_2 sont refroidi à 0°C, adjonction de 1070 mg (3.61 mmol) de phytol, 110 mg (0.90 mmol) de DMAP, 641 mg (3.34 mmol) de EDC, puis de 500 mg (3.2 mmol) de **53**. Le mélange est laissé à température ambiante durant 12 heures. Le liquide brut, isolé après concentration du mélange réactionnel à la trompe à eau sans chauffer, est adsorbé sur silice, puis chromatographié (AcOEt/Hexane 1:9 à 1:0), deux colonnes sont nécessaires, afin d'éliminer totalement l'excès d'alcool. Isolement d'un liquide huileux jaune pâle **92**.

Rendement : 1210 mg (87 %).

Données analytiques de **92**



n_D^{20} : 1.475

R_f (1% MeOH dans CH₂Cl₂) : 0.8

IR (pastilles de KBr) : 3453_w; 3369_w; 2954_{vs}; 2927_{vs}; 2868_{vs}; 2732_w; 2105_{vs}; 1960_{vw}; 1809_w; 1730_{vs}; 1672_w; 1632_w; 1551_{vw}; 1462_s; 1416_s; 1379_s; 1366_s; 1279_s; 1247_s; 1196_{vs}; 1170_{vs}; 1095_s; 951_m.

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.38–5.31 (*m*, 1H, HC(1³)); 4.61 (*d*, ³*J*(1²–1³) = 7.3 Hz, 2H, H₂C(1²)); 4.04 (*s*, 2H, H₂C(5)); 2.75–2.64 (*m*, AA' d'un AA'BB', 4H, H₂C(3), H₂C(2)); 2.09–1.97 (*m*, 2H, H₂C(1⁵)); 1.76–1.69 (*m*, 3H, H₃C(1^{4a})); 1.58–1.48 (*m*, 1H, HC(1¹⁶)); 1.44–1.38 (*m*, 4H, H₂C(1⁶), HC(1⁸), HC(1¹²)); 1.34–1.19 (*m*, 12H, H₂C(1⁷), H₂C(1⁹), H₂C(1¹⁰), H₂C(1¹¹), H₂C(1¹³), H₂C(1¹⁴)); 1.18–1.02 (*m*, 2H, H₂C(1¹⁵)); 0.88 (*s*, 6H, H₃C(1¹⁷), H₃C(1^{16a})); 0.87 (*d*, ³*J*(1^{8a}–1⁸) = 2.4 Hz, 3H, H₂C(1^{8a})); 0.85 (*d*, ³*J*(1^{12a}–1¹²) = 2.6 Hz, 3H, H₃C(1^{12a})).

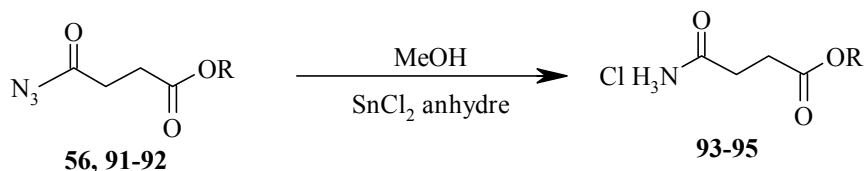
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃)¹ δ 203.4 (C(4)); 172.7 (C(1)); 144.0–143.6 (C(1⁴)); 118.9–118.1 (C(1³)); 62.3–62.0 (C(1²)); 58.0 (C(5)); 40.3–39.8 (C(1⁵)); 37.8 (C(1¹⁵)); 37.7–37.0 (C(1⁷); C(1⁹); C(1¹¹); C(1¹³)); 34.8 (C(3)); 33.2–33.1 (C(1⁸) et C(1¹²)); 28.4–28.3 (C(2)); C(1¹⁶)); 25.4 (C(1⁶)); 25.2 (C(1¹⁴)); 24.9 (C(1¹⁰)); 23.1–23.0 (C(1¹⁷); C(1^{16a})); 20.1 (C(1^{8a}) et C(1^{12a})); 16.8 (C(1^{4a})).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 490.1(7), 473.1(10), 458.8(100 [M+ Na]⁺), 458.4(60).

¹ La multiplicité de nos signaux s'explique par le fait que nous travaillons avec un mélange de deux isomères (33% *cis* + 61% *trans*), c'est pourquoi nous donnons les déplacements sous forme de zones.

3.2.2.5 Déprotection des dérivés de l'acide 5-azidolévulinique

Mode opératoire - Type VI



Composé	Alcool	temps	Pm [g/mol]
93	HO-(CH ₂) ₂ O(CH ₂) ₂ -OH	3 heures	375.24
94	Géraniol	3 heures	303.82
95	Phytol	3 heures	446.11

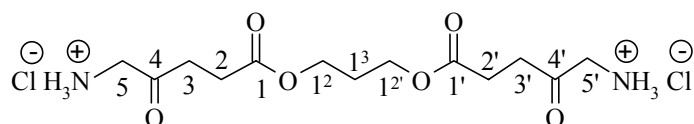
Dans un ballon de 50 ml muni d'un septum, sont placés sous azote et sous agitation magnétique (3 éq.) de SnCl₂ dans 10 ml de MeOH sec, puis 137 mg (1 éq.) de **56, 91-92** dissout préalablement dans 5 ml de MeOH sec. La réaction est stoppée après 3 heures, le milieu réactionnel devient rouge brun. Le résidu obtenu est adsorbé sur silice, puis il est purifié par chromatographie éclairée (∅ = 20 mm, h = 300 mm, MeOH 1%, 5%, 10% et 15% dans du CH₂Cl₂). Le produit obtenu **93-95** est conservé à -18 °C.

3.2.2.5.1 Synthèse du (5-amino-4-oxo-pentanoyloxy)-propyl ester hydrochloride **29**

La synthèse de **93** est effectuée selon le Mode opératoire - Type VI. 321.56 mg (1.70 mmol) de SnCl₂ sont placés dans 10 ml de MeOH, adjonction de 150 mg (0.42 mmol) de **56** dissout préalablement dans 5 ml de MeOH. Le mélange est laissé à température ambiante durant 3 heures. Le milieu réactionnel devient rouge. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie. Récupération d'un solide blanc hygroscopique **93**

Rendement : 153 mg (96 %).

Données analytiques de **93**



IR (pastilles de KBr) : 3441s; 2980vs; 2108vw; 1727vs; 1594m; 1489s; 1390vs; 1371s; 1311m; 1243s; 1212s; 1179s; 1140s; 1099m; 1053m; 986m.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 4.18 (*t*, $^3J(1^2 - 1^3) = ^3J(1^2 - 1^3) = 6.3$ Hz, 4H, H₂C(1²), H₂C(1²)); 4.08 (*s*, 4H, H₂C(5), H₂C(5')), 2.91–2.88 (*m*, AA' d'un AA'BB', 4H, H₂C(3), H₂C(3')); 2.72 – 2.69 (*m*, BB' d'un AA'BB', 4H, H₂C(2), H₂C(2')); 1.99 (*quin*, $^3J(1^3 - 1^2) = ^3J(1^3 - 1^2) = 6.3$ Hz, 2H, H₂C(1³)).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 202.1 (C(4) et (4')); 173.1 (C(1) et (1')); 61.6 (C(1²) et C(1²)); 47.4 (C(5') et C(5')); 34.5 (C(3) et C(3')); 28.1 (C(1³)); 27.6 (C(2) et C(2')).

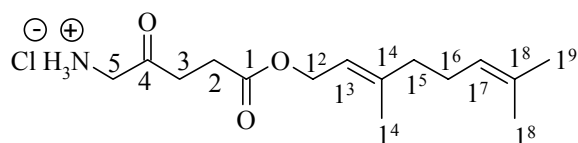
MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 304.2(18, [M - 2Cl]⁺), 303.2(100, [M - 2HCl]⁺), 291.3(5).

3.2.2.5.2 Synthèse du chlorhydrate de 5-aminolévulinate de géranyle **94**

La synthèse de **94** est effectuée selon le Mode opératoire - Type VI. 265 mg (1.40 mmol) de SnCl₂ sont placés dans 10 ml de MeOH, adjonction de 137 mg (0.47 mmol) de **91** dissout préalablement dans 5 ml de MeOH. Le mélange est laissé à température ambiante durant trois heures. Le milieu réactionnel devient rouge brun. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie. Récupération d'un solide jaune brun hygroscopique **94**.

Rendement : 139 mg (97 %).

Données analytiques de **94** :



R_f (10% MeOH dans CH₂Cl₂) : 0.2

IR (film; pastilles de KBr) : 3427_{vs}; 3222_{vs}; 2930_{vs}; 2366_w; 1729_{vs}; 1631_{vs}; 1541_m; 1496_m; 1385_{vs}; 1311_m; 1180_{vs}; 1137_s; 1103_s; 1056_m; 988_m.

¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.30 (*dt*, $^3J(1^3-1^2) = 7.1$ Hz, $^4J(1^3-1^5) = 1.3$ Hz, 1H, HC(1³)); 5.10 (*dt*, $^3J(1^7-1^6) = 6.7$ Hz, $^4J(1^7-1^{8a}) = ^4J(1^7-1^9) = 1.4$ Hz, 1H, HC(1⁷)); 4.60 (*d*, $^3J(1^2-1^3) = 7.1$ Hz, 2H, H₂C(1²)); 4.05 (*s*, 2H, H₂C(1)); 2.86-2.83 (*m*, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.70-2.66 (*m*, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(4)); 2.15-2.10 (*m*, 2H, H₂C(1⁶)); 2.07-2.03 (*m*, 2H, H₂C(1⁵)); 1.71 (*s*, 3H, H₃C(1^{4a})); 1.68 (*s*, 3H, H₃C(1^{8a})); 1.62 (*s*, 3H, H₃C(1⁹)).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD) δ 202.1 (C(4)); 173.1 (C(1)); 142.4 (C(1⁴)); 131.7 (C(1⁸)); 123.9 (C(1⁷)); 118.6 (C(1³)); 61.6 (C(1²)); 47.2 (C(1)); 39.6 (C(1⁵)); 34.4 (C(3)); 27.6 (C(2)); 26.4 (C(1⁶)); 24.9 (C(1^{8a})); 16.8 (C(1⁹)); 15.4 (C(1^{4a})).

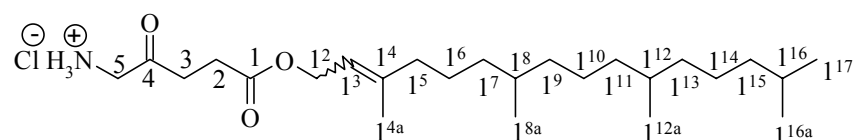
MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 290.2 (7), 284.1 (22), 269.1 (100, [M-Cl]⁺), 268.1 (16, [M-H]⁺).

3.2.2.5.3 Synthèse du chlorhydrate de 5-aminolévulinate de phytol **95**

La synthèse de **95** est effectuée selon le Mode opératoire - Type VI. 265 mg (1.40 mmol) de SnCl₂ sont placés dans 10 ml de MeOH, adjonction de 205 mg (0.47 mmol) de **92** dissout préalablement dans 5 ml de MeOH. Le mélange est laissé à température ambiante durant trois heures. Le milieu réactionnel devient rouge brun. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie. Récupération d'un solide brun hygroscopique **95**.

Rendement : 197 mg (94 %).

Données analytiques de **95** :



R_f (10% MeOH dans CH₂Cl₂) : 0.2

IR (pastilles de KBr) : 3440 m ; 3201 m ; 2954 vs ; 2927 vs ; 2869 vs ; 1727 vs ; 1619 m ; 1466 s ; 1426 m ; 1384 s ; 1367 m ; 1311 m ; 1210 m ; 1186 m ; 1130 m ; 991 m .

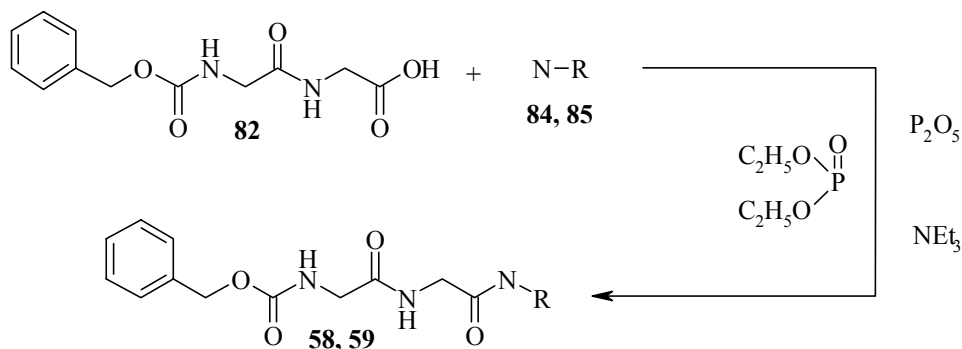
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 5.34 (t, ³ $J(1^3-1^2) = 7.1$ Hz, 1H, HC(1³)); 4.61 (d, ³ $J(1^2-1^3) = 7.2$ Hz, 2H, H₂C(1²)); 4.07 (s, 2H, H₂C(5)); 2.87-2.84 (m, AA' d'un AA'BB', 2H, H₂C(3)); 2.70-2.66 (m, BB' d'un AA'BB', 2H, H₂C(2)); 2.18-2.02 (m, 2H, H₂C(1⁵)); 1.71 (s, 3H, H₃C(1^{4a})); 1.60-1.50 (m, 1H, HC(1⁶)); 1.42-1.36 (m, 4H, H₂C((1⁶), HC(1⁸), HC(1¹²))); 1.33-1.20 (m, 12H, H₂C(1⁷), H₂C(1⁹), H₂C(1¹⁰), H₂C(1¹¹), H₂C(1¹³), H₂C(1¹⁴)); 1.18-1.09 (m, 2H, H₂C(1¹⁵)); 0.91 (s, 6H, H₃C(1¹⁷), H₃C(1^{16a})); 0.90-0.88 (m, 6H, H₂C(1^{8a}), H₃C(1^{12a})).

¹³C-NMR (100 MHz, CD₃OD)¹ δ 202.0 (C(4)); 173.1 (C(1)); 143.9-142.8 (C(1⁴)); 119.1-118.5 (C(1³)); 61.7-61.4 (C(1²)); 47.6 (C(5)); 39.8 (C(1⁵)); 39.5 (C(1¹⁵)); 37.5-36.9 (C(1¹³); C(1¹¹); C(1⁹) et C(1⁷)); 34.4 (C(3)); 32.9-32.2 (C(1⁸) et C(1¹²)); 28.2-28.1 (C(1⁶)); 27.7 (C(2)); 25.6-25.1 (C(1⁶)); 24.9-24.8 (C(1¹⁰)); 24.5-24.4 (C(1¹⁴)); 22.6-22.1 (C(1^{16a}) et C(1¹⁷)); 19.2-19.1 (C(1^{12a}) et C(1^{8a})); 15.4 (C(1^{4a})).

1 A noter que la multiplicité de nos signaux s'explique par le fait que nous travaillons avec un mélange de deux isomères (33% cis + 61% trans), c'est pourquoi nous donnons les déplacements sous forme de zones.

3.2.3 Synthèse de dérivés contenant la séquence Gly-Gly comme substrats pour l'élucidation par histoenzymographie (4Me-β-NA) ou par fluorescence (AMC) des activités protéolytiques cellulaires

Mode opératoire - Type VII



Composé	Marqueur (R)	temps	Température	Pm [g/mol]
58	4-méthylcoumaryl-7-amide	2 heures	110 °C	423.43
59	4-méthoxy-β-naphtylamine	2 heures	110 °C	421.46

Dans un bicol de 25 ml préalablement séché et placé sous atmosphère inerte d'azote, sont placés sous agitation (2.2 éq.) de pentoxyde de phosphore et 4 ml de diéthyle phosphite. La solution est chauffée à 100°C. A la solution est ajoutée une suspension du marqueur (1.1 éq.) dans 4 ml de diéthyle phosphite et (2.2 éq.) de triéthylamine. Après 20 minutes à 110 °C (1 éq.) de **82** est ajouté au mélange. La réaction est laissée à 110 °C durant 2 heures.

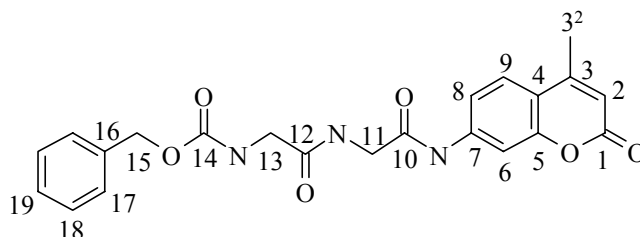
Le solvant est éliminé à l'aide du four à boules en chauffant à 50°C. Un résidu pâteux est récupéré, le produit est absorbé sur silice, puis il est purifié par chromatographie-éclair sur gel de silice (mélanges $CH_2Cl_2/MeOH$ 95 :5). Une recrystallisation dans du méthanol peut être nécessaire pour la récupération du dérivé peptidique **58-59** sous sa forme cristalline

3.2.3.1 Synthèse du ({[4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-ylcarbamoyle]-méthyl}-carbamoyle)-méthyl)-carbamic acid benzyl ester (**58**)

La synthèse de **58** s'effectue selon le Mode opératoire - Type VII. Mélange de 787 mg (2.2 éq.) de P_2O_5 dans 4 ml de diéthyle phosphite. A la solution chauffée à 110 °C, est ajouté une suspension de 500 mg (1.1 éq.) de 4-méthylcoumaryl-7-amide **84** dans 4 ml de diéthyle phosphite et 0.8 ml (2.2 éq.) de NEt_3 . Après 20 minutes, 700 mg (1.0 éq.) de **82** sont ajoutés et la solution est laissée à 100 °C durant 2 heure. Concentration et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie, récupération d'un solide blanc **58**.

Rendement : 535 mg (49 %).

Données analytiques de **58** :



R_f : (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1) : 0.54. **F** : >210°C décomposition.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.6 min., pureté >99%.

IR (KBr) : 3302_m, 3092_w, 2927_w, 1687_{vs}, 1651_s, 1621_m, 1589_m, 1531_m, 1416_w, 1398_w, 1370_w, 1254_m, 1229_m.

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : 10.35 (*s*, 1H, NH-C(7)); 8.32 (*t*, ³*J*(NH,11)=5.8, 1H, NH-H₂C(11)); 7.78 (*d*, ⁴*J*(6,8)=2.0, 1H, HC(6)); 7.74 (*d*, ³*J*(9,8)=8.7, 1H, HC(9)); 7.58 (*t*, ³*J*(NH,13)=6.1, 1H, NH-HC(13)); 7.49 (*dd*, ³*J*(8,9)=8.7, ⁴*J*(8,6)=2.0, 1H, HC(8)); 7.38-7.30 (*m*, 5H, HC(17), HC(17'), HC(18), HC(18'), HC(19)); 6.27 (*d*, ⁴*J*(2,3²)=1.2, 1H, HC(2)); 5.06 (*s*, 2H, H₂C(15)); 3.97 (*d*, ³*J*(11,NH)=5.8, 2H, H₂C(11)); 3.71 (*d*, ³*J*(13,NH)=5.9, 2H, H₂C(13)); 2.40 (*d*, ⁴*J*(3²,2)=1.2, 3H, H₃C(3²)).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : 170.6, 169.3 (C(10), C(12)); 160.9 (C(1)); 157.5 (C(14)); 154.5, 154.0, 142.9, (C(3), C(4), C(5), C(7)); 137.8 (C(16)); 129.2, 128.7, 128.6, (C(17), C(17'), C(18), C(18'), C(19)); 126.9 (C(9)); 116.0 (C(8)); 113.1 (C(2)); 106.4 (C(6)); 66.4 (C(15)); 44.3 (C(13)); 43.7 (C(11)); 18.9 (C(3²)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 423 (15, [M]⁺), 422 (11, [M-H]⁺), 314 (29).

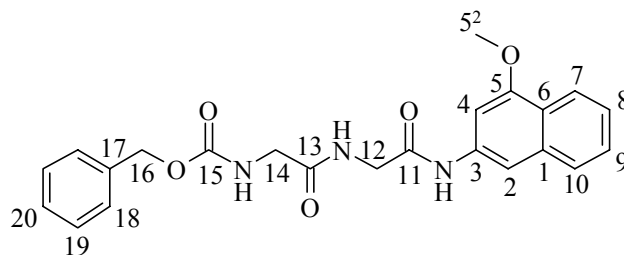
HRMS (ESI) cal pour [C₂₂H₂₁N₃O₆Na]⁺ 446.1323; trouvé 446.1423.

3.2.3.2 Synthèse du ({[4-méthoxy-naphtalene-2-ylcarbamoyle]-méthyl}-carbamoyle)-méthyl-carbamic acid benzyl ester (**59**)

La synthèse de **59** s'effectue selon le Mode opératoire - Type VII. Mélange de 410 mg (2 éq.) de P₂O₅ dans 4 ml de diéthyle phosphite. A la solution chauffée à 110 °C, est ajoutée une suspension de 250 mg (1.0 éq.) de 4-méthoxy-β-naphtylamine **85** dans 4 ml de diéthyle phosphite et 0.4 ml (2.0 éq.) de Net₃. Après 20 minutes, 385 mg (1.0 éq.) de **82** sont ajoutés et la solution est laissée à 100 °C durant 2 heures. Concentration et séchage du produit brut de réaction. Après purification par chromatographie, récupération d'un solide blanc **59**.

Rendement : 230 mg (33 %).

Données analytiques de **59** :



R_f : (CH₂Cl₂/CH₃OH 9:1) : 0.60. **F** : 178-180°C.

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 4.43 min., pureté >99%.

IR (KBr) : 3433 m , 3313 m , 2928 w , 1728 m , 1704 s , 1650 vs , 1610 m , 1588 m , 1504 s , 1448 m , 1429 m , 1400 m , 1386 m , 1296 m , 1258 m , 1229 m , 1205 m , 1110 m , 699 m .

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) : 8.04 (*d*, ³*J*(7,8)=8.3, 1H, HC(7)); 7.83 (*s*, 1H, HC(2)); 7.74 (*d*, ³*J*(10,9)=8.2, 1H, HC(10)); 7.47 (*ddd*, ³*J*(9,8)=³*J*(9,10)=6.9, ⁴*J*(9,7)=1.2, 1H, HC(9)); 7.39-7.28 (*m*, 6H, HC(8), HC(18), HC(18'), HC(19), HC(19'), HC(20)); 7.17 (*s*, 1H, HC(4)); 5.06 (*s*, 2H, H₂C(16)); 3.97 (*s*, 2H, H₂C(12)); 3.93 (*s*, 3H, H₃C(5²)); 3.74 (*s*, 2H, H₂C(14)).

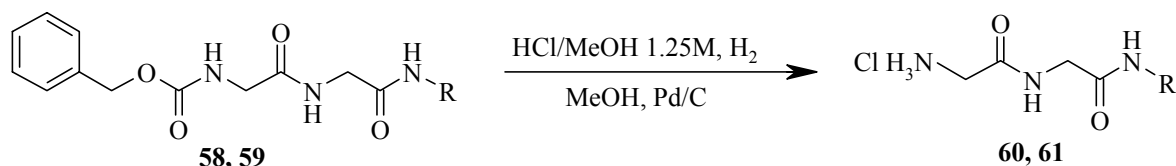
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) : 170.6, 168.6 (C(11), C(13)); 157.6 (C(15)); 156.0 (C(5)), 137.7, 137.4, 135.0 (C(1), C(3), C(17)); 129.2, 128.7, 128.6, (C(18), C(18'), C(19), C(19'), C(20)); 128.0 (C(9)); 127.9 (C(10)); 124.9 C(8)); 122.7 (C(6)); 122.1 (C(7)); 108.5 (C(2)); 99.6 (C(4)); 66.5 (C(16)); 56.3 (C(5²)). 44.3 (C(14)); 43.5 (C(12)).

MS (ESI)⁺ *m/z* intensité relative 445 (26), 444 (100, [M+Na]⁺), 413 (18), 269 (15), 255 (13).

HRMS (ESI) : calc. pour [C₂₃H₂₃N₃O₅Na]⁺ 444.1530 trouvé 444.1529.

3.2.4 Déprotection des Synthèse de dérivés contenant la séquence Gly-Gly comme substrats pour l'élucidation par histoenzymographie (4Me-β-NA) ou par fluorescence (AMC) des activités protéolytiques cellulaires

3.2.4.1 Mode opératoire - Type VIII



Composé	Marqueur (R)	temps	Température	PM [g/mol]
60	4-méthylcoumaryl-7-amide	4 heures	température ambiante	325.79
61	4-méthoxy-β-naphtylamine	4 heures	température ambiante	323.82

Dans un hydrogénateur sont placés 200 mg de **58** ou **59** dans 50 à 100 ml de méthanol, ainsi que 2 ml d'une solution 1.5 M de HCl dans du méthanol. L'hydrogénateur est purgé à l'aide d'argon, afin d'éviter l'inflammation du méthanol lors de l'adjonction du méthanol. 22 mg de Pd sur charbon actif sont ajoutés avec précaution au mélange. L'hydrogénateur est placé sous 4 bars d'hydrogène. La réaction est laissée sous agitation et à RT durant 4 heures.

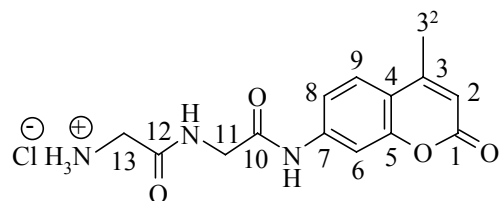
Le mélange est filtré sur célite, afin d'éliminer le catalyseur. Le méthanol est éliminé à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le solide obtenu est dissout à chaud dans un minimum de méthanol additionnée de quelques gouttes d'eau, puis de l'éther est additionné après refroidissement jusqu'à la formation d'un précipité. Le précipité est filtré sur Büchner, puis il est lavé avec de l'éther. Le solide blanc obtenu est séché à la pompe à huile.

3.2.4.2 Synthèse du 2-ammonium-[(4-méthyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl)carbamoyl]-methyl]-acetamide chlorid (**60**)

La synthèse de **60** s'effectue selon le Mode opératoire - Type VIII. Déprotection de 200 mg (1.0 éq.) de **58** par hydrogénation dans 100 ml de méthanol, en présence de 2 ml (4.0 éq.) d'une solution 1.25M de HCl dans du méthanol et en utilisant 22 mg de Pd/C comme catalyseur. Filtration, concentration et séchage du produit brut de réaction. Après recristallisation du produit (MeOH/H₂O, puis éther), Récupération d'un solide blanc **58**.

Rendement : 120 mg (78 %).

Données analytiques de **60** :



F : >240°C

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 2.9 min., pureté >95%.

IR (KBr) : 3341 m , 3303 m , 3074 m , 1690 vs , 1621 s , 1588 s , 1534 m , 1419 m , 1393 m , 1268 m , 1231 m .

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) : 10.84 (s , 1H, NH-C(7)); 8.88 (t , $^3J(\text{NH},11)=5.7$, 1H, NH-H₂C(11)); 8.19 (sbr , 3H, NH₃-C(13)); 7.82 (d , $^4J(6,8)=2.0$, 1H, HC(6)); 7.72 (d , $^3J(9,8)=8.7$, 1H, HC(9)); 7.56 (dd , $^3J(8,9)=8.7$, $^4J(8,6)=2.0$, 1H, HC(8)); 6.26 (d , $^4J(2,3^2)=1.2$, 1H, HC(2)); 4.08 (d , $^3J(11,\text{NH})=5.7$, 2H, H₂C(11)); 3.75 (s , 2H, H₂C(13)); 2.40 (d , $^4J(3^2,2)=1.2$, 3H, H₃C(3²)).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : 168.9, 167.4 (C(10), C(12)); 160.9 (C(1)); 154.4, 154.0, 143.0, (C(3), C(4), C(5), C(7)); 126.8 (C(9)); 116.1 (C(8)); 113.1 (C(2)); 106.5 (C(6)); 43.7 (C(11)); ~40.5 (C(13)); 18.9 (C(3²)).

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 369 (14), 368 (51, [M-Cl+DMSO]⁺), 291 (12), 368 (100, [M-Cl]⁺).

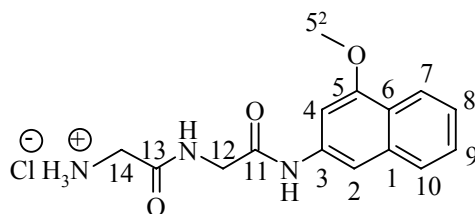
HRMS (ESI) cal pour [C₁₄H₁₆N₃O₄]⁺ 290.1135; trouvé 290.1135.

3.2.4.3 Synthèse du 2-ammonium-N-[(4-méthoxy-naphtalene-2-ylcarbamoyle)-methyl]-carbamoyle]-acetamide chlorid (**61**)

La synthèse de **61** s'effectue selon le Mode opératoire - Type VIII. Déprotection de 100 mg (1.0 éq.) de **59** par hydrogénation dans 50 ml de méthanol, en présence de 1 ml (4.0 éq.) d'une solution 1.25M de HCl dans du méthanol et en utilisant 20 mg de Pd/C comme catalyseur. Filtration, concentration et séchage du produit brut de réaction. Après recristallisation du produit (MeOH/H₂O, puis éther), Récupération d'un solide blanc jaune **61**.

Rendement : 64 mg (83 %).

Données analytiques de **61** :



F : >240°C

RP-HPLC (80% MeCN, C₁₈) : t_R = 3.4 min., pureté >99%.

IR (KBr) : 3312 m , 3115 m , 2926 m , 2849 m , 2606 w , 1689 m , 1642 vs , 1593 s , 1586 m , 1540 m , 1486 m , 1460 m , 1380 m , 1264 m , 1239 m , 1139 m , 1111 m .

¹H-NMR (400 MHz, DMSO- d_6) : 10.46 (s , 1H, NH-C(3)); 8.92 (t , $^3J(\text{NH},12)=5.8$, 1H, NH-H₂C(12)); 8.28 (sbr , 3H, NH₃-C(14)); 8.04 (d , $^3J(7,8)=8.4$, 1H, HC(7)); 7.87 (s , 1H, HC(2)); 7.74 (d , $^3J(10,9)=8.2$, 1H, HC(10)); 7.47 (ddd , $^3J(9,8)=^3J(9,10)=6.8$, $^4J(9,7)=1.3$, 1H, HC(9)); 7.47 (ddd , $^3J(8,7)=^3J(8,9)=6.8$, $^4J(8,10)=1.3$, 1H, HC(8)); 7.29 (d , $^4J(4,\text{NH})=1.7$, 1H, HC(4)); 4.07 (s , $^3J(12,\text{NH})=5.8$, 2H, H₂C(12)); 3.94 (s , 3H, H₃C(5²)); 3.66 (s , 2H, H₂C(14)).

¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d_6) : 168.3, 167.4 (C(11), C(13)); 155.9 (C(5)); 137.8, 135.0 (C(1), C(3)); 128.0 (C(9)); 127.9 (C(10)); 124.9 (C(8)); 122.7 (C(6)); 122.1 (C(7)); 108.6 (C(2)); 99.9 (C(4)); 56.4 (C(5²)). 43.7 (C(12)); ~40 (C(14)) sous DMSO.

MS (ESI)⁺ m/z intensité relative 292 (18), 288 (100, [M-Cl]⁺).

HRMS (ESI) : calc. Pour [C₁₅H₁₈N₃O₃]⁺ 288.1343 trouvé 288.1344

4 Bibliographie

- [1] Raab, O. *Z.Biol.* **1900**, 39, 524.
- [2] Policard, A. *Compt.Rend.Soc.Biol.* **1924**, 91, 1423.
- [3] Ronchese, F. *Oral.Surg.Oral.Med.Path.* **1954**, 7, 967.
- [4] Fritsch, C.; Batz, J.; Bolsen, K.; Schulte, K. W.; Zumdick, M.; Ruzicka, T.; Goerz, G. *Photochem.Photobiol.* **1997**, 66(1), 114.
- [5] Dougherty, T. J. *J.Clin.laser Med.Surg.* **1996**, 14, 219.
- [6] Dougherty, T. J. *J.Natl.Cancer Inst.* **1974**, 52, 1333.
- [7] Weishaupt, K. R.; Gomer, C. J.; Dougherty, T. J. *Cancer Res.* **1976**, 36, 2326.
- [8] Peng, Q.; Moan, J.; Neslend, J. M. *Ultrastruct.Pathol.* **1996**, 20, 109.
- [9] Spikes, J. D. *Unpublished.results* **1995**, 0, 0.
- [10] Goldsten, J. L.; Brown, M. S.; Anderson, D. W.; Russell, W. J. *Rev.Cell.Biol.* **1985**, 1, 1.
- [11] Biolo, R.; Jori, G.; Pratesi, R.; Rither, B.; Kenny, M. E.; Rodgers, M. A. J. *Photochem.Photobiol.* **1994**, 59, 362.
- [12] Datta, S. N.; Allman, R.; Loh, C. S.; Mason, M.; Matthews, P. N. *British.Journal of Urology* **1997**, 80, 421.
- [13] Dougherty, T.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W. *J.Natl.Cancer Inst.* **1998**, 90, 889.
- [14] Gilbert, A. *J.Molecular.Photochemistry.* **1991**, 0, 91.
- [15] Turro, N. J. *Singlet oxygen and chemilluminescence organic reaction*; University Science Bokks: California, 1991; pp 583-593.
- [16] Pass, H. I. *J.Natl.Cancer Inst.* **1993**, 86, 443.
- [17] Gilbert, A.; Baggott, J. *J. Molecular Photophysics. Essebials of molecular chemistery*; CRC press: Boca Raton: 1991; pp 1-10.
- [18] Moan, J.; Christensen, T. *Photobiochem.Photobiophys.* **1981**, 2, 291.
- [19] Foote, C. S. *Mechanisms of photo-oxygenation. In Porphyrin localization and treatment of tumor*; Alan R. Liss: New York, 1984; pp 3-18.
- [20] Pandey, R. K.; Majchrzycki, J. F.; Smith, K. M.; Dougherty, T. J. *Proc.SPIE* **2002**, 1065, 164.
- [21] *Photochem.Photobiol.* **1986**, 43, 681.
- [22] Lash, T. D. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1996**, 2(10), 1197.
- [23] Lash, T. D.; Novak, B. H. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1995**, 34(6), 683.
- [24] Montsforts, F. P.; Meier, A.; Haake, G.; Höper, F. *Tetrahedron Lett.* **1991**, 32(29), 3481.

- [25] Montsforts, F. P.; Scheurich, G.; Haake, G.; Bats, J. W. *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* **1992**, *31*(12), 1592.
- [26] Doiron, D. R.; Keller, G. S. *Curr.Probl.Derm.* **1986**, *15*, 85.
- [27] Cortese, D. A.; Kinsey, J. H.; Woolner, L. B. *Mayo.Clin.Proc.* **1979**, *54*, 635.
- [28] Wilson, B. C.; Jeeves, W. P.; Lowe, D. M. *Photochem.Photobiol.* **1985**, *42*, 153.
- [29] Driver, I.; Lowdere, C. P.; Ash, D. V. *Phys.Med.Biol.* **1991**, *36*, 805.
- [30] Wilson, B. C. *Phys.Med.Biol.* **1986**, *31*, 327.
- [31] Henderson, B. W.; Bellnier, D. A.; Greco, W. R. *Cancer Res.* **2002**, *57*, 4000.
- [32] Richter, A. M.; Waterfield, E.; Jain, A. K. *Photochem.Photobiol.* **1990**, *52*, 495.
- [33] Richter, A. M.; Cerruti-Sola, S.; Sterberg, E. D. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.* **1990**, *5*, 231.
- [34] Kuebler, A.; Haase, T.; Staff, C. *Lasers Surg.Med.* **1999**, *25*, 60.
- [35] Taber, S. W.; Fingar, V. H.; Coots, C. T.; Wieman, T. J. *Clin.Cancer Res.* **1998**, *4*, 2741.
- [36] Fingar, V. H.; Wieman, T. J.; McMahon, K. S.; Haydon, P. S.; Halling, B. P.; Yuhas, D. A.; Winkelman, J. W. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 4551.
- [37] Hansch, C.; Leo, A. *Americal.Chemical.Society.* **1995**, *0*, 1.
- [38] Milgrom, L. R.; O'Neill, F. in *'The chemistery of natural products'*; Blackie: New York, 1993; p 363.
- [39] Svaasand, L. O. *Optical dosimetry for direct and interstitial photoirradiation therapy of malignat tumors. In photodynamic therapy: Basis principles and Clinical Application*; Mercel Dekker: New York, 1992; pp 369-385.
- [40] Wilson, B. C.; Jeeves, W. P.; Lowe, D. M.; Adam, G. *Light propagation in animal tissues in the wavelength range 375-825 nanometers. In porphyrin Localization and treatment of tumors*; Alan R Liss: New York, 1984; pp 211-225.
- [41] Wilkisch, P. A.; Jacka, F. *Studies of light propagation through tissue. In porphyrin localization and treatement of tumours*; Alan R Liss: New York, 1984; pp 149-161.
- [42] Bolin, F. P.; Preuss, L. E.; Cain, B. W. *A comparaisn of spectral transmittance for several mammalian tissues: effectsat PRT frequencies. In porphyrin localization and the treatment of tumors*; Alan R Liss: New York, 1984; pp 211-225.
- [43] Star, W. M.; Wilson, B. C.; Patterson, M. S. *Cancer Res.* **1992**, *67*, 705.
- [44] Dougherty, T. J.; Potter, W. R. *J.Photoch.Photobio.B* **1991**, *8*, 233.
- [45] Dougherty, T. J. *Adv.Photochem.* **1992**, *17*, 275.
- [46] Bernstein, E. F.; Thomas, G. F.; Smith, P. D. *Arch.Derm.* **1990**, *126*, 1303.
- [47] Mang, T. S.; Dougherty, T. J.; Potter, W. R. *Photochem.Photobiol.* **1987**, *45*, 501.
- [48] Belitchenko, I.; Melninkova, V.; Bezdetnaya, L. *Photochem.Photobiol.* **1998**, *67*, 584.
- [49] Spikes, J. D.; Bommer, J. C. *Photochem.Photobiol.* **1993**, *58*, 346.
- [50] Spikes, J. D. *Photochem.Photobiol.* **1992**, *55*, 797.

- [51] Potter, W. R.; Mang, T. S.; Dougherty, T. J. *Photochem.Photobiol.* **1987**, *46*, 97.
- [52] Boyle, D. G.; Potter, W. R. *Photochem.Photobiol.* **1987**, *46*, 997.
- [53] Kessel, D.; Woodburn, K.; Henderson, B. W.; Chang, C. K. *Photochem.Photobiol.* **1995**, *62*, 875.
- [54] Kessel, D.; Luo, Y. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.* **1998**, *42*, 89.
- [55] Moan, J. *Photochem.Photobiol.* **1986**, *43*, 681.
- [56] Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. *Br.J.cancer* **1972**, *26*, 239.
- [57] Berg, K.; Moan, J. *Photochem.Photobiol.* **1997**, *65*, 403.
- [58] Berg, K.; Steen, H. B.; Winkelman, J. C.; Moan, J. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.* **1992**, *13*, 59.
- [59] Berg, K.; Steen, H. B.; Winkelman, J. C.; Moan, J. *J.Photoch.Photobio.B* **1992**, *13*, 59.
- [60] Moan, J.; Pettersen, E. O.; Christensen, T. *Br.J.cancer* **1979**, *39*, 398.
- [61] Moan, J.; McGhie, J.; Jacobsen, P. B. *Photochem.Photobiol.* **1983**, *37*, 599.
- [62] Specht, K. G.; Rodgers, M. A. J. *Photochem.Photobiol.* **1990**, *51*, 319.
- [63] Gibson, S. L.; Murant, R. S.; Hilt, R. *Cancer Res.* **1988**, *48*, 3360.
- [64] Thomas, J. P.; Girotti, A. W. *Cancer Res.* **1989**, *49*, 1682.
- [65] Reyftman, J. P.; Santus, R.; Morliere, P.; Kohan, E. *Photobiochem.Photobiophys.* **1986**, *11*, 197.
- [66] Samali, A., Gorman, A. M., and Cotter, T. G. Apoptosis- the story so far... *Experientia* **52**, 933-941. **1996**.
Ref Type: Generic
- [67] Green, D. R. and Reed, J. C. Mitochondria et apoptosis. *Science* **281**, 1309-1316. **1998**.
Ref Type: Generic
- [68] Luster, M. I.; Simeonova, P. P.; Galluci, R.; Matheson, J. *Critical Reviews in Toxicology* **1999**, *29(5)*, 491.
- [69] *Clinical Orthopaedics and Related Research* **1978**, *130*, 5.
- [70] Korbelik, M. *J.Clin.laser Med.Surg.* **1996**, *14*, 329.
- [71] Merhi, Y.; Guidoin, R.; Provost, P. *Am.Heart J.* **1995**, *46*, 823.
- [72] Chaudhuri, K.; Keck, R. W.; Selman, S. H. *Photochem.Photobiol.* **1999**, *46*, 823.
- [73] Christensen, T.; Feren, K.; Moan, J.; Pettersen, E. *Br.J.cancer* **1981**, *44*, 717.
- [74] Berns, M. W.; Dahlman, A.; Johnson, F. M. *Cancer Res.* **1982**, *42*, 2325.
- [75] Kennedy, J. C.; Pottier, R. H. *Photochem.Photobiol.* **1992**, *14*, 275.
- [76] Milgrom, L. R. *The colours of life: An introduction to the chemistry of porphyrins en related compounds*; Oxford University Press: Oxford, 1997; pp 1-22.
- [77] Milgrom, L. R. *The colours of life: An introduction to the chemistry of porphyrins en related compounds*; Oxford University Press: Oxford, 1997; pp 98-111.

- [78] Senge, M. O. *Photochem.Photobiol.* **1993**, *57(1)*, 189.
- [79] Milgrom, L. R. *The colours of life: An introduction to the chemistry of porphyrins en related compounds*; Oxford University Press: Oxford, 1997; pp 112-155.
- [80] Milgrom, L. R. *The colours of life: An introduction to the chemistry of porphyrins en related compounds*; Oxford University Press: Oxford, 1997; pp 32-39.
- [81] Kannangara, C. G.; Gough, S. P.; Bruyant, P.; Hooker, J. K.; Kalin, A.; Von Wettstein, D. *Trends Biochem.Sci.* **1988**, *18*, 139.
- [82] Friedler, D. M.; Eckl, P. M.; Krammer, B. *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *33*, 39.
- [83] Gaullier, J. M.; Berg, K.; Peng, Q.; Anholt, H.; Selbo, P. K.; Ma, L. W.; Moan, J. *Cancer Res.* **1997**, 1481.
- [84] Dietel, W.; Bolsen, K.; Dickson, E.; Fritsch, C.; Pottier, R.; Wendenburg, R. *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *33*, 225.
- [85] Marti, A.; Lange, N.; Van Den Bergh, H.; Sedmera, D.; Jichlinski, P.; Kucera, P. *J.Urology* **1999**, *162*, 546.
- [86] Rossi, E.; Attwood, P. V.; Garcia-Webb, P.; Costin, K. A. *Biochem.Biophys.Acta* **1990**, *145*, 375.
- [87] StrÜbele, S.; Dressler, C.; Ismail, M. S.; Daskalaki, A.; Philipp, C.; Berlien, H. P.; Weitzel, H.; Liebsch, M.; Spielmann, H. *Proc.SPIE* **1995**, *2627*, 196.
- [88] Gibson, S. L.; Havens, J. J.; Foster, T. H.; Hilt, R. *Photochem.Photobiol.* **1997**, *65*, 416.
- [89] Sterenborg, H. J. C. M.; Saarnak, A. E.; Frank, R.; Motamedi, M. *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *35*, 159.
- [90] Bulter, A. R.; George, S. *Tetrahedron* **1992**, *48*, 7879.
- [91] Zhuo, R. X.; Du, B.; Lu, Z. R. *J.Controlled Release* **1999**, *57*, 249.
- [92] Kondo, M.; Hirota, N.; Takaoka, T.; Kajiwara, M. *cell biol.toxicol.* **1993**, *9*, 95.
- [93] He, D.; Behar, S.; Nomura, N.; Sassa, S.; Lim, H. W. *Photochem.Photobiol.* **1995**, *61*, 656.
- [94] Peng, Q.; Berg, K.; Moan, J.; Kongshaug, M.; Nesland, J. M. *Photochem.Photobiol.* **1997**, *65*, 235.
- [95] Pottier, R. H.; Kennedy, J. C. *Proc.SPIE* **1989**, *2625*, 2.
- [96] Krammer, B.; åberrriegler, K. *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *36*, 121.
- [97] Wyld, L.; Burn, J. L.; Reed, M. W. R.; Brown, N. J. *Br.J.cancer* **1997**, *76(6)*, 705.
- [98] Kriegmair, M.; Baumgartner, R.; Knfchel, R.; Stepp, H.; Hofstèdter, F.; Hofstetter, A. *J.Urology* **1996**, *155*, 105.
- [99] Divaris, D. X. G.; Kennedy, J. C.; Pottier, R. H. *Am.J.Pathol.* **1990**, *136*, 891.
- [100] Sima, A. A. F.; Kennedy, J. C.; Blakeslee, D.; Robertson, D. M. *Can.J.Neurol.Sci.* **1981**, *8*, 105.
- [101] Pottier, R. H.; Chow, Y. F. A.; Laplante, J. P.; Truscott, T. G.; Kennedy, J. C.; Beiner, L. A. *Photochem.Photobiol.* **1986**, *44*, 679.
- [102] Kennedy, J. C.; Pottier, R. H. *unpublished.observations.* **1986**, *0*, 0.

- [103] Thompson, M. S.; Gustafsson, L.; Palsson, S.; Bendsoe, N.; Stenberg, M.; Klinteberg, C. A.; Andersson-Engels, S.; Svanberg, K. *J.Porphyrins.Pthalocyanines*. **2001**, *5*, 147.
- [104] Kennedy, J. C.; Pottier, R. H.; Pross, D. C. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol*. **1990**, *6*, 143.
- [105] Kennedy, J. C.; Pottier, R. H.; Pross, D. C. *Photochem.Photobiol*. **1991**, *53*, 100.
- [106] Hua, Z.; Gibson, S. L.; Foster, T. H.; Hilt, R. *Cancer Res*. **1995**, *55*, 1723.
- [107] Malik, Z.; Ehrenberg, B.; Faraggi, A. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol*. **1989**, *4*, 195.
- [108] Malik, Z.; Lugaci, H. *Brit.J.Cancer* **1987**, *56*, 589.
- [109] Malik, Z.; Lugaci, H.; Hanania, J. *Exper.Hematol*. **1988**, *16*, 330.
- [110] Malik, Z.; Djaldetti, M. *Cell Diff*. **1979**, *8*, 223.
- [111] Whetsell, W. O.; Sassa, S.; Bickers, D.; Kappas, A. *J.Neuropathol.Exp.Neurol*. **1978**, *37*, 497.
- [112] Moan, J.; Iani, V.; Ma, L. W. *Proc.SPIE* **1996**, *2625*, 544.
- [113] Peng, Q.; Warloe, T.; Moan, J.; Heyerdahl, H.; Steen, H. B.; Nesland, J. M.; Giercksky, K. E. *Photochem.Photobiol*. **1995**, *62*, 906.
- [114] Cairnduff, F.; Springer, M. R.; Hudson, E. J.; Ash, D. V.; Brown, S. B. *Br.J.cancer* **2002**, *69*, 605.
- [115] Szeimies, R. M.; Sassy, T.; Landthaler, M. *Photochem.Photobiol*. **1994**, *59*, 73.
- [116] Loh, C. S.; MacRobert, A. J.; Bedwell, J.; Regula, J.; Krasner, N.; Bown, S. G. *Br.J.cancer* **1993**, *68*, 41.
- [117] Goff, B. A.; Bachor, R.; Kollias, N.; Hasan, T. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol*. **1992**, *15*, 239.
- [118] Warloe, T.; Peng, Q.; Steen, H. B.; Giercksky, K. E. *Localization of porphyrins in human basal cell carcinoma and normal tissue induced by topical application of 5-aminolevulinic acid. In photodynamic therapy and biomedical lasers*; Elsevier: Amsterdam, 1992; pp 454-458.
- [119] Martin, A.; Tope, W. D.; Grevelink, J. M.; Starr, J. C.; Fewkes, J. L.; Flotte, T. J.; Deutsch, T. F.; Anderson, R. R. *Arch.Derm*. **1995**, *287*, 665.
- [120] Fraga, C. G.; Onuki, J.; Lucesoli, F.; Bechara, E. J.; DiMascio, P. *carcino.-genesis*. **1994**, *15*, 2241.
- [121] Hermes-Lima, M. *free radical biol.med*. **1995**, *19*, 381.
- [122] Kennedy, J. C.; Sac, A.; Pottier, R. H. *unpublished.observations*. **1990**, *0*, 0.
- [123] Webber, J.; Kessel, D.; Fromm, D. *J.Surg.Res*. **1997**, *68*, 31.
- [124] Kennedy, J. C.; Marcus, S. L.; Pottier, R. H. *J.Clin.laser Med.Surg*. **1996**, *14*, 289.
- [125] Rebeiz, N.; Arkins, S.; Rebeiz, C. A.; Simon, J.; Zachary, J. F.; Kelley, K. W. *Cancer Res*. **1996**, *56*, 339.
- [126] Iinuma, S.; Farshi, S. S.; Ortel, B.; Hasan, T. *Br.J.cancer* **1994**, *70*, 21.
- [127] Gudgin Dickinson, E. F.; Pottier, R. H. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol*. **1993**, *29*, 91.
- [128] Brown, S. G. *Unpublished.results* **1997**, *0*, 0.
- [129] Inhoffen, H. H.; Brockmann, H.; Bliesener, K. M. *Ann.Chem*. **1969**, *730*, 173.

- [130] Cox, G. S.; Whitten, M. G.; Krieg, M. *J.Am.Chem.Soc.* **1982**, *104*, 6930.
- [131] Cox, G. S.; Bobillier, C.; Whitten, M. G. *Photochem.Photobiol.* **1982**, *36*, 401.
- [132] Krieg, M.; Whitten, M. G. *J.Am.Chem.Soc.* **1984**, *106*, 2479.
- [133] Cox, G. S.; Whitten, D. G. *J.Am.Chem.Soc.* **1987**, *100*, 1293.
- [134] Streckyte, G.; Berg, K.; Moan, J. *Proc.SPIE* **1995**, *2325*, 58.
- [135] Gudgin, E. F.; Pottier, R. H. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.* **1995**, *29*, 91.
- [136] KÜnig, K.; Schneckenburger, H.; Rfck, A.; Steiner, R. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.* **1993**, *18*, 287.
- [137] Berg, K.; Anholt, H.; Bech, O.; Moan, J. *Br.J.cancer* **1996**, *74*, 688.
- [138] Abels, C.; Heil, P.; Dellian, M.; Kuhnle, G. E. H.; Baumgartner, R.; Goetz, A. E. *Proc.SPIE* **1995**, *2371*, 210.
- [139] Rebeiz, N.; Rebeiz, C. C.; Arkins, S.; Kelley, K. W. *Photochem.Photobiol.* **1992**, *55*, 431.
- [140] Gegnebin, J.; Brunori, M.; Otter, M.; Juillerat-Jeanneret, L.; Monnier, P.; Iggo, R. *Gene therapy.* **1999**, *6*, 1742.
- [141] Novo, M.; Hfttmann, G.; Diddens, H. *J.Photoch.Photobio.B* **1996**, *34*, 143.
- [142] Granick, S.; Mauzerall, D. *J.Biol.Chem.* **1958**, *232*, 1119.
- [143] Kloek, J.; Vanhenegouwen, G. M. J. B. *Photochem.Photobiol.* **1996**, *64*, 994.
- [144] Nielsen, N. M.; Bundgaard, H. *J.Pharm.Sci.* **1988**, *77*, 285.
- [145] Kloek, J.; Vanhenegouwen, G. M. J. B. *Photochem.Photobiol.* **1996**, *64(6)*, 994.
- [146] Kloek, J.; Akkermans, W.; Vanhenegouwen, G. M. J. B. *Photochem.Photobiol.* **1998**, *67*, 150.
- [147] Gaullier, J. M.; Berg, K.; Peng, Q.; Anholt, H.; Selbo, P. K.; Ma, L. W.; Moan, J. *Cancer Res.* **1997**, *57*, 1481.
- [148] Uehlinger, P.; Zellweger, M.; WagniÅres, G.; Juillerat-Jeanneret, L.; Van Den Bergh, H.; Lange, N. *J.Photoch.Photobio.B* **2000**, *0*, 1.
- [149] Lange, N.; Jichlinski, P.; Zellweger, M.; Forrer, M.; Marti, A.; Guillou, L.; Kucera, P.; WagniÅres, G.; Van Den Bergh, H. *Brit.J.Cancer* **1999**, *0*, 0.
- [150] Uehlinger, P.; Zellweger, M.; WagniÅres, G.; Juillerat-Jeanneret, L.; Van Den Bergh, H.; Lange, N. *Photochem.Photobiol.* **2000**, *54*, 72.
- [151] Kemp, D. S.; Galakatos, N. G. *J.Org.Chem.* **1986**, *51*, 1821.
- [152] Greenwald, R. B. *Expert.Opin.Ther.Pat.* **1997**, *7*, 601.
- [153] Liu, M.; FrÄchet, J. M. J. *Pharm.Sci.Technol.Today* **1999**, *2*, 393.
- [154] Kono, K.; Liu, M.; FrÄchet, J. M. J. *Boconjugate.Chem.* **1999**, *10*, 1115.
- [155] Malik, N.; Evagorou, E. G.; Duncan, R. *Anti.-cancer Drugs* **1999**, *10*, 767.

- [156] Rittenhouse-Diakun, K.; van Leegoed, H.; Morgan, J.; Hryhorenko, E.; Paszkiewicz, G.; Whitaker, J. E.; Oseroff, A. R. *Photochem.Photobiol.* **1995**, *61*, 523.
- [157] Warloe, T. *Ph.D.dissertation.* **1995**, *0*, 0.
- [158] Berger, Y.; Siri, O.; Neier, R.; Juillerat-Jeanneret, L. *J.Med.Chem.* **2000**, *43*, 4738.
- [159] Jori, G. *J.Photoch.Photobio.A* **1992**, *62*, 371.
- [160] Greppi, A. *Thèse de doctorat de l'Université de Neuchâtel* **1999**, 94.
- [161] Merrifield, R. B. *J.Am.Chem.Soc.* **1963**, *85*, 2149.
- [162] Carpino, L. A.; Yan, G. Y. *J.Am.Chem.Soc.* **1970**, *92*, 5478.
- [163] Fields, G. B.; Noble, R. L. *Int.J.Peptide Protein Res.* **1990**, *35*, 161.
- [164] Greppi, A. *Thèse de doctorat de l'Université de Neuchâtel* **1999**, 98.
- [165] Greppi, A. *Thèse de doctorat de l'Université de Neuchâtel* **1999**, 101.
- [166] Uehlinger, P. *Travail de diplôme de l'Université de Genève* **1999**.
- [167] Uehlinger, P.; Zellweger, M.; Wagnières, G.; Juillerat-Jeanneret, L.; Van Den Bergh, H.; Lange, N. *J.Photochem.Photobiol.B: Biol.* **1999**, 213.
- [168] Kloek, J.; Venhenegouwen, G. M. J. B. *Photochem.Photobiol.* **1996**, *64*, 994.
- [169] Kloek, J.; Akkermans, W.; Vanhenegouwen, G. M. J. B. *Photochem.Photobiol.* **1998**, *67*, 150.
- [170] Marti, A.; Lange, N.; Van Den Bergh, H.; Sedmera, D.; Kucera, P. *J.Urology* **1998**, 312.
- [171] Berger, Y. *Travail de diplôme de l'Université de Neuchâtel* **1998**.
- [172] Moan, J.; Bech, O.; Gaullier, J. M.; Stokke, T.; Steen, H. B.; Ma, L. W.; Berg, K. *Int.J.Cancer* **1998**, *75*, 134.
- [173] Noodt, B. B.; Berg, K.; Stokke, T.; Peng, Q.; Nesland, J. M. *Br.J.cancer* **1996**, *74*, 22.
- [174] Cruse-Sawyer, J. E.; Griffiths, J.; Dixon, B.; Brown, S. B. *Brit.J.Cancer* **1998**, *77*, 965.
- [175] Strauss, W. S. L.; Sailer, R.; Schneckenburger, H.; Akgfun, N.; Gottfried, V.; Chetwer, L.; Kimel, S. *Photochem.Photobiol.* **1997**, *39*, 176.
- [176] Bodansky, M.; . *Principles of peptide synthesis*; Springer-Verlag: Berlin New York, 1993; pp 14-61.
- [177] Bodansky, M. *Peptide Chemistry: a practical textbook*; Berlin New York, 1993; pp 55-73.
- [178] Bodansky, M.; . *Principles of peptide synthesis*; Springer-Verlag: Berlin New York, 1993; pp 170-177.
- [179] Bodansky, M. *Peptide Chemistry: a practical textbook*; Berlin New York, 1993; pp 117-127.
- [180] Meienhofer, J.; Dzieduszycka, M.; Smulkowski, M.; Malofska, R. C.; Danho, W. *Int.J.Peptide Protein Res.* **1981**, *6*, 16.
- [181] Bindewald, R.; Hubbuch, A.; Danho, W.; Büllesbach, E. E.; Foehles, J.; Zahn, H. *Int.J.Peptide Protein Res.* **1984**, *23*, 368.

- [182] Bindewald, R.; Danho, W.; Büllsbach, E. E.; Bodansky, M.; Zahn, H. *Int.J.Peptide Protein Res.* **1984**, *23*, 376.
- [183] Chantereux, D.; Gamet, J. P.; Jaquier, R.; Verducci, R. *Tetrahedron* **1984**, *40*, 3087.
- [184] Ramage, R.; Ashton, C. P.; Hopton, D.; Parrott, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25*, 4825.
- [185] Carpino, L. A.; El Faham, A. *J.Org.Chem.* **1995**, *60*, 3561.
- [186] Bodansky, M.; Bodansky, A. *The practice of peptide synthesis*; Springer-Verlag: Berlin New York, 1994.
- [187] Mohr, P.; Waespe, N.; Tamm, C.; Gawronska, K.; Gawwronski, J. K. *Helv.Chim.Acta* **1983**, *66*, 2501.
- [188] Juillerat-Jeanneret, L.; Lohm, S.; Hamou, M. F.; Pinet, F. *Lab.Invest* **2000**, *80*, 973.
- [189] Langer, S.; Abels, C.; Botzlar, A.; Pahernik, S.; Rick, K.; Szeimies, R. M.; Goetz, A. E. *J.Invest.Derm.* **1999**, *112*, 723.
- [190] Döring, F.; Walter, J.; Will, J.; FÜcking, M.; Boll, M.; Amasheh, S.; Clauss, W.; Daniel, H. *J.Clin.Invest* **1999**, *101*, 2761.
- [191] Ortel, B.; Chen, N.; Brissette, J.; Dotto, G. P.; Maytin, E.; Hasan, T. *Brit.J.Cancer* **1998**, *77*, 1744.
- [192] Washbrook, R.; Fukuda, H.; Batlle, A.; Riley, P. *Br.J.cancer* **1997**, *75*, 381.
- [193] Furuse, K.; Fukioka, M.; Kato, H.; Horai, T.; Kubota, N.; Kodama, N. *J.Clin.Oncol.* **1993**, *11*, 1852.
- [194] Rud, E.; Gederaas, O.; Hogstet, A.; Berg, K. *Photochem.Photobiol.* **2000**, *71*, 640.
- [195] Irie, M.; Terada, T.; Sawada, K.; Saito, H.; Inui, K. I. *Pharm.Exp.Therap.* **2001**, *298*, 711.
- [196] Novotny, A.; Xiang, J.; Stummer, W.; Teuscher, N. S.; Smith, D. E.; Keep, R. F. *J.Neurochem.* **2000**, *75*, 321.
- [197] Battah, S. H.; Chee, C.; Nakanishi, H.; Gerscher, S.; MacRobert, A. J.; Edwards, C. *Bioconjugate.Chem.* **2001**, *12*, 980.
- [198] Khammungkhune, S.; Sigler, G. *Synthesis* **1980**, *8*, 614.
- [199] Paris, M.; Fehrentz, J. A.; Heitz, A.; Martinez, J. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 1569.
- [200] Appleton, D.; Duguid, A. B.; Lee, S. K.; Ha, Y. J.; Ha, H. J.; Leeper, F. J. *J.Chem.Soc., Perkin Trans.I.* **1998**, *0*, 89.
- [201] Chang, H. T.; Sharpless, K. B. *Tetrahedron Lett.* **1996**, *37*, 3219.
- [202] Samano, M. C.; Robins, M. J. *Tetrahedron Lett.* **1991**, *44*, 6293.
- [203] Ranu, B. C.; Sarkar, A.; Chakraborty, R. *J.Org.Chem.* **1994**, *59*, 4114.
- [204] Maiti, N.; Singh, M. P.; Micetich, G. R. *Tetrahedron Lett.* **1986**, *27*, 1423.
- [205] Vaultier, M.; Knouzi, N.; CarriÄ, R. *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 763.
- [206] Alfonso, C. A. M. *Tetrahedron Lett.* **1995**, *48*, 8857.
- [207] Tschamber, T.; Craig, C. J.; Muller, M.; Streith, J. *Tetrahedron* **1996**, *17*, 6201.
- [208] Dhaon, M. K.; Olsen, R. K.; Ramasamy, K. *J.Org.Chem.* **1982**, *47*, 1962.

- [209] Pretsch, E.; Simon, W.; Seibl, J.; Clerc, T. *Spectral data for structure determination of organic compounds*; Spingler-Verlag: Berlin, 1989.
- [210] Juillerat-Jeanneret, L.; Aubert, J. D.; Leuenberger, P. *J.Lab.Clin.Med.* **1997**, *130*, 603.
- [211] Juillerat-Jeanneret, L.; Pinet, F.; Hamou, M. F.; Zurich, M. G.; Monnet-Tschudi, F. 1999.
- [212] picot, A.; Grenouillet, P. *La sécurité en laboratoire de chimie et de biochimie*; Tec & Doc: Londres Paris New York, 1992; pp 200-202.
- [213] Pfaltz, A.; Anwar, S. *Tetrahedron Lett.* **1984**, *25(28)*, 2977.