



HAL
open science

Physico-chimie de méso-tétraphénylporphyrines glycoconjuguées pour la photothérapie dynamique : vers une meilleure compréhension de la distribution plasmatique et de la localisation subcellulaire ?

Benoît Chauvin

► **To cite this version:**

Benoît Chauvin. Physico-chimie de méso-tétraphénylporphyrines glycoconjuguées pour la photothérapie dynamique : vers une meilleure compréhension de la distribution plasmatique et de la localisation subcellulaire ?. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2011. Français. NNT : 2011PA114824 . tel-00660396

HAL Id: tel-00660396

<https://theses.hal.science/tel-00660396>

Submitted on 16 Jan 2012

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD 11
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
ÉCOLE DOCTORALE :
CHIMIE DE PARIS-SUD

PÔLE : CHIMIE

ANNÉE 2011

SÉRIE DOCTORAT N°1122

THÈSE

Présentée

À L'UNITÉ DE FORMATION ET DE RECHERCHE
FACULTÉ DE PHARMACIE DE CHÂTENAY-MALABRY
UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ PARIS-SUD 11

par

M. Benoît CHAUVIN

Physico-chimie de *méso*-tétraphénylporphyrines glycoconjuguées
pour la Photothérapie Dynamique
Vers une meilleure compréhension de la distribution plasmatique
et de la localisation subcellulaire ?

soutenue le 19 octobre 2011

JURY	Dr. Lina Bolotine	Rapporteur
	Pr. Jean-Pierre Dubost	Rapporteur
	Pr. Ludovic Duponchel	Examineur
	Dr. Robert Pansu	Examineur
	Dr. Philippe Maillard	Examineur
	Pr. Pierre Chaminade	Examineur
	Dr. Athena Kasselouri	Examineur
	Pr. Patrice Prognon	Directeur de thèse

« Ne rien négliger, ne rien mépriser, ne rien choisir. »

John Ruskin

>>>

Remerciements

Remerciements

>>>

au Docteur Lina Bolotine et au Professeur Jean-Pierre Dubost,
pour m'avoir fait l'honneur d'accepter le rôle de rapporteur.

au Docteur Robert Pansu et au Professeur Ludovic Duponchel,
pour avoir bien voulu juger ce travail.

au Docteur Philippe Maillard,
pour ses précieux conseils tout au long de ces années, pour son aide inestimable dans la coordination entre les différentes équipes et pour son enthousiasme.

au Professeur Pierre Chaminade,
pour m'avoir fait découvrir la MCR-ALS, pour son soutien (notamment lors d'une présentation orale à Rennes) et pour son aide précieuse tout au long de ces années.

au Docteur Athena Kasselouri,
pour son aide à l'élaboration du projet AP-CNRS et pour sa disponibilité.

au Professeur Patrice Prognon,
pour m'avoir proposé ce sujet passionnant et pour m'avoir encadré dans la partie universitaire de mon cursus.

à Ioannis Nicolis,

pour son aide précieuse, pour la validation de la MLR, mais surtout pour m'avoir fait découvrir R.

à Jean-Louis Paul,

pour avoir permis la réalisation des études de distribution plasmatique, pour ses précieux conseils et pour sa bonne humeur.

à l'équipe « Lipides » du service de Biochimie de l'HEGP,

pour la réalisation des ultracentrifugations & électrophorèses, un grand Merci notamment à Delphine(s), Moulika, Sophie et Benoît Védie.

à Bogdan Iorga,

pour tout ce que j'ai appris en travaillant à ses côtés, pour sa gentillesse et pour sa disponibilité.

à Fabrice Cordelières,

pour m'avoir fait découvrir la microscopie confocale, pour son aide précieuse et pour ses conseils.

à Danièle Carrez et Florent Poyer,

pour avoir permis la réalisation des expériences cellulaires, pour leur disponibilité et pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail.

à toute l'équipe « Porphyrines » de l'Institut Curie,

pour tous ces échanges passionnants sur la PDT et les porphyrines, et pour la qualité de leur accueil. Un grand Merci notamment à Alain Croisy, Jean-Luc Guerquin-Kern, Mihaela Lupu, Séverine Ballut et Guillaume Garcia. Je tiens également à remercier Marie-Paule Teulade-Fichou pour m'avoir permis de travailler au sein de son unité.

à Véronique Rosilio et à toute l'équipe « Porphyrines » de l'UMR-CNRS 8612,

pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. Je tiens notamment à remercier Katia pour la formation en culture cellulaire, Ali et Jean-Philippe, pour les échanges scientifiques.

à Jocelyne Blais,

pour tout ce qu'elle m'a apporté, depuis la rédaction de mon projet de bourse pour mon master jusqu'à la fin de ma thèse.

Remerciements

à Hanadi Ibrahim,

pour tous les bons moments passés ensemble au cours de ces années, pour son soutien et pour ces « débriefings ».

à Meriem, Rita, Xing-Yue & Thao,

pour la réalisation d'une grande partie des travaux présentés dans ce mémoire.

à tous les membres de l'EA 4041,

pour leur accueil et leur bonne humeur, notamment à Rabei, Juliette, Sonia & Louise. Je tiens à remercier Witek & Alain Tchapla pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail et pour les collaborations. Un grand Merci à Céline Rivière pour la réalisation des électrophorèses SDS-PAGE et pour son soutien dans la dernière ligne droite.

à Manuel Durand-Barthez,

pour la qualité et la variété de ses formations, notamment sur les logiciels portables.

au Docteur Pierre Faure et à Gisèle Georget,

pour m'avoir permis de réaliser mon travail de recherche dans de bonnes conditions matérielles.

à ces personnes rencontrées au cours de mes études et de mon internat,

pour tout ce qu'ils m'ont appris. Je tiens à remercier les docteurs André Rieutord, Maryse Camus, Alain Caubet & Martine Aupée, sans oublier le professeur Chaperon qui m'avait fait découvrir la modélisation.

à mes amis,

pour leur soutien. Une petite pensée pour Nicolas, Catherine, Jérémie, Jean, Erwan, Carolina, Niccolo, ... Et comment oublier tous mes coéquipiers de l'ASR, actuels ou anciens ? Un immense Merci à tous et notamment à Henri, Aimeric, William, François, Alain, Federico, Damien, Ange, Xavier et Gérald.

à ma famille,

pour tout ce qu'ils m'ont apporté et pour leurs encouragements au cours de mes études.

>>>

Sommaire

Tables & Index

> > >

1 > Table des Matières

Remerciements.....	5
--------------------	---

Sommaire

Tables & Index.....	11
---------------------	----

1 > Table des Matières.....	13
2 > Figures.....	16
3 > Tableaux.....	18
4 > Abréviations.....	18

Introduction.....	21
-------------------	----

Synthèse bibliographique

Photosensibilisateurs glycoconjugués en Photothérapie Dynamique.....	27
--	----

1 > Photothérapie Dynamique.....	30
1.1 > Aperçu historique.....	30
1.2 > Effet photodynamique.....	32
1.2.1 > <i>Processus photophysiques</i>	33
1.2.2 > <i>Mécanismes de mort cellulaire</i>	34
2 > Glycoconjugaison des photosensibilisateurs.....	35
2.1 > De l'intérêt des photosensibilisateurs glycoconjugués.....	35
2.1.1 > <i>Glycoconjugaison & ciblage des lectines</i>	35
2.1.2 > <i>Amélioration de la solubilité en milieu aqueux</i>	36
2.2 > Evaluation in vitro.....	37
2.2.1 > <i>Internalisation & photocytoxicité</i>	37
2.2.2 > <i>De l'absence de lien entre internalisation et photocytoxicité</i>	38

3 > Le difficile passage de la cellule à l'organisme.....	38
3.1 > Un mécanisme d'action plus complexe.....	40
3.1.1 > Réactions inflammatoires & effet bystander	40
3.1.2 > L'effet vasculaire	41
3.1.3 > Implications sur le protocole de traitement	42
3.2 > De l'internalisation in vitro à la sélectivité in vivo.....	43
3.2.1 > La cellule tumorale, une cible privilégiée ?	43
3.2.2 > Les vaisseaux sanguins, un compartiment non-neutre	44

Analyse Physico-chimique

Ionisation & Lipophilie.....	51
------------------------------	----

1 > Spectroscopie électronique à pH neutre.....	53
1.1 > Matériel et Méthodes.....	54
1.1.1 > Produits chimiques & matériel utilisés	54
1.1.2 > Enregistrement des spectres	55
1.1.3 > Analyse en Composantes Principales	55
1.2 > Agrégation en milieu aqueux.....	55
1.3 > Relation Structure – Spectroscopie électronique des monomères.....	57
1.3.1 > Modifications des spectres sous l'effet de la substitution	58
1.3.2 > Analyse en composantes principales sur les spectres	61
1.3.3 > Interprétation : du lien entre spectroscopie électronique et substitution	62
2 > Ionisation.....	64
2.1 > Matériel & Méthodes.....	66
2.1.1 > Produits chimiques & matériel utilisés	66
2.1.2 > Enregistrement des spectres	66
2.1.3 > Prédiction in silico	67
2.2 > Protonation des azotes tétrapyrroliques.....	70
2.2.1 > Spectroscopie électronique des formes diprotonées	70
2.2.2 > Élucidation de la diprotonation par MCR-ALS	72
2.2.3 > Prédiction in silico	85
2.3 > Déprotonation des hydroxyles phénoliques.....	88
3 > Lipophilie des différentes espèces.....	90
3.1 > Matériel & Méthodes.....	91

Tables & Index

3.1.1 > <i>Approche chromatographique : détermination du CHI</i>	91
3.1.2 > <i>Approche in silico de la lipophilie</i>	94
3.2 > Lipophilie des TPP sous forme non protonée.....	97
3.2.1 > <i>Evaluation chromatographique</i>	97
3.2.2 > <i>Comparaison des CHI avec les estimations in silico du log P</i>	102
3.3 > Lipophilie des TPP sous forme protonée.....	104
3.3.1 > <i>Variation du CHI en fonction du pH</i>	104
3.3.2 > <i>Prédiction in silico</i>	105

Des vaisseaux sanguins à la cellule tumorale

Distribution plasmatique & Localisation subcellulaire.....	109
--	-----

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques.....	111
1.1 > Matériel & Méthodes.....	114
1.1.1 > <i>Produits chimiques & biologiques</i>	114
1.1.2 > <i>Distribution plasmatique</i>	114
1.1.3 > <i>Constantes d'affinité pour l'albumine & les lipoprotéines</i>	116
1.1.4 > <i>Modélisation des interactions avec l'albumine</i>	117
1.2 > Résultats.....	117
1.2.1 > <i>Approche qualitative par spectroscopie</i>	117
1.2.2 > <i>Evaluation quantitative</i>	119
1.2.3 > <i>Affinité pour les lipoprotéines et l'albumine</i>	121
1.2.4 > <i>Modélisation des interactions avec l'albumine</i>	129
1.3 > Discussion.....	138
1.3.1 > <i>Distribution plasmatique des photosensibilisateurs</i>	138
1.3.2 > <i>De la distribution plasmatique aux constantes d'affinité</i>	139
1.3.3 > <i>Interactions avec l'albumine</i>	140
1.3.4 > <i>Explications possibles de l'affinité préférentielle pour les LDL</i>	142
2 > Internalisation & localisation subcellulaire.....	143
2.1 > Matériels & Méthodes.....	144
2.1.1 > <i>Localisation subcellulaire</i>	144
2.1.2 > <i>Internalisation</i>	145
2.1.3 > <i>Modélisation</i>	145
2.2 > Résultats de modélisation.....	146

2.2.1 > Hypothèse n°1 : internalisation de type « diffusion »	147
2.2.2 > Hypothèse n°2 : internalisation de type « endocytose »	149
2.3 > Résultats de microscopie et cytométrie.....	151
2.3.1 > Localisation subcellulaire de la TPP(pODEGOαManOH) ₃	151
2.3.2 > Internalisation de la TPP(pODEGOαManOH) ₃	152
2.4 > Discussion.....	155
2.4.1 > Internalisation et localisation subcellulaire de la TPP(pODEGOαManOH) ₃	155
2.4.2 > Orientation de la TPP(pODEGOαManOH) ₃ vers les endosomes de recyclage	158
Conclusion.....	161
Publications.....	165
Références bibliographiques.....	177

2 > Figures

Figure 1 - L'effet photodynamique.....	32
Figure 2 - Propagation de la lumière à travers les tissus.....	33
Figure 3 - Insertion d'un espaceur flexible : deux stratégies envisagées.....	36
Figure 4 - Un mécanisme d'action plus complexe à l'échelle tissulaire.....	40
Figure 5 - Mécanismes de destruction tissulaire.....	41
Figure 6 - Différences de vascularisation entre le tissu sain (A) et le tissu tumoral (B).....	45
Figure 7 - Internalisation médiée par les LDL.....	47
Figure 8 - Spectroscopie électronique des TPP : l'exemple de la TPP non substituée.....	54
Figure 9 - Agrégation des TPP : effet de la structure.....	56
Figure 10 - Agrégation des TPP au cours du temps.....	57
Figure 11 - Spectroscopie des TPP : effet du nombre et de la position du substituant.....	58
Figure 12 - Spectroscopie des TPP : effet de la nature du substituant.....	60
Figure 13 - Analyse en composantes principales.....	61
Figure 14 - Orbitales moléculaires du noyau porphyrine.....	62
Figure 15 - Effet électrodonneur selon la position de substitution.....	63
Figure 16 - Equilibre de diprotonation des TPP.....	64
Figure 17 - Effet de la diprotonation sur les spectroscopies électroniques de la TPP non substituée.....	65
Figure 18 - Exacerbation des effets de substitution à pH acide.....	71

Tables & Index

Figure 19 - Spectres enregistrés de pH 0,6 à 6,6.....	72
Figure 20 - MCR-ALS sans contraintes : illustration de l'ambiguïté rotationnelle.....	74
Figure 21 - Résultats de la MCR-ALS.....	79
Figure 22 - Résultats de la MCR-ALS sur les matrices excitation – émission pour la TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	80
Figure 23 - Prédiction des pK à partir des indices ET-State.....	86
Figure 24 - Spectres de la TPP(<i>m</i> OH) ₄ à pH basiques.....	88
Figure 25 - Spectres des TPP portant des hydroxyles déprotonés obtenus par MCR-ALS.....	89
Figure 26 - Estimateurs de lipophilie en conditions isocratiques.....	92
Figure 27 - Exemple de calcul du CHI de la TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	95
Figure 28 - Effet de la substitution sur les surfaces polaires et apolaires.....	98
Figure 29 - Accessibilité du noyau TPP selon la position de la substitution.....	100
Figure 30 - Proportion de surface apolaire en fonction du rayon de solvatation considéré.....	101
Figure 31 - Variation de CHI en fonction du pH.....	105
Figure 32 - Structure de la molécule d'albumine.....	112
Figure 33 - Spectre d'absorption de la TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄ dans le plasma.....	118
Figure 34 - Spectres des dérivés tétraglycoconjugués dans le plasma.....	119
Figure 35 - Effet de la liaison à l'albumine sur l'absorption de la TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	121
Figure 36 - Analyse d'après Scatchard de la liaison à l'albumine de la TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	123
Figure 37 - Limites de l'approche univariée.....	124
Figure 38 - Spectres des formes liées et non-liées optimisés par MCR-ALS.....	126
Figure 39 - Affinité pour les transporteurs plasmatiques en fonction de la lipophilie.....	128
Figure 40 - Structures d'albumine humaine disponibles.....	129
Figure 41 - Structure de la molécule d'albumine en présence d'acides gras.....	130
Figure 42 - Sites de liaison des TPP glycoconjuguées.....	131
Figure 43 - Sites de liaison des dendrimères.....	133
Figure 44 - Sites de liaison de la TPP.....	134
Figure 45 - Sites de liaison des TPP glycoconjuguées.....	135
Figure 46 - Sites de liaison des dendrimères.....	136
Figure 47 - Ouverture du site de liaison par liaison d'acides gras.....	137
Figure 48 - Principe du modèle de Trapp (cas d'un composé base).....	146
Figure 49 - Résultats de modélisation de type « diffusion ».....	148
Figure 50 - Résultats de modélisation de type « endocytose ».....	149
Figure 51 - Résolution par MCR-ALS de la colocalisation subcellulaire.....	150
Figure 52 - Localisation dans des vésicules.....	151
Figure 53 - Mise en évidence des agrégats de TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃ en vidéomicroscopie.....	152
Figure 54 - Internalisation mise en évidence en vidéomicroscopie.....	153
Figure 55 - Résolution spectrale sur les agrégats de TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	154
Figure 56 - Effet du sérum sur l'internalisation du photosensibilisateur.....	154

3 > Tableaux

Tableau 1 - Structures des tétraphénylporphyrines étudiées.....	24
Tableau 2 - Propriétés spectroscopiques électroniques dans le mélange méthanol – DMF 99 / 1 (v/v).....	59
Tableau 3 - Choix du nombre de composantes principales.....	61
Tableau 4 - Propriétés spectroscopiques dans le mélange méthanol – HCl 99 / 1 (v/v).....	70
Tableau 5 - Constantes de protonation des azotes & propriétés spectrales des espèces mises en jeu.....	78
Tableau 6 - Constantes d'ionisation déterminées à l'aide de <i>Marvin</i>	84
Tableau 7 - Exemples d'application du modèle basé sur les indices ET-State.....	87
Tableau 8 - Constantes de déprotonation des hydroxyles périphériques.....	89
Tableau 9 - Références pour la détermination du CHI.....	92
Tableau 10 - CHI mesurés et valeurs de log P calculées des TPP non protonées.....	96
Tableau 11 - Surfaces accessibles au solvant (ASA) & aires de projection.....	99
Tableau 12 - Valeurs de log P calculées des formes protonées.....	106
Tableau 13 - Principales caractéristiques des lipoprotéines.....	113
Tableau 14 - Distribution plasmatique des photosensibilisateurs.....	120
Tableau 15 - Divergence des résultats de régression non-linéaire selon la longueur d'onde.....	124
Tableau 16 - Logarithmes des constantes d'association des TPP pour les LDL, HDL et deux albumines....	127
Tableau 17 - Caractéristiques des surfaces d'interaction.....	132
Tableau 18 - Pourcentage d'association aux lipides dans les vésicules d'endocytose.....	149

4 > Abréviations

ACP	Analyse en Composantes Principales
CHI	<i>Chromatographic Hydrophobicity Index</i>
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CP	Composante Principale
DMF	Diméthylformamide
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EPR	<i>Enhanced Permeability and Retention</i>
E-State	<i>Electronic State</i>
ET-State	<i>Electrotopological-State</i>
HDL	Lipoprotéines de haute densité (<i>High Density Lipoprotein</i>)
HOMO	Orbitale occupée d'énergie la plus élevée (<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>)
HOMO-1	Orbitale occupée d'énergie immédiatement inférieure à l'orbitale HOMO
HSA	Albumine de sérum humain (<i>Human Serum Albumin</i>)
HSALIP	Albumine de sérum humain complexée à des acides gras

Tables & Index

IDL	Lipoprotéines de densité intermédiaire (<i>Intermediate Density Lipoprotein</i>)
LDL	Lipoprotéines de basse densité (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
<i>lof</i>	erreur d'ajustement (<i>lack of fit</i>)
LUMO	Orbitale libre d'énergie la plus faible (<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>)
LUMO+1	Orbitale libre d'énergie immédiatement supérieure à l'orbitale LUMO
MCR-ALS	<i>Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares</i>
MEG / DEG	MonoEthylèneGlycol / DiEthylèneGlycol
PBS	Tampon phosphate (Phosphate Buffered Saline)
PDT	Photothérapie dynamique (<i>PhotoDynamic Therapy</i>)
SMILES	<i>Simplified Molecular Input Line Entry Specification</i>
SVF	Sérum de veau fœtal
TDDFT	<i>Time Dependent Density Functional Theory</i>
VLDL	Lipoprotéines de très basse densité (<i>Low Density Lipoprotein</i>)
HT29	cellules d'adénocarcinome colorectal
Y79	cellules de rétinoblastome humain
A549	cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain
HT1080	cellules de fibrosarcome
TPP	5,10,15,20-tétraphénylporphyrine
TPP(<i>m</i> OH) ₃	5,10,15-tri-(<i>méta</i> -hydroxyphényl)-20-phénylporphyrine
TPP(<i>m</i> OH) ₄	5,10,15,20-tétra-(<i>méta</i> -hydroxyphényl)porphyrine
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₁	5-(<i>méta</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-10	5,10-di-(<i>méta</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)-15,20-diphénylporphyrine
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-15	5,15-di-(<i>méta</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)-10,20-diphénylporphyrine
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	5,10,15-tri-(<i>méta</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)-20-phénylporphyrine
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄	5,10,15,20-tétra-(<i>méta</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)porphyrine
TPP(<i>p</i> OH) ₃	5,10,15-tri(<i>para</i> -hydroxyphényl)-20-phénylporphyrine
TPP(<i>p</i> OH) ₄	5,10,15,20-tétra-(<i>para</i> -hydroxyphényl)porphyrine
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₁	5-(<i>para</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-10	5,10-di-(<i>para</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)-15,20-diphénylporphyrine
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-15	5,15-di-(<i>para</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)-10,20-diphénylporphyrine
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	5,10,15-tri(<i>para</i> -O-β-D-galactosyloxyphényl)-20-phénylporphyrine
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₄	5,10,15,20-tétra-(<i>para</i> -O-β-D-galactosyloxyphényl)porphyrine
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	5,10,15,20-tétra-(<i>para</i> -O-β-D-glucopyranosyloxyphényl)porphyrine
TPP(<i>p</i> OMEGOαLFucOH) ₃	5,10,15-tri{ <i>para</i> -O-(2-(2-O-α-L-fucosyloxy)-éthoxy)-phényl}-20-phénylporphyrine
TPP(<i>p</i> OMEGOαDFucOH) ₃	5,10,15-tri{ <i>para</i> -O-(2-(2-O-α-D-fucosyloxy)-éthoxy)-phényl}-20-phénylporphyrine
TPP(<i>p</i> OMEGOαManOH) ₃	5,10,15-tri{ <i>para</i> -O-(2-(2-O-α-D-mannosyloxy)-éthoxy)-phényl}-20-phénylporphyrine
TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	5,10,15-tri{ <i>para</i> -O-[(2-(2-O-α-D-mannosyloxy)-éthoxy)-éthoxy]-phényl}-20-phénylporphyrine
TPP(<i>p</i> ODEGOβGalOH) ₃	5,10,15-tri{ <i>para</i> -O-[(2-(2-O-β-D-galactosyloxy)-éthoxy)-éthoxy]-phényl}-20-phénylporphyrine
TPP(<i>p</i> ODEGOβGluOH) ₃	5,10,15-tri{ <i>para</i> -O-[(2-(2-O-β-D-glucosyloxy)-éthoxy)-éthoxy]-phényl}-20-phénylporphyrine
TPP(<i>p</i> O(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	5,10,15-tri{ <i>para</i> -O-(2-(2-O-α-D-mannosyloxy)-propoxy)-phényl}-20-phénylporphyrine
TPP[<i>p</i> - <i>dendr</i> (DEGOH) ₃]	TPP[<i>p</i> -CO-NH-CH ₂ -CO-NH-C(CH ₂ CH ₂ -CO-NH-CH ₂ CH ₂ -O-CH ₂ CH ₂ -OH) ₃]

TPP[<i>p-dendr</i> (DEGO α ManOH) ₃]	TPP[<i>p</i> -CO-NH-CH ₂ -CO-NH-C(CH ₂ CH ₂ -CO-NH-CH ₂ CH ₂ -O-CH ₂ CH ₂ -O- α -ManOH) ₃]
TPP[<i>p-dendr</i> (MEGO α ManOH) ₃]	TPP[<i>p</i> -CO-NH-CH ₂ -CO-NH-C(CH ₂ CH ₂ -CO-NH-CH ₂ CH ₂ -O- α -ManOH) ₃]
TMPP	5,10,15,20-tétra-(<i>para</i> -méthylpyridyl)porphyrine
TPPP	TPP tétraphosphonée
TPPS1	5-(<i>para</i> -sulfonatophényl)-10,15,20-triphénylporphyrine
TPPS2a	5,10-di-(<i>para</i> -sulfonatophényl)-15,20-diphénylporphyrine
TPPS2o	5,15-di-(<i>para</i> -sulfonatophényl)-10,20-diphénylporphyrine
TPPS4	5,10,15,20-tétra-(<i>para</i> -sulfonatophényl)porphyrine
BPD-MA	<i>Benzoporphyrin Derivative – Mono Acid</i>
H _p D	Photosensibilisateur dérivé de l'hématoporphyrine (<i>Hematoporphyrin Derivative</i>)
mTHPC	5,10,15,20-tétra-(<i>méta</i> -hydroxyphényl)chlorine
H ₄ TPP ²⁺	TPP (substituée ou non) dont les quatre azotes tétrapyrroliques portent un hydrogène
H ₃ TPP ⁺	TPP (substituée ou non) dont trois azotes tétrapyrroliques portent un hydrogène
H ₂ TPP	TPP (substituée ou non) dont deux azotes tétrapyrroliques portent un hydrogène
Φ_f	Rendement de fluorescence
pK ₁ ; pK ₂	Constantes de protonation des azotes tétrapyrroliques
pK _{OH1} ; pK _{OH2} ; ...	Constantes de déprotonation des hydroxyles phénoliques
K _a	Constante d'association
ASA	Surface accessible au solvant (<i>Solvent Accessible Surface Area</i>)
ASA_H	ASA des atomes dont la valeur absolue de la charge partielle est inférieure ou égale à 0,125
ASA_P	ASA des atomes dont la charge partielle est strictement supérieure à 0,125 en valeur absolue

>>>

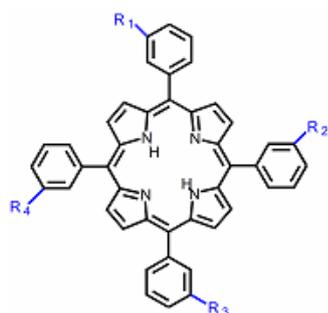
Introduction

Introduction

>>>

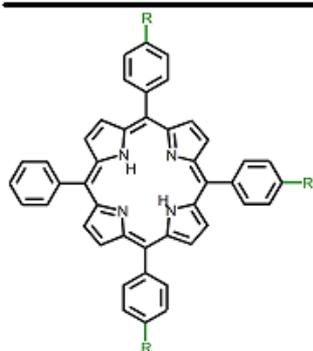
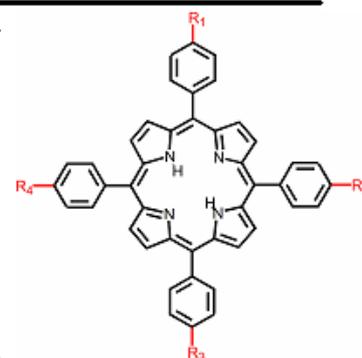
La photothérapie dynamique (PDT), notamment utilisée en oncologie, consiste en la destruction d'un tissu cible par l'association de l'administration d'un photosensibilisateur et de l'exposition à un rayonnement non-ionisant. La photoactivation du photosensibilisateur est à l'origine d'une cascade de réactions impliquant espèces radicalaires et oxygène singulet, aboutissant à la destruction des structures cellulaires (1). Ce mode d'action fait de la PDT une technique de choix pour le traitement des tumeurs superficielles. Elle a donc été envisagée comme mode de traitement du rétinoblastome, tumeur maligne oculaire la plus fréquente chez l'enfant, pour pallier les lacunes des thérapeutiques existantes pour cette pathologie. L'inefficacité des photosensibilisateurs actuellement disponibles dans cette indication a conduit au développement de nouvelles molécules au sein de l'Institut Curie, centre de référence en France pour le rétinoblastome.

Les photosensibilisateurs développés en vue d'un traitement du rétinoblastome comportent un noyau tétraphénylporphyrine (TPP) sur lequel sont greffés des résidus sucre (Tableau 1). Le noyau TPP confère à ces molécules les propriétés photophysiques requises pour en faire de bons agents photosensibilisants, notamment une absorption dans le rouge et de hauts rendements de passage à l'état triplet et de formation d'oxygène singulet. La stratégie de glycoconjugaison répond à un double objectif : d'une part, favoriser un ciblage tumoral par des interactions spécifiques entre le sucre du photosensibilisateur et les récepteurs de type lectine surexprimés par certaines cellules tumorales et d'autre part, conférer au photosensibilisateur un caractère amphiphile améliorant sa solubilité en milieu biologique.



Série méta	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
TPP(<i>m</i> OH) ₃	-OH	-OH	-OH	-H
TPP(<i>m</i> OH) ₄	-OH	-OH	-OH	-OH
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₁	-OβGluOH	-H	-H	-H
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-10	-OβGluOH	-OβGluOH	-H	-H
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-15	-OβGluOH	-H	-OβGluOH	-H
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH	-H
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH

Série para	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
TPP(<i>p</i> OH) ₃	-OH	-OH	-OH	-H
TPP(<i>p</i> OH) ₄	-OH	-OH	-OH	-OH
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₁	-OβGluOH	-H	-H	-H
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-10	-OβGluOH	-OβGluOH	-H	-H
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-15	-OβGluOH	-H	-OβGluOH	-H
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	-OβGalOH	-OβGalOH	-OβGalOH	-H
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₄	-OβGalOH	-OβGalOH	-OβGalOH	-OβGalOH
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH	-OβGluOH



Série para	R
TPP(<i>p</i> OMEGOαLFucOH) ₃	-O-CH ₂ -CH ₂ -O-αLFucOH
TPP(<i>p</i> OMEGOαDFucOH) ₃	-O-CH ₂ -CH ₂ -O-αDFucOH
TPP(<i>p</i> OMEGOαManOH) ₃	-O-CH ₂ -CH ₂ -O-αManOH
TPP(<i>p</i> ODEGOβGalOH) ₃	-O-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-βGalOH
TPP(<i>p</i> ODEGOβGluOH) ₃	-O-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-βGluOH
TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	-O-CH ₂ -CH ₂ -O-CH ₂ -CH ₂ -O-αManOH
TPP(<i>p</i> O(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	-O-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -O-αManOH

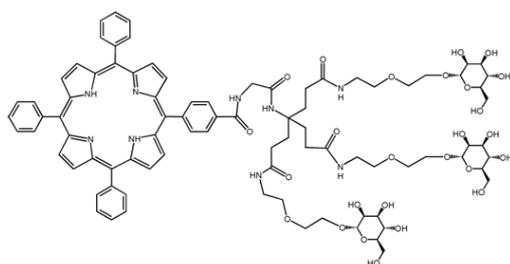
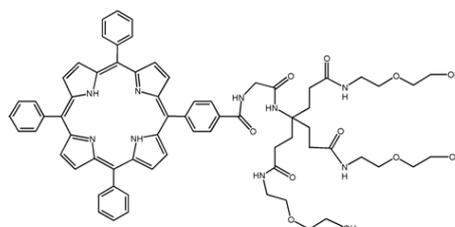
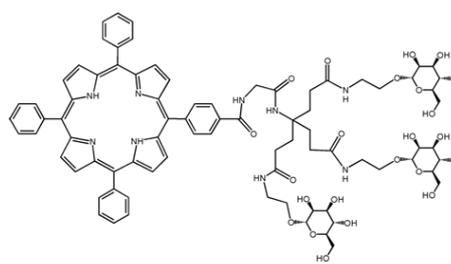
TPP[*p*-dendr(DEGOαManOH)₃]TPP[*p*-dendr(MEGOαManOH)₃]TPP[*p*-dendr(DEGOH)₃]

Tableau 1 - Structures des tétraphénylporphyrines étudiées

Introduction

Les études de photocytotoxicité *in vitro* ont montré l'intérêt de cette stratégie. Au fil des années, différents modes de glycoconjugaison ont été envisagés pour améliorer l'efficacité *in vitro* des dérivés synthétisés. Après les premières générations de photosensibilisateurs, composés portant de un à quatre sucres sur les positions *mé*ta ou *para* des phényles, de nouvelles structures ont été envisagées afin d'optimiser les interactions avec les récepteurs membranaires : ces composés sont des dérivés avec trois sucres en position *para*, un espaceur flexible, de type éthylène glycol, étant inséré entre chaque sucre et le phényle. Parmi ces dernières structures, la TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃, particulièrement efficace *in vitro*, a été sélectionnée pour une évaluation *in vivo*. Le potentiel de ces structures a conduit à envisager la synthèse de structures dendrimériques, dont la proximité spatiale des sucres doit permettre d'optimiser les interactions avec les récepteurs membranaires. Cependant, établir un lien entre la structure d'un dérivé et sa photocytotoxicité reste une gageure. En l'absence de différences photophysiques majeures, des modifications d'internalisation et de localisation subcellulaire pourraient expliquer les différences de photocytotoxicité. En effet, cette propriété est d'autant plus importante que l'effet du traitement est limité au voisinage du photosensibilisateur lors de sa photoactivation. Ainsi, une localisation mitochondriale favoriserait l'apoptose tandis que la présence du photosensibilisateur au niveau des membranes favoriserait les processus nécrotiques.

Si la photocytotoxicité *in vitro* reste le critère de sélection *princeps* avant d'envisager une mise en œuvre *in vivo*, les résultats obtenus *in vitro* ne sont pas toujours prédictifs de l'efficacité *in vivo*. En effet, il ne faut pas occulter l'importance de facteurs extracellulaires, comme l'ont souligné Bohmer et Morstyn (2). Ainsi, un photosensibilisateur dérivé de l'hématoporphyrine ne présente pas de différence d'accumulation *in vitro* entre cellules malignes (cellules de carcinome urothélial) et cellules saines (cellules urothéliales bénignes). Pourtant, cette différence existe *in vivo* (2). La sélectivité doit donc aussi dépendre de propriétés extracellulaires. L'un des facteurs couramment évoqués pour expliquer ces différences est la distribution du photosensibilisateur entre les lipoprotéines et protéines plasmatiques. Par exemple, Jori *et al.* ont montré qu'il existait une corrélation entre liaison aux lipoprotéines de basse densité (LDL) dans le plasma et sélectivité.

Le travail présenté ici ne porte pas uniquement sur la TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃, composé actuellement testé *in vivo*, mais sur un ensemble de TPP glycoconjuguées. Après une synthèse bibliographique sur la stratégie de glycoconjugaison en PDT, nous présenterons une analyse physico-chimique (ionisation, lipophilie) de ces dérivés TPP, puis une étude de leur distribution plasmatique et de leur localisation subcellulaire. L'objectif de ce travail est d'évaluer les possibles implications de la physico-chimie d'un photosensibilisateur sur ces deux propriétés essentielles pour son devenir *in vivo*.

>>>

Synthèse bibliographique

Photosensibilisateurs glycoconjugués
en Photothérapie Dynamique

>>>

La stratégie de glycoconjugaison du photosensibilisateur est envisagée, au sein de l'Institut Curie, dans l'optique d'un traitement par PDT du rétinoblastome. Le rétinoblastome est un

cancer de la rétine concernant le jeune enfant. Bien que ce soit la tumeur maligne intra-oculaire la plus fréquente chez l'enfant, cette maladie reste relativement méconnue en raison de sa rareté (son incidence est de l'ordre de 1 naissance sur 15 000). Les deux symptômes majeurs, la leucocorie et le strabisme, sont trop souvent insuffisamment pris en considération. Ceci tend à ralentir l'établissement du diagnostic de rétinoblastome. La précocité du diagnostic est un élément essentiel puisqu'il va conditionner la prise en charge de la pathologie, un diagnostic trop tardif empêchant la mise en place de traitements conservateurs. Le choix de la stratégie thérapeutique dépend également de l'existence d'une prédisposition génétique. En l'absence de prédisposition génétique, l'énucléation est encore aujourd'hui l'issue la plus fréquente, puisqu'elle concerne 80 % des cas de forme unilatérale. Celle-ci peut s'accompagner de traitements adjuvants (chimiothérapie post-opératoire et irradiation orbitaire) avec leur cortège d'effets secondaires à court ou long terme.

Différents traitements conservateurs existent : cryothérapie ou curiethérapie interstitielle, traitement par laser (seul ou associé à une administration de carboplatine) ou irradiation externe. Ces deux derniers, ultimes recours dans les formes étendues, présentent de nombreux effets secondaires, notamment l'augmentation du risque de cancers secondaires à long terme. Ils sont mis en œuvre dans les formes bilatérales (dans deux tiers des cas, le traitement conservateur ne concerne qu'un œil) et dans 20 % des cas de formes unilatérales. Ce traitement initial s'accompagne d'une prise en charge multidisciplinaire à plus long terme (3). Dans la moitié des cas de rétinoblastome, il existe une mutation du gène Rb1 qui prédispose aux cancers, et notamment aux cancers secondaires à long terme. Les limites actuelles de la prise en charge du rétinoblastome ont conduit à la recherche de nouvelles thérapeutiques non mutagènes au sein de

l'Institut Curie. Parmi ces possibilités, l'une des plus prometteuses est la PDT, qui a déjà fait ses preuves pour le traitement de tumeurs superficielles, que ce soit au niveau cutané ou dans des localisations facilement accessibles par endoscopie. Actuellement, un seul photosensibilisateur est commercialisé avec comme indication une pathologie oculaire. Il s'agit de la Visudyne® utilisée dans le traitement d'une pathologie non oncologique, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (4).

L'avantage de la PDT par rapport aux traitements conventionnels par chimiothérapie est double. Le premier aspect est que le photosensibilisateur est un principe actif non mutagène, ce qui évite le risque de développement de cancers secondaires au traitement. Le second réside dans la double spécificité de la PDT, spécificité d'origine à la fois physique (le traitement est restreint aux zones exposées à la source lumineuse) et chimique (seuls les tissus où le photosensibilisateur s'accumule sont affectés par le traitement). La PDT doit permettre de concilier cytotoxicité vis-à-vis du tissu tumoral et préservation du tissu sain (5). Un tel traitement trouverait donc une place de choix parmi les traitements conservateurs actuellement disponibles. Malheureusement, les essais de traitement de tumeurs de rétinoblastome avec un dérivé d'hématoporphyrine, le Photofrin® (photosensibilisateur de première génération), n'ont pas été concluants, l'accumulation du photosensibilisateur dans les tissus sains conduisant à une photosensibilisation générale prolongée et à des effets secondaires importants chez le jeune enfant (6). Dans l'optique d'un traitement PDT du rétinoblastome, la synthèse d'un nouveau photosensibilisateur combinant efficacité et spécificité s'est donc avérée nécessaire. Après une rapide présentation de la PDT, centrée notamment sur son mécanisme d'action, nous développerons le rationnel de la stratégie de glycoconjugaison puis nous aborderons la problématique de la transposition des résultats obtenus *in vitro* à l'échelle de l'organisme.

1 > Photothérapie Dynamique

1.1 > Aperçu historique

Les premières applications médicales de la lumière, et donc les débuts de la photothérapie, datent de plusieurs milliers d'années : dès l'Antiquité, en Egypte, en Inde ou en Chine, la lumière était utilisée pour traiter les maladies de peau (psoriasis, vitiligo,...), les cancers ou les psychoses (7). Les Grecs exploitèrent également le potentiel thérapeutique de la lumière, potentiel souligné par des personnalités aussi illustres que Hérodote, Hippocrate, Galien ou Celse. Cette utilisation empirique précoce de la photothérapie n'a trouvé sa justification théorique que très tardivement, à l'orée du vingtième siècle avec les travaux du médecin danois Niels Finzen. Ces

1 > Photothérapie Dynamique

travaux lui valurent un prix Nobel de médecine décerné en 1903.

Si les origines de la photothérapie sont anciennes, la PDT, elle, naît avec le vingtième siècle. En 1900, Raab observa que la destruction de paramécies par un colorant, l'acridine, dépend de l'intensité lumineuse (8). Deux ans plus tard, Ledoux-Lebardis compléta cette observation en soulignant la nécessité de la présence d'oxygène. La triade à la base de la PDT – molécule sensibilisante (en l'occurrence un colorant), lumière et oxygène – était connue ; le terme « effet photodynamique » fut introduit en 1904 par Tappeiner et Jodlbauer pour désigner les réactions photosensibilisées en présence d'oxygène dans les milieux biologiques. L'absence de base théorique solide n'avait pas empêché Tappeiner de réaliser, dès 1903, une première application thérapeutique (traitement de cancers cutanés en utilisant l'éosine comme agent photosensibilisant). En 1911, Hausman décrivit des effets similaires obtenus avec un autre photosensibilisateur, l'hématoporphyrine. Pour la première fois, l'histoire des porphyrines rejoignait celle de la PDT, elle ne la quitterait plus jusqu'à nos jours. Parallèlement à ces études, Meyer-Betz réalisa, en 1913, la première administration intraveineuse d'hématoporphyrine chez l'Homme. Douze ans plus tard, Policard décrivit l'accumulation préférentielle des porphyrines au niveau des tumeurs (8).

Ainsi, la photocytotoxicité des porphyrines et leur affinité particulière pour le tissu tumoral étaient connues respectivement dès 1911 et 1925. Mais il faudra attendre la publication des travaux de Diamond dans le journal *The Lancet* en 1972, soit presque un demi-siècle après les travaux de Policard, pour qu'émerge l'idée de les associer dans l'optique d'un traitement anticancéreux. Auparavant, les recherches sur les applications de l'hématoporphyrine privilégiaient surtout son intérêt diagnostique à son potentiel thérapeutique. Ces recherches avaient notamment permis de démontrer que l'hématoporphyrine est un mélange de porphyrines présentant des propriétés différentes (Schwartz, 1955). Cette observation fut complétée par d'autres travaux, aboutissant à la sélection d'un dérivé de l'hématoporphyrine baptisé HpD (*Hematoporphyrin Derivative*) (7). En 1975, Dougherty *et al.* décrivent la première application de l'HpD pour un traitement PDT chez la souris, avant d'identifier le rôle central de l'oxygène singulet dans la photocytotoxicité (9).

En 1976, Kelly et Snell réalisèrent la première étude de l'efficacité de la PDT avec l'HpD chez l'Homme dans le cas de cancers de la vessie. Les applications de la PDT se diversifièrent rapidement : carcinomes, mélanomes, cancers bronchiques ou cancers de l'œsophage. L'HpD, sous le nom de marque de Photofrin[®], obtint une autorisation de mise sur le marché en 1996 en France dans ces deux dernières indications (traitement des rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules ou du cancer de l'oesophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional

antérieur), trois ans après sa première autorisation de commercialisation au Canada (7).

Depuis, de nouveaux composés, les photosensibilisateurs dits de seconde et troisième génération, ont été synthétisés sous une forme pure pour améliorer l'efficacité du photosensibilisateur par rapport à celle du Photofrin[®], diminuer sa toxicité ou étendre les indications à d'autres pathologies (10). Parmi ces molécules, on retrouve, outre des benzoporphyrines comme la vertéporfine (Visudyne[®]), des chlorines (témoporphine, Foscan[®]), des colorants (phtalocyanine, Photosens[®]) des texaphyrines (lutexaphyrine, Antrin[®]) mais aussi des précurseurs de porphyrines (acide 5-aminolévulinique, Levulan[®]) (11).

La PDT se révèle être un traitement de choix pour les tumeurs peu profondes, facilement accessibles à la lumière telles que celles du tractus gastro-intestinal (12). Elle pourrait aussi permettre le traitement de tumeurs résistantes aux traitements conventionnels (13-15). Si les premières applications historiques de la PDT se sont cantonnées à l'oncologie, le champ d'investigation s'est depuis élargi, englobant des pathologies aussi diverses que la dégénérescence maculaire liée à l'âge, l'arthrite ou l'acné (10). Des investigations sont également menées pour exploiter le potentiel bactéricide, virucide et antiparasitaire de la PDT ; l'une des applications les plus étudiées est la stérilisation du sang et des produits sanguins labiles (16). Mais, quelle que soit l'application thérapeutique envisagée, l'efficacité du traitement repose sur un même mécanisme, l'effet photodynamique.

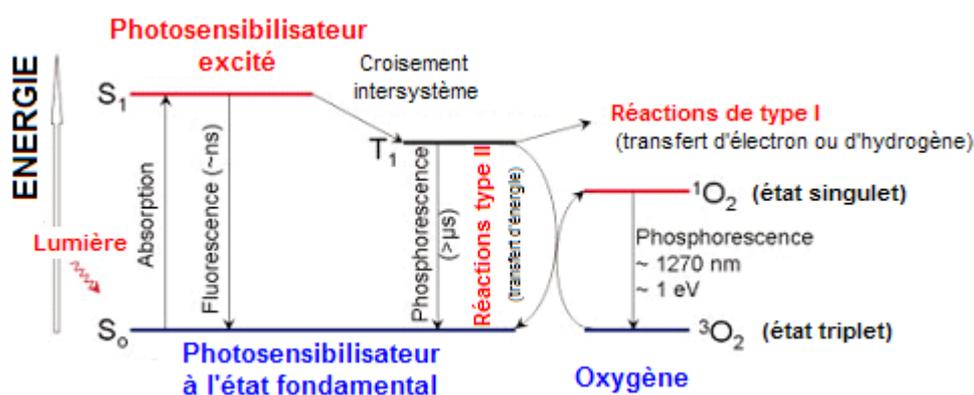


Figure 1 - L'effet photodynamique

Repris de Agostinis *et al.* (doi:10.3322/caac.20114)

1.2 > Effet photodynamique

Après administration (par voie intra-veineuse, par exemple), le photosensibilisateur s'accumule au niveau du tissu cible, où l'exposition à la lumière va permettre l'initiation de l'effet

1 > Photothérapie Dynamique

photodynamique. Cet effet peut se décomposer en plusieurs phases (Figure 1) (17). D'abord, le photosensibilisateur, par absorption d'une lumière visible, passe de son état fondamental S_0 à un état excité singulet de courte durée de vie S_1 . Après passage à l'état triplet (T_1), il va pouvoir transférer son énergie à l'oxygène moléculaire, pour former des espèces réactives de l'oxygène. Ces espèces réactives ou le photosensibilisateur à l'état excité peuvent interagir avec les molécules biologiques, conduisant *in fine* à la destruction du tissu tumoral.

1.2.1 > Processus photophysiques

1.2.1.1 > *Absorption de la lumière*

Aux doses habituelles en PDT, le photosensibilisateur est une molécule non toxique en l'absence de lumière. Celle-ci est nécessaire pour initier l'effet photodynamique en faisant passer le photosensibilisateur de son état fondamental S_0 à son état excité S_1 . La longueur d'onde de la lumière excitatrice doit être choisie avec soin puisqu'il ne suffit pas que le photosensibilisateur absorbe à la longueur d'onde de la lumière excitatrice pour obtenir l'état excité S_1 . La présence *in vivo* de molécules (comme l'hémoglobine, la myoglobine ou les cytochromes) pouvant absorber la lumière, molécules baptisées chromophores endogènes, restreint considérablement l'intervalle utile de longueurs d'onde (18). Un domaine spectral, pour lequel l'absorbance des tissus est minimale, a donc pu être définie. Cette zone, baptisée fenêtre optique, s'étend environ de 600 à 1300 nm (19). L'absorbance des tissus dans cette zone n'est cependant pas nulle, ce qui explique que la pénétration de 5 mm obtenue à une longueur d'onde de 630 nm peut être augmentée en passant à une longueur d'onde de 700 voire de 800 nm (profondeur de l'ordre de 1 à 2 cm) (Figure 2) (20; 21).

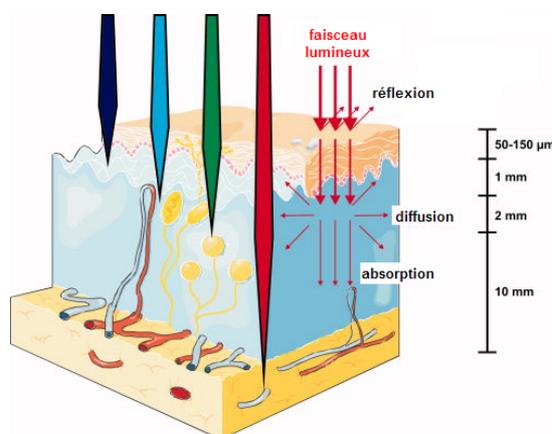


Figure 2 - Propagation de la lumière à travers les tissus

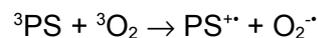
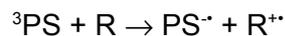
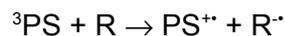
Repris de Agostinis *et al.* (doi:10.3322/caac.20114)

1.2.1.2 > Formation des espèces réactives

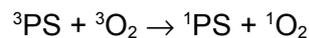
La durée de vie sous la forme excitée S_1 est brève, inférieure à 100 ns : soit la molécule revient à son état fondamental (relaxation $S_1 \rightarrow S_0$) en émettant un photon (dit de fluorescence), soit la molécule subit un croisement intersystème (relaxation $S_1 \rightarrow T_1$) pour atteindre l'état triplet. C'est sous cet état, dont la durée de vie est plus longue (de l'ordre de 500 ns), que la molécule interagit avec les molécules de son environnement. En l'absence de telles interactions, la molécule peut retourner à l'état fondamental (relaxation $T_1 \rightarrow S_0$) en émettant un photon (dit de phosphorescence).

Les interactions entre le photosensibilisateur à l'état triplet T_1 et son environnement sont de deux types :

- un transfert d'électron : cette réaction, dite de type I, est une réaction directe entre le photosensibilisateur à l'état triplet (3PS) et les molécules voisines acceptrices (R ou 3O_2) pour former des radicaux (R^\cdot , $R^{+\cdot}$, $O_2^{\cdot-}$,...).



- un transfert d'énergie : cette réaction correspond au type II. Elle implique, en plus du photosensibilisateur à l'état triplet (3PS), l'oxygène moléculaire (lui-même à l'état triplet dans son état fondamental) (3O_2) et conduit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, par l'intermédiaire de l'oxygène singulet (1O_2) (22).



1.2.2 > Mécanismes de mort cellulaire

Quelque soit le type de réaction à l'œuvre, les distances de diffusion des espèces réactives (oxygène singulet, radical hydroxyle,...) sont du même ordre, quelques dizaines de nanomètres (23). Etant donné le diamètre moyen des cellules humaines (10 à 100 μm), l'effet du traitement se trouve donc limité aux molécules voisines du photosensibilisateur lors de sa photoactivation que ce soient des acides aminés (principalement les résidus cystéine, histidine, méthionine, tryptophane et tyrosine), des acides nucléiques (notamment les sites contenant des résidus thymine ou uracile), des lipides (oxydation des acides gras insaturés et du cholestérol)... (24) Ces molécules cibles peuvent appartenir à différentes structures subcellulaires en fonction de la localisation du photosensibilisateur : membranes cellulaires, appareil de Golgi, réticulum

1 > Photothérapie Dynamique

endoplasmique, mitochondries ou lysosomes. La destruction de ces organites ou la perturbation de leur fonctionnement conduit à la mort cellulaire. Celle-ci peut résulter d'une nécrose (majoritaire lorsque le photosensibilisateur détruit les membranes cellulaires) ou de processus apoptotiques (initiés le plus souvent par une perturbation du fonctionnement mitochondrial) (25; 26). Ainsi, si les processus photophysiques restent localisés, le relais par des processus biologiques va permettre d'aboutir à la mort cellulaire.

2 > Glycoconjugaison des photosensibilisateurs

La plupart des photosensibilisateurs actuellement utilisés en PDT partagent une même structure, le noyau porphyrine. Ce macrocycle tétrapyrrolique, proche de l'hème, présente l'intérêt de remplir les principales conditions photophysiques requises dans l'optique d'une utilisation comme agent photosensibilisant : absorption dans le rouge, rendements élevés de passage à l'état triplet et de formation d'oxygène singulet... (8) Pour améliorer les propriétés du photosensibilisateur, en termes de pharmacocinétique et de spécificité, une stratégie de glycoconjugaison du noyau porphyrine a été développée au sein de l'Unité UMR 176 CNRS de l'Institut Curie. Cette glycoconjugaison, qui peut revêtir des aspects multiples (aboutissant à un ensemble de composés présentés sur le tableau 1 page 24), présente un double intérêt.

2.1 > De l'intérêt des photosensibilisateurs glycoconjugués

2.1.1 > **Glycoconjugaison & ciblage des lectines**

De nombreuses voies d'internalisation des photosensibilisateurs dans les cellules tumorales ont été décrites : diffusion passive (cas des dérivés de l'hématoporphyrine, de l'hydroxyéthyldeutéroporphyrine, de la BPD-MA (*Benzoporphyrin Derivative – Mono Acid*), de phthalocyanines zinc), endocytose non-spécifique (cas de dérivés de chlorines – N-monoaspartyl chlorure e6 et lysyl chlorure p6 – ou de phthalocyanines aluminium sulfonées), pinocytose ou phagocytose (dans le cas d'agrégats de diesters d'hématoporphyrine) (27). Tous ces mécanismes d'internalisation se caractérisent par leur non-spécificité. A l'inverse, la stratégie de glycoconjugaison doit favoriser une internalisation plus spécifique du photosensibilisateur par les cellules tumorales. En effet, il a été décrit une surexpression de récepteurs aux sucres, récepteurs de la famille des lectines, à la surface de certaines cellules dont celles de rétinoblastome (28). La fixation de groupes sucre sur un noyau tétraphénylporphyrine doit donc permettre de favoriser l'accumulation de photosensibilisateur au niveau des cellules tumorales et de limiter *in fine* la

toxicité vis-à-vis du tissu sain lors d'un traitement *in vivo* (29).

Les récepteurs de type lectine, présents à la surface de certaines cellules cancéreuses, sont spécifiques d'un sucre. Ainsi, les cellules de rétinoblastome présentent des récepteurs au mannose et au galactose. Ces deux sucres sont donc particulièrement intéressants à envisager, même si d'autres sucres (glucose ou fucose, par exemple) ont été évalués. Dans l'optique d'une interaction optimale du photosensibilisateur avec le récepteur membranaire, l'insertion d'un espaceur flexible revêt un intérêt tout particulier. La première option envisagée fut d'insérer un espaceur de type éthylène-glycol entre le phényle et le sucre, aboutissant à des dérivés comme la TPP(*p*ODEGOαManOH)₃. Une autre possibilité est de fixer les sucres à proximité les uns des autres sur une même chaîne espaceur, avec pour but de former des *clusters* favorisant des interactions plus fortes avec le récepteur membranaire (Figure 3).

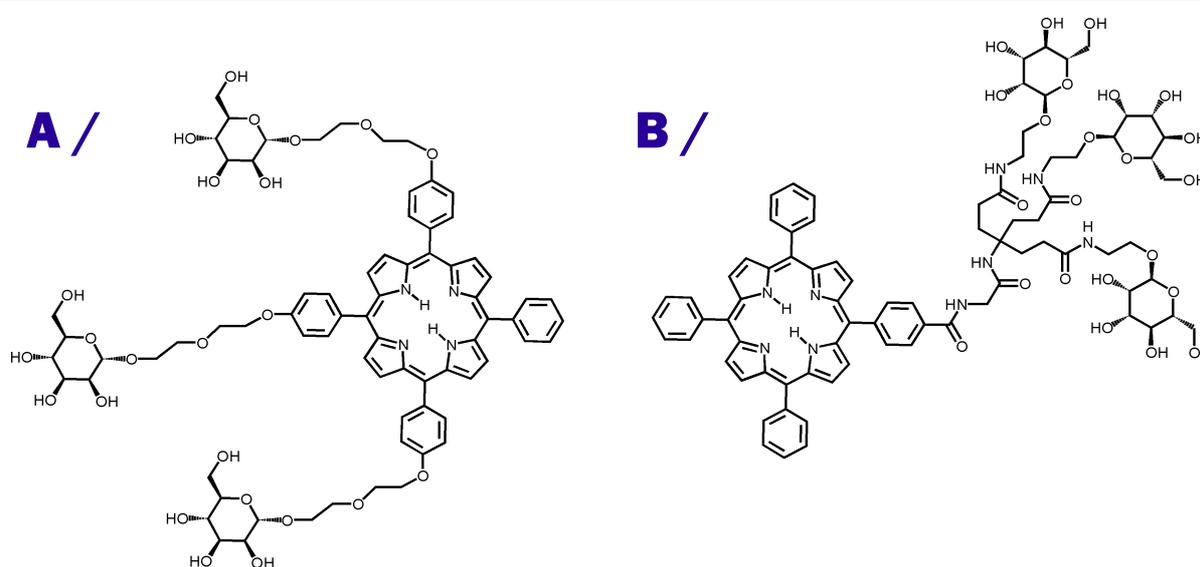


Figure 3 - Insertion d'un espaceur flexible : deux stratégies envisagées

A / TPP(*p*ODEGOαManOH)₃ ; B / TPP[*p*-dendr(MEGOαManOH)₃]

2.1.2 > Amélioration de la solubilité en milieu aqueux

Le noyau TPP est une structure peu soluble dans l'eau et les milieux biologiques, ce qui risque d'affecter l'issue du traitement. Cette faible solubilité induit la formation d'agrégats de porphyrines dont le rendement de formation d'oxygène singulet est inférieur à celui des monomères (10). La faible solubilité de la TPP résulte de la difficulté d'interagir avec les molécules de solvant, conséquence de la forte hydrophobie de ce noyau. La fixation de groupements sucre polaires permet de favoriser les interactions polaires entre le photosensibilisateur et le solvant.

La nature du sucre est susceptible d'avoir un impact, comme l'ont montré Hirohara *et*

2 > Glycoconjugaison des photosensibilisateurs

al. sur une série de chlorines tétraglycoconjuguées en *méta* : les dérivés portant des sucres glucose ou galactose sont plus solubles que ceux portant des xyloses ou des arabinoses (30). Cependant, une trop forte hydrophilie risque d'affecter la capacité du photosensibilisateur à interagir avec la bicouche phospholipidique des membranes cellulaires, réduisant ainsi potentiellement son internalisation par la cellule tumorale. La glycoconjugaison doit donc répondre à un compromis entre solubilité et interactions avec les membranes (10). Répondre à ce double impératif nécessite de tester différents sucres, plusieurs degrés de glycoconjugaison, différentes positions...

2.2 > Evaluation *in vitro*

2.2.1 > Internalisation & photocytotoxicité

Les études d'internalisation réalisées sur la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃ et des structures apparentées (autre sucre ou autre espaceur) ont montré une internalisation plus élevée pour les dérivés glycoconjugués que pour la TPP(ρ ODEGOH)₃, composé de référence portant des espaceurs sans résidu sucre. Cette internalisation est glucose-dépendante, indice de l'existence d'un mécanisme actif nécessitant de l'énergie et impliquant un transporteur. De plus, il a été observé que la présence d'un compétiteur ayant une affinité pour les lectines (albumine glycosylée) provoque une diminution de l'internalisation (31). Ces arguments renforcent l'idée d'une internalisation par la voie des lectines pour les photosensibilisateurs glycoconjugués. La possibilité d'interactions entre les TPP glycoconjuguées et les lectines a été mise en évidence à l'aide de modèles membranaires (32).

La glycoconjugaison présente un intérêt en terme de photocytotoxicité. L'évaluation de celle-ci *in vitro* sur deux lignées cellulaires (HT29 et Y79, respectivement cellules d'adénocarcinome colorectal et de rétinoblastome humain) montre que la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃ et ses analogues présentent globalement une photocytotoxicité accrue par rapport au photosensibilisateur de référence, la *m*THPC. Cette efficacité améliorée s'accompagne d'une diminution de la toxicité en l'absence de lumière (6). Si la glycoconjugaison est susceptible d'améliorer d'une manière générale la photocytotoxicité, augmenter le nombre de substituants sucre n'induit pas forcément une augmentation de photocytotoxicité. Bien au contraire, comme le montre l'exemple de la chlorure tétraglycoconjuguée en *méta*, composé bien moins actif et bien moins internalisé que la chlorure triglycoconjuguée (33). Les résultats de photocytotoxicité obtenus restent difficiles à interpréter, notamment en raison de leur sensibilité aux conditions expérimentales. Ainsi, pour la chlorure triglycoconjuguée en *méta*, il a été décrit une

photocytotoxicité sur cellules HT29 moins bonne que celle de la *m*THPC (6) ou meilleure (33) selon les conditions expérimentales. Parmi celles-ci, le pourcentage de sérum dans le milieu de culture joue un rôle essentiel, son augmentation réduisant le plus souvent l'internalisation du photosensibilisateur (dans des proportions variables selon le photosensibilisateur). Il faut noter que internalisation et photocytotoxicité ne sont pas toujours corrélées, comme cela a été montré par comparaison de la *m*THPC et de son homologue triglycoconjugué (33).

2.2.2 > De l'absence de lien entre internalisation et photocytotoxicité

En l'absence de différences de propriétés photophysiques induites par la substitution, l'absence de corrélation entre la quantité internalisée et la photocytotoxicité est souvent interprétée comme le signe d'une différence de devenir du photosensibilisateur dans la cellule tumorale, et notamment de localisation subcellulaire (34; 35). Le rôle essentiel de celle-ci résulte du faible rayon d'action des espèces réactives, un rayon d'action limité au voisinage immédiat du photosensibilisateur lors de sa photoactivation. Le ciblage des lectines, en orientant la voie d'internalisation du photosensibilisateur vers une endocytose (36), est susceptible de modifier profondément sa localisation subcellulaire. En effet, le lien entre ces deux phénomènes est très étroit. Ainsi, le Photofrin[®], qui pénètre par diffusion passive, s'accumule dans les mitochondries tandis que la N-monoaspartylchlorine e6, suite à son endocytose, se localise au niveau des lysosomes (27). Les études de localisation des photosensibilisateurs glycoconjugués montrent que c'est un processus dynamique, avec par exemple une localisation variable dans le temps pour la TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃. Elles montrent surtout des différences selon la position, le nombre et la nature des groupes sucre. La localisation ne dépend pas seulement de la voie d'internalisation, mais aussi de propriétés intrinsèques au photosensibilisateur, parmi lesquelles la lipophilie et l'asymétrie de la molécule (19).

3 > Le difficile passage de la cellule à l'organisme

Comprendre la distribution dans la cellule d'un photosensibilisateur à partir de sa structure est difficile. A l'échelle d'un organisme, la problématique de distribution est encore plus complexe. En modifiant la lipophilie, la glycoconjugaison affecte une propriété qui gouverne le devenir *in vivo* des photosensibilisateurs. Ainsi, il a été observé, sur une série de porphycènes (isomères de porphyrines), que plus un composé est lipophile, plus il est sélectif de la tumeur. Cette sélectivité, définie comme le rapport des concentrations dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain avoisinant, est de l'ordre de 2-3 pour les molécules les moins lipophiles contre 20 pour

3 > Le difficile passage de la cellule à l'organisme

les molécules les plus lipophiles. Cette augmentation de sélectivité s'accompagne d'une augmentation de la demi-vie plasmatisque (37). Une étude réalisée sur une série de purpurinumides (dérivés de chlorines) montre qu'au-delà de la lipophilie du composé, la sélectivité dépend également de la position et de la longueur de la chaîne latérale (38). Ces différentes observations laissent penser que la glycoconjugaison est susceptible d'interférer au niveau des différentes étapes décrivant le devenir *in vivo* des photosensibilisateurs (39):

1. Après administration intraveineuse, interactions du photosensibilisateur avec les composants plasmatiques et possible formation d'agrégats.
2. Liaison du photosensibilisateur circulant aux parois des vaisseaux sanguins.
3. Pénétration du photosensibilisateur à travers la paroi du vaisseau sanguin.
4. Après extravasation, diffusion dans le parenchyme de l'organe ou de la tumeur, avec, selon l'organe, possibilité de métabolisme.
5. Elimination des tissus (possibilité de retour dans la circulation par drainage lymphatique).
6. Excrétion du photosensibilisateur de l'organisme (le plus souvent par la bile pour les photosensibilisateurs existants, en raison de leur lipophilie).

Une étude de pharmacocinétique chez le rat a permis de comparer une TPP glycoconjuguée, la TPP(mO β GluOH)₃, à la *m*THPC, photosensibilisateur de référence. La principale différence, imputable à la glycoconjugaison, est une élimination plus rapide de l'organisme. Malgré la modification de lipophilie, la voie d'excrétion est la même (voie biliaire pour les deux composés) et les principaux organes où s'accumule le photosensibilisateur sont les mêmes (poumon, foie et rate, trois organes riches en cellules réticulo-endothéliales) (40). Dans cette étude, aucune métabolisation de la TPP glycoconjuguée n'a été détectée, contrairement à ce qui a été décrit *in vitro* pour des composés analogues (41). Un des composés les plus actifs *in vitro*, la TPP(pODEGO α ManOH)₃, a été sélectionné pour une étude *in vivo* chez la souris. Le modèle, développé au sein de l'Institut Curie, consiste en une xénogreffe de tumeur de rétinoblastome au niveau de la peau de la souris. Différents protocoles thérapeutiques ont été testés, certains permettant d'aboutir à une diminution significative de la densité de la masse tumorale. Le suivi par imagerie de résonance magnétique a permis de montrer que la zone affectée par le traitement dépasse la simple zone exposée à la lumière, suggérant l'existence de mécanismes de destruction tissulaire complexes (42).

3.1 > Un mécanisme d'action plus complexe

La photocytotoxicité *in vitro* présentée ci-dessus a été interprétée comme une évaluation de la capacité du photosensibilisateur à détruire directement la cellule tumorale sous l'effet de la lumière. Cette destruction cellulaire directe n'est qu'un des mécanismes d'action mis en jeu *in vivo*, où d'autres phénomènes se combinent : destruction des néo-vaisseaux, effet *bystander*, processus inflammatoires, ... (Figures 4 et 5) (43)

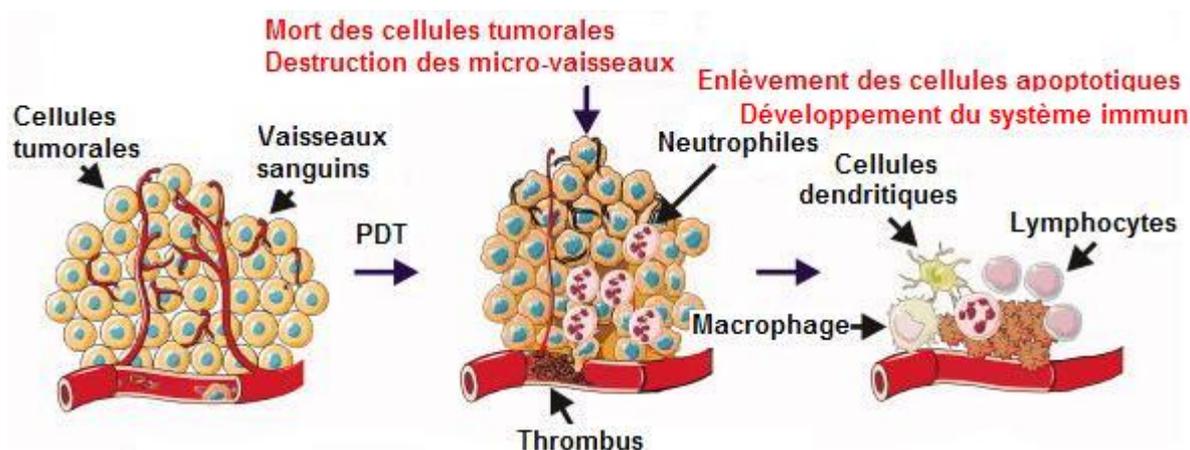


Figure 4 - Un mécanisme d'action plus complexe à l'échelle tissulaire

Repris de Agostinis *et al.* (doi:10.3322/caac.20114)

3.1.1 > Réactions inflammatoires & effet *bystander*

Le stress oxydatif résultant de l'effet PDT est à l'origine d'une forte réaction inflammatoire aiguë, responsable d'un œdème localisé au niveau du site cible. Les premières étapes de cette réaction modifient la vascularisation tumorale, augmentant la perméabilité aux protéines plasmatiques et favorisant l'adhésion des cellules inflammatoires. Ces cellules inflammatoires, neutrophiles dans un premier temps puis mastocytes et monocytes/macrophages, investissent alors le tissu tumoral pour éliminer les débris cellulaires et les cellules affectées par le traitement (21).

Un autre mécanisme impliqué dans la destruction tissulaire met en jeu une communication entre les cellules. Cet effet coopératif, baptisé effet *bystander*, a été suspecté suite à une observation *in vitro* de Moan *et al.* : parmi des colonies exposées à un traitement devant inactiver normalement la moitié des cellules présentes, il y avait un grand nombre de colonies présentant soit une inactivation totale, soit une absence d'effet. Des études ultérieures ont confirmé cet effet, soulignant notamment le rôle de la densité cellulaire de la colonie sur le mécanisme de mort cellulaire (44-46). Le mécanisme exact reste cependant mal connu, la mise en

3 > Le difficile passage de la cellule à l'organisme

jeu des jonctions communicantes intercellulaires étant discutée (47).

3.1.2 > L'effet vasculaire

Dès 1985, Henderson *et al.* se sont intéressés aux différences d'efficacité PDT *in vitro* et *in vivo*. Leurs expériences, menées avec le Photofrin II®, ont montré l'importance d'effets retardés dans les processus de destruction tumorale. La cinétique observée était compatible avec celle d'une tumeur privée d'oxygène (48). Ces expériences pionnières ont conduit à réenvisager de manière totalement différente l'effet PDT (49) et ont abouti à développer des applications de la PDT centrées sur la destruction des vaisseaux sanguins.

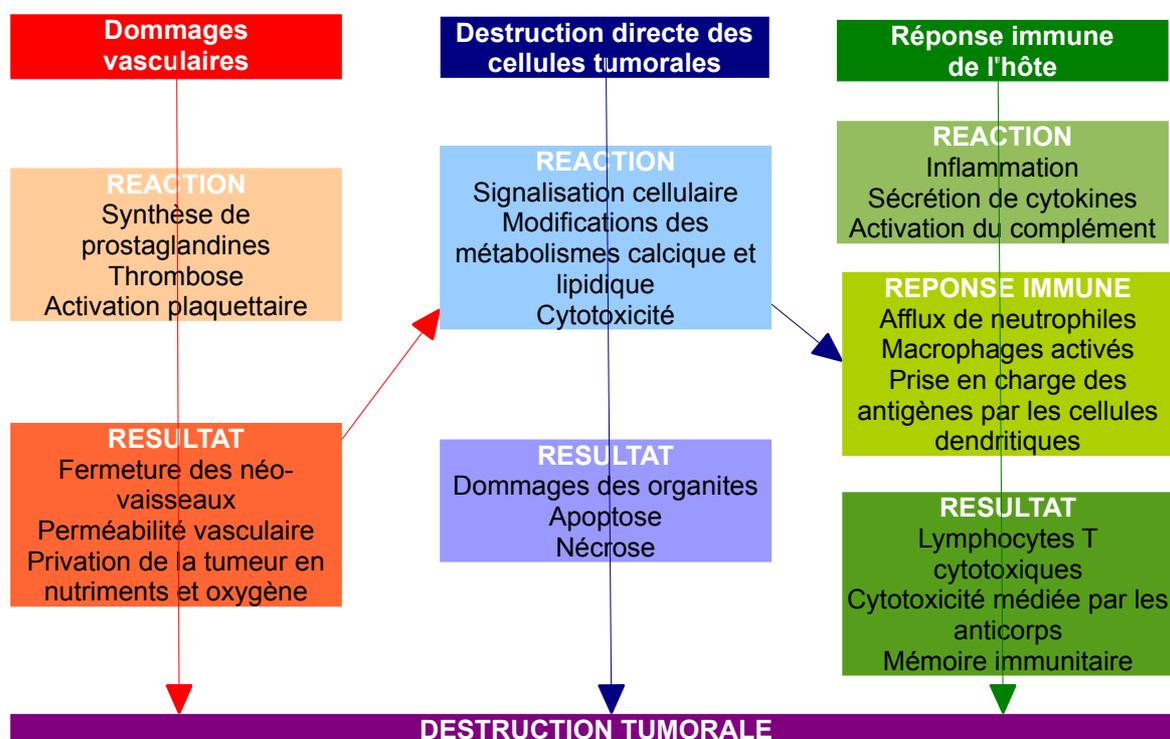


Figure 5 - Mécanismes de destruction tissulaire

Repris de Robertson *et al.* (doi : 10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001)

La mise en évidence de l'effet vasculaire a été possible grâce à la cinétique plus lente de ces phénomènes par rapport à la destruction cellulaire directe. Mais, lors d'un traitement PDT, les premiers effets aigus sont également de nature vasculaire. Quelques secondes après l'exposition à la lumière, il se produit une agrégation plaquettaire, suivie d'une vasoconstriction transitoire puis d'une vasodilatation et finalement d'une stase sanguine complète ou d'une hémorragie. Tous ces signes précèdent la destruction des cellules tumorales et endothéliales et aboutissent à une occlusion des vaisseaux, indirectement responsable de la destruction des

cellules tumorales par ischémie. Si les délais avant l'occlusion varient suivant la tumeur et le photosensibilisateur considérés, l'occlusion semble être un phénomène général en PDT (50). En effet, les résultats des protocoles cliniques et précliniques suggèrent une interaction particulière entre la plupart des photosensibilisateurs et la néo-vascularisation tumorale (51).

3.1.3 > Implications sur le protocole de traitement

L'ischémie (bénéfique pour le traitement) résultant de l'effet vasculaire est précédée d'une phase d'hypoxie, lorsque l'afflux sanguin est perturbé. Cette perturbation, rapide après l'illumination, est potentiellement préjudiciable pour l'issue du traitement. En effet, l'oxygène est nécessaire pour la formation d'oxygène singulet, maillon central de la séquence des événements lors d'un traitement PDT. Ce risque de moindre efficacité par hypoxie a conduit à envisager d'adapter les protocoles d'illumination, notamment en fractionnant l'illumination par de brèves interruptions permettant le maintien d'un flux sanguin suffisant. Appréhender ces phénomènes reste difficile, notamment car la variabilité est forte d'un individu à l'autre et d'une tumeur à l'autre. Il a ainsi été démontré que, pour certains types de tumeurs (notamment une tumeur oculaire proche du rétinoblastome), le flux sanguin augmente en réponse au traitement PDT tandis qu'il diminue pour d'autres tumeurs (50).

L'hypoxie tumorale au cours de l'illumination est susceptible de diminuer la réponse au traitement, tandis que l'ischémie tumorale est un facteur augmentant l'efficacité du traitement. L'un comme l'autre, ces deux phénomènes perturbent la relation dose – photocytotoxicité observée *in vitro*. Ceci explique que l'efficacité du traitement n'est plus directement corrélée avec la concentration de photosensibilisateur au niveau des cellules tumorales, ce qui a notamment été décrit pour la *mTHPC* chez la souris. Les résultats montrent un écart entre efficacité du traitement et accumulation du photosensibilisateur dans la tumeur. Si cette accumulation est plutôt lente (la concentration intratumorale augmente pendant 48 heures après injection), la réponse optimale est obtenue à des temps beaucoup plus courts après l'injection (dès 3 heures). L'efficacité du traitement présente une meilleure corrélation avec les concentrations plasmatiques. Si on considère ces concentrations comme un reflet de l'exposition des cellules endothéliales au photosensibilisateur, l'effet vasculaire apparaît comme un mécanisme d'action essentiel (52). L'étude des altérations morphologiques des tissus soumis à un traitement par la *mTHPC* a montré cette double atteinte des cellules tumorales et des néo-vaisseaux, résultat concordant avec la localisation du photosensibilisateur au moment du traitement (53).

L'absence de corrélation entre concentration intratumorale et efficacité conduit à s'interroger sur les délais optimaux entre injection du photosensibilisateur et illumination. Il

3 > Le difficile passage de la cellule à l'organisme

apparaît, d'une manière générale, que les délais courts post-injection vont favoriser un effet vasculaire tandis que des délais plus longs vont favoriser la destruction directe des cellules tumorales (51). Ces constatations ont conduit à envisager, en plus du possible fractionnement de la dose de lumière, de fractionner la dose de photosensibilisateur. En pratique, cela consiste en une double-injection de photosensibilisateur, par exemple 3 heures et 15 minutes avant l'illumination, dans le cas d'un modèle *in vivo* de rétinoblastome. Dans de telles conditions, au moment de l'illumination, le photosensibilisateur administré 3 heures auparavant sera en train de s'accumuler au niveau de la tumeur tandis que le photosensibilisateur administré quelques minutes auparavant sera encore dans le compartiment vasculaire. Un protocole de ce type vise à obtenir une combinaison optimale des ciblage cellulaire et vasculaire, ce qui a été constaté avec la vertéporfine (54), mais aussi avec une TPP glycoconjuguée, la TPP(ρ ODEGOcManOH)₃ (42).

3.2 > De l'internalisation *in vitro* à la sélectivité *in vivo*

La combinaison de multiples mécanismes de destruction tissulaire complique fortement l'optimisation des protocoles thérapeutiques. Il conduit également à s'interroger sur la sélectivité du traitement PDT. Celle-ci est classiquement définie comme le ratio des concentrations de photosensibilisateur entre le tissu tumoral et le tissu sain avoisinant. Si l'initiation du traitement au niveau vasculaire est essentielle à la destruction tissulaire, comment comprendre la sélectivité de l'effet PDT ? Se limite-t-elle à la sélectivité du laser, c'est-à-dire à la zone illuminée ? Pour répondre à cette problématique, il faut s'interroger à la fois sur les spécificités des cellules tumorales, mais aussi sur celles des néo-vaisseaux alimentant la tumeur.

3.2.1 > La cellule tumorale, une cible privilégiée ?

Dans l'idéal, la PDT implique une accumulation sélective du photosensibilisateur dans le tissu tumoral. Cette sélectivité *in vivo* peut être perçue comme le simple prolongement de la sélectivité constatée *in vitro* pour certains photosensibilisateurs. Ainsi, les études *in vitro* permettent de mettre en évidence des différences d'internalisation des photosensibilisateurs en fonction de la lignée tumorale. Ceci a, par exemple, été montré pour l'HpD par comparaison de deux lignées cellulaires (cellules de carcinome épidermoïde oral et de gliome). Ces différences sont imputables à de nombreux facteurs : volume cellulaire, état de prolifération, type cellulaire, capacité (et affinité) des cibles intracellulaires à lier le photosensibilisateur (55). Les spécificités des cellules tumorales ne permettent de ne rendre compte qu'en partie de la sélectivité *in vivo*. En effet, il a été démontré que l'hypéricine présente une relative sélectivité tumorale *in vivo*, malgré l'absence de différence d'internalisation *in vitro* entre cellules tumorales (cellules de carcinome

urothélial) et cellules saines (cellules urothéliales bénignes) (56).

Le métabolisme particulier des cellules tumorales a également été évoqué comme facteur à l'origine de la sélectivité. Leur taux élevé de glycolyse, même en présence d'oxygène (effet Warburg), aboutit à une acidification du milieu extracellulaire (57). Le pH de l'environnement extracellulaire des tumeurs serait de 6,8 contre 7,3 pour le tissu sain tandis que le pH intracellulaire serait dans les deux cas de 7,2 (58). Ces gradients de pH entre les milieux intra- et extracellulaire mais aussi entre le tissu tumoral et le tissu sain pourraient faciliter l'accumulation du photosensibilisateur dans la tumeur.

L'impact de si faibles variations de pH sur la lipophilie a été évalué pour différents photosensibilisateurs (59). Une augmentation de la lipophilie de la TPP(*m*OH)₄ à pH acide a également été décrite par Moan *et al.* (60). Ces mesures de lipophilie peuvent être rapprochées des interactions plus fortes avec les transporteurs plasmatiques observées à pH acide : cas de l'association chlorure e6 – LDL (plus forte à pH 6,5 que 7,4) (61) ou de l'association TPPP (porphyrine tétraphosphonée) – albumine (plus forte à pH 6 que 7 ou 8) (62). De telles études permettent de mieux comprendre l'augmentation d'internalisation à pH acide observée pour certains photosensibilisateurs (exemple de l'hématoporphyrine) (63), effet parfois obtenu seulement en présence de sérum (par exemple, pour la chlorure e6) (64). La complexité des phénomènes mis en jeu ne permet pas de trancher définitivement la question de l'origine de ces observations : modification des propriétés intrinsèques du photosensibilisateur ou variation de l'environnement ? De plus, les variations de pH d'une tumeur à l'autre sont importantes (65), ce qui laisse penser que cette hypothèse ne peut pas à elle seule rendre compte complètement de la sélectivité.

3.2.2 > Les vaisseaux sanguins, un compartiment non-neutre

Les spécificités des cellules tumorales et de leur micro-environnement ne permettent pas d'expliquer totalement la sélectivité des photosensibilisateurs. Ceci a conduit à envisager un rôle du compartiment vasculaire sur cette sélectivité (21). Deux aspects se combinent ici : d'une part, les spécificités des néo-vaisseaux au niveau des tumeurs et d'autre part, les interactions des photosensibilisateurs avec les lipoprotéines et protéines plasmatiques.

3.2.2.1 > *Perméabilité particulière des néo-vaisseaux*

Au cours du développement d'une tumeur, des néo-vaisseaux se forment lorsque la tumeur atteint une taille critique (environ 2 mm³) à partir de laquelle la diffusion n'est plus suffisante pour alimenter les cellules tumorales en oxygène et nutriments. Cette angiogénèse, directement

3 > Le difficile passage de la cellule à l'organisme

induite par l'hypoxie des cellules tumorales, est essentielle au développement de la tumeur et permet la dissémination de cellules cancéreuses dans l'organisme et donc la formation de métastases. Elle se décompose en différentes étapes successives : activation des cellules endothéliales, dégradation de la membrane basale, migration des cellules endothéliales, formation des vaisseaux. Elle se termine par une phase de remodelage, souvent incomplète, ce qui explique la forme irrégulière, dilatée et tortueuse, des vaisseaux sanguins au niveau de la tumeur. Cette forme particulière s'accompagne souvent d'un taux élevé de prolifération des cellules endothéliales, d'une déficience en péricytes et d'aberrations dans la formation de la membrane basale, un ensemble d'anomalies qui accroît la perméabilité des néo-vaisseaux (57). Cette propriété est d'autant plus intéressante que le drainage lymphatique des tumeurs est inefficace, ce qui permet d'obtenir une rétention préférentielle au niveau du tissu tumoral : c'est l'effet EPR (*Enhanced Permeability and Retention*), décrit pour la première fois par Maeda (Figure 6) (66).

L'effet EPR a notamment été exploité pour favoriser l'accumulation de particules telles que les nanotransporteurs, permettant d'obtenir une concentration 10 à 50 fois plus élevée dans la tumeur que dans le tissu sain. Aujourd'hui, il apparaît comme un mode de ciblage du tissu tumoral

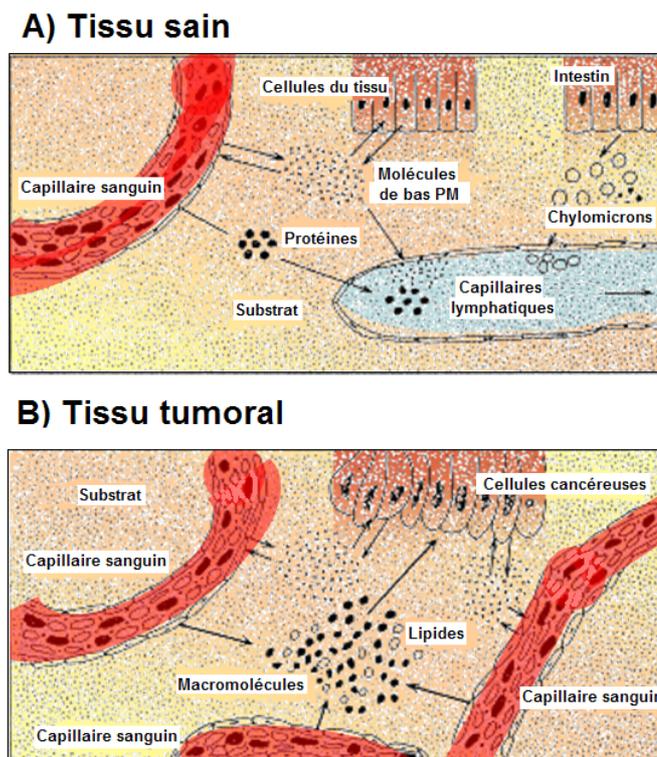


Figure 6 - Différences de vascularisation entre le tissu sain (A) et le tissu tumoral (B)

D'après Maeda *et al.* (doi : 10.1016/S0065-2571(00)00013-3)

très efficace en dépit de sa passivité. Il est surtout applicable à la quasi-totalité des cancers humains, à l'exception de tumeurs hypovascularisées telles que les cancers prostatiques ou pancréatiques (57). Les expériences menées par Roberts *et al.* ont cependant montré que la rétention du photosensibilisateur au niveau de la tumeur ne peut se résumer à une augmentation de la perméabilité vasculaire (67). Ces auteurs ont formulé l'hypothèse que la rétention n'est pas un processus passif et qu'elle impliquerait l'affinité pour l'endothélium des néo-vaisseaux du complexe que le photosensibilisateur forme avec un transporteur (albumine, HDL, LDL). L'effet EPR peut également être obtenu avec des transporteurs synthétiques, tels que des nanoparticules (68). Cette conclusion se rapproche de l'implication de l'effet EPR dans le mécanisme d'action des anticancéreux fortement liés aux lipoprotéines & protéines plasmatiques, tels que les anthracyclines, le taxol et l'étoposide (69). En effet, l'effet EPR ne concernerait pas les protéines de taille inférieure à 30 kDa mais il a pu être mis en évidence pour un polymère plus petit (16 kDa), dans la mesure où celui-ci se lie fortement à l'albumine (poids moléculaire du complexe de 80 kDa) (70).

3.2.2.2 > Rôle des protéines & lipoprotéines plasmatiques

Une fois administré *in vivo*, le photosensibilisateur interagit avec les lipoprotéines et protéines plasmatiques. Cette association est le résultat de la forte lipophilie de la plupart des photosensibilisateurs existants, lipophilie suffisamment forte pour que l'existence du photosensibilisateur sous forme libre soit même discutée. Contrairement à d'autres médicaments, la fraction liée n'est pas forcément inactive, bien au contraire, puisque les transporteurs plasmatiques connus des photosensibilisateurs (LDL, HDL ou albumine) ont rapidement été considérés comme des vecteurs modulant la pharmacocinétique de la molécule (22).

3.2.2.2.1 > Vectorisation par les LDL

Le rôle des protéines plasmatiques, et notamment des lipoprotéines de faible densité (LDL), dans la distribution des photosensibilisateurs a été évoqué, pour la première fois, par Jori au début des années 1990 (18). Il avait observé une corrélation entre transport par les LDL dans le plasma et sélectivité tumorale. Cette corrélation peut s'expliquer par la surexpression de récepteurs aux LDL à la fois au niveau de la membrane des cellules tumorales, mais aussi au niveau de l'endothélium des vaisseaux alimentant la tumeur. Cette double surexpression résulte de la prolifération rapide des cellules tumorales, et donc de leur consommation accrue de cholestérol exogène (pour la synthèse des membranes) fourni par les LDL (71). Couplée à la perméabilité accrue des microvaisseaux (constatée également dans les tumeurs intra-oculaires), l'association aux LDL est apparue comme un moyen d'améliorer le ciblage des cellules tumorales, stratégie

3 > Le difficile passage de la cellule à l'organisme

exploitable pour les photosensibilisateurs mais également plus généralement pour de nombreux anticancéreux (72-74). Cette possibilité d'association a donné lieu à de nombreuses études. Les études de distribution plasmatique montrent que, dans le plasma, l'association aux LDL concernerait principalement les photosensibilisateurs les plus lipophiles (51). Cette observation peut apparaître comme l'explication biologique de la corrélation entre la lipophilie d'un photosensibilisateur et sa sélectivité.

Le fait que seule une fraction minoritaire du photosensibilisateur se lie aux LDL a conduit à envisager l'administration de complexes LDL – photosensibilisateur. De tels complexes peuvent être internalisés *in vitro* par les cellules tumorales par l'intermédiaire de récepteurs aux LDL (Figure 7). Dans le cas de l'hématoporphyrine, il a été observé une augmentation significative de l'internalisation par les cellules HT1080 (cellules de fibrosarcome) sous l'effet de la stimulation de l'expression de récepteurs aux LDL (75), qui induisent *in vivo* une modification de la pharmacocinétique du photosensibilisateur et augmentent la sélectivité tumorale (76). Les résultats prometteurs obtenus *in vitro* par couplage à des LDL ne se sont pas toujours traduits *in vivo* par une nette amélioration de la sélectivité (24). Dans le cas du rétinoblastome, les complexes LDL – Chlorine e6 se sont révélés efficaces *in vitro* pour cibler des cellules de rétinoblastome (77). L'association aux LDL présente un intérêt particulier dans ce type de tumeur, puisqu'il a été démontré que les LDL sont susceptibles de passer l'endothélium plus lâche présent au niveau des tumeurs oculaires (77).

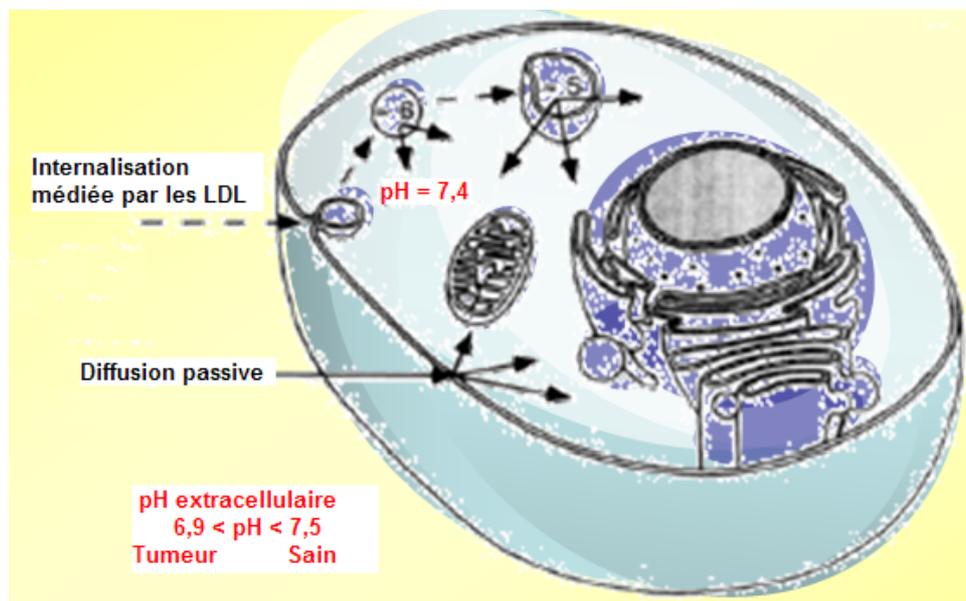


Figure 7 - Internalisation médiée par les LDL

Repris de Kuzelova (doi : 10.1021/bi00035a034)

Une autre possibilité de favoriser la liaison du photosensibilisateur aux LDL est de l'administrer sous une formulation liposomale. Cette formulation permet de délivrer le photosensibilisateur plus efficacement vers les LDL (78) et devrait orienter le mode de destruction tissulaire vers une destruction directe des cellules tumorales. Cela a été décrit dans le cas de phthalocyanines, la formulation liposomale favorisant la destruction directe des cellules tumorales, en retardant et diminuant les dommages vasculaires (51).

3.2.2.2 >Rôle des autres protéines et lipoprotéines

Le corollaire du ciblage tumoral par les LDL est de considérer que le photosensibilisateur lié aux autres lipoprotéines et protéines plasmatiques est séquestré soit dans les vaisseaux, soit au niveau du stroma vasculaire, orientant l'effet PDT vers une destruction des vaisseaux alimentant la tumeur. Zhou *et al.* ont suggéré un effet vasculaire prédominant pour les solutions aqueuses d'hématoporphyrine (10 % de liaison aux LDL, 55 % de liaison aux HDL, 35 % aux protéines (51)), contrairement au complexe avec les LDL qui oriente l'effet PDT vers une destruction directe des cellules tumorales (51).

De nombreux résultats plus ou moins contradictoires avec les idées précédentes ont été décrits dans la littérature. Dans le cas de l'hypéricine, les études *in vivo* chez la souris ont montré que l'efficacité PDT est mieux corrélée avec la concentration plasmatique totale en photosensibilisateur, plutôt qu'avec la concentration au niveau de la tumeur. Ce résultat suggère un mécanisme d'action de type vasculaire, même si l'association majoritaire de l'hypéricine avec les LDL aurait pu suggérer une orientation du mode d'action vers une destruction tumorale directe (79). Il semble important de ne pas sur-estimer le lien entre distribution plasmatique et effet PDT. Le mode de destruction tumorale dépend également d'autres facteurs, et notamment du délai entre injection et illumination. De plus, si les cellules tumorales surexpriment les récepteurs aux LDL, c'est aussi le cas des cellules endothéliales des néo-vaisseaux. La surexpression des récepteurs aux LDL par les cellules endothéliales expliquerait l'efficacité du complexe BPD-MA – LDL à détruire les néo-vaisseaux (80). Combiné à l'effet antitumoral direct, cet effet vasculaire permet d'augmenter l'efficacité du traitement (54).

Ces divergences avec l'idée d'une orientation de l'effet PDT selon la distribution plasmatique se trouvent renforcées par des exceptions à l'idée d'une sélectivité accrue par liaison aux LDL. Ainsi, l'hématoporphyrine et la protoporphyrine ont de fortes affinités pour les LDL mais une mauvaise sélectivité tumorale. Le Photofrin[®], possédant une affinité pour les LDL intermédiaire entre celles de l'hématoporphyrine et de la protoporphyrine, présente un bon ciblage tumoral. A l'inverse, la TPPS4 (TPP tétrasulfonatée en position *para*) cible efficacement la tumeur, malgré une

3 > Le difficile passage de la cellule à l'organisme

liaison préférentielle aux protéines plasmatiques et une faible affinité pour les LDL (51). Le fait de se lier aux HDL ou à des protéines plasmatiques n'empêche donc pas le photosensibilisateur d'atteindre la tumeur. Il serait possible de vectoriser des anticancéreux vers la tumeur, en les complexant avec la transferrine (81). Les cellules tumorales surexpriment les récepteurs à cette protéine, en raison de leur besoin accru en fer pour leur métabolisme. Les complexes de l'hématoporphyrine avec l'albumine ont été étudiés *in vivo*. Malgré une faible accumulation au niveau des cellules tumorales (présence faible au niveau des membranes externes, absence à l'intérieur), il a été décrit une accumulation au niveau de macrophages associés à la tumeur (26; 82). Cette accumulation résulterait de la capacité des macrophages à piéger l'albumine endommagée par les radicaux libres (27). De plus, l'albumine pourrait jouer le rôle de vecteur favorisant l'internalisation du photosensibilisateur dans d'autres types cellulaires, comme le montre l'existence d'une endocytose médiée par des récepteurs spécifiques de l'albumine sur des lignées de cellules épithéliales (27). Des nanoparticules d'albumine sont même à l'étude comme moyen d'améliorer le ciblage tumoral (68).

En conclusion de cette revue de la littérature, le rôle de la liaison aux lipoprotéines & protéines plasmatiques sur la balance entre ciblage cellulaire et ciblage vasculaire reste difficile à appréhender. Comme nous l'avons vu précédemment, le délai entre injection et illumination joue un rôle dans l'équilibre entre ces deux modes d'action, ce qui complique les comparaisons des données bibliographiques. De plus, d'autres modes d'actions (effet *bystander*, réaction inflammatoire,...) sont susceptibles d'interférer. Le tableau est beaucoup plus complexe que ce que pourrait laisser supposer les études de vectorisation par l'intermédiaire des LDL. Il n'est pas possible d'établir un lien strict entre la distribution plasmatique et le type de destruction tumorale, applicable pour toutes les structures de photosensibilisateurs. Il n'empêche que la liaison à un constituant plasmatique plus qu'à un autre apparaît comme un moyen de moduler la pharmacocinétique, d'orienter le mode de distribution du photosensibilisateur vers la tumeur, de modifier son mode d'internalisation par la cellule tumorale. Les études de complexation de la BPD-MA avec les HDL ont montré que cette association conduit à retarder l'accumulation tumorale (76). Les lipoprotéines et protéines plasmatiques jouent également un rôle essentiel dans la désagrégation du photosensibilisateur juste après son administration. Cette désagrégation est un préalable indispensable à une éventuelle activation du photosensibilisateur au niveau du compartiment plasmatique.

>>>

Analyse Physico-chimique

Ionisation & Lipophilie

>>>

Parmi les différentes propriétés d'un photosensibilisateur, son ionisation et sa lipophilie sont susceptibles d'affecter son devenir *in vivo*, à la fois en ce qui concerne son transport jusqu'au tissu

tumoral et en ce qui concerne son internalisation par les cellules tumorales. C'est pourquoi, nous avons voulu étudier ces deux propriétés sur notre série de TPP. Cette étude est précédée d'une description des propriétés spectroscopiques électroniques des TPP à pH neutre. En effet, si la spectroscopie est essentielle dans l'initiation du traitement PDT, elle peut également fournir de nombreuses informations sur la structure de la TPP en solution, ce qui en fait un excellent moyen d'étude. Dans les différents aspects présentés ici, l'objectif est d'évaluer l'impact de la glycoconjugaison sur les propriétés du photosensibilisateur. Une attention toute particulière sera donc portée aux relations structure – propriété, et aux possibles approches *in silico*.

1 > Spectroscopie électronique à pH neutre

Une des raisons de l'utilisation des porphyrines en PDT est leur absorption au niveau de la fenêtre optique des milieux biologiques, c'est-à-dire à environ 650 nm. Cette propriété du noyau porphyrine en milieu neutre résulte de sa forte conjugaison, impliquant 22 électrons π . Cette conjugaison est encore plus importante pour les TPP puisque les phényles interagissent avec le macrocycle tétrapyrrolique. La bande à 650 nm, si importante pour le traitement PDT, n'est qu'une des cinq bandes que présente classiquement le spectre d'absorption des TPP en milieu neutre (Figure 8) : quatre de ces bandes se situent entre 500 et 650 nm, la cinquième autour de 415 nm. Cette cinquième bande est la plus intense : c'est la bande de Soret, caractéristique des tétrapyrroles. Les quatre bandes de plus faible intensité entre 500 et 650 nm sont notées, selon les auteurs, en chiffres romains (I à IV, dans l'ordre décroissant des longueurs d'onde) ou sont appelées bandes Q (bandes Q_{Y10} , Q_{Y00} , Q_{X10} et Q_{X00} dans l'ordre croissant des longueurs d'onde)

(83). En fluorescence, le spectre des porphyrines comporte deux bandes, baptisées Q^*_{X00} et Q^*_{X01} . La bande la plus intense se situe à environ 650 nm, c'est-à-dire au niveau de la fenêtre optique des tissus. La fluorescence d'un photosensibilisateur n'est pas directement impliquée dans le mécanisme d'action du traitement. Cependant, cette propriété mérite d'être étudiée car sa sensibilité à l'état d'agrégation et à l'environnement de la TPP en fait un outil analytique très utile.

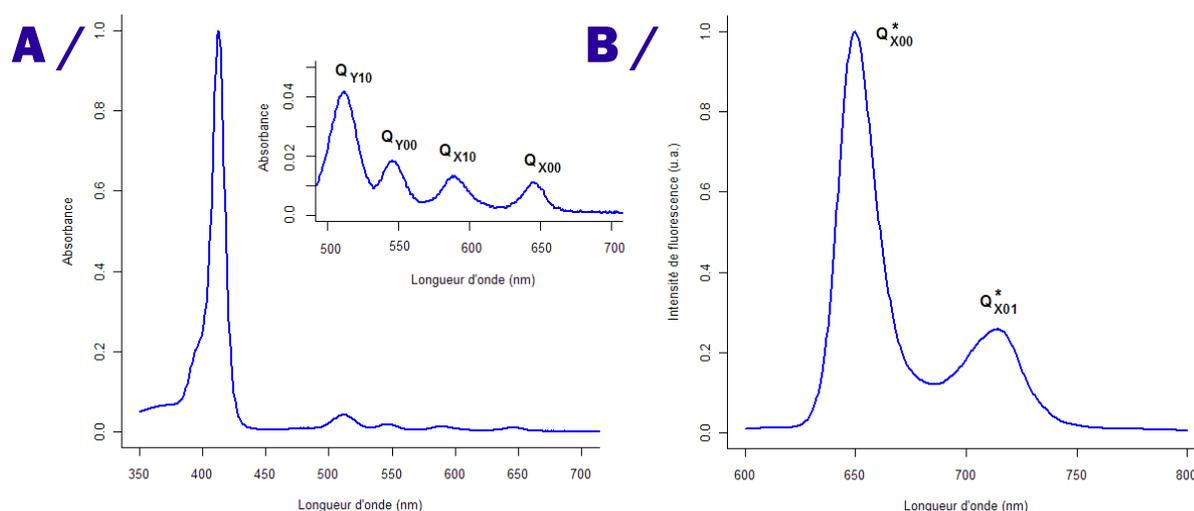


Figure 8 - Spectroscopie électronique des TPP : l'exemple de la TPP non substituée

A / Spectre d'absorption – B / Spectre de fluorescence. Les spectres ont été enregistrés dans le mélange méthanol – DMF 99:1 (v/v) selon les conditions expérimentales détaillées dans le paragraphe 1.1.2.

1.1 > Matériel et Méthodes

1.1.1 > Produits chimiques & matériel utilisés

La TPP et la TPP(*p*OH)₄ proviennent de Sigma-Aldrich® (Allemagne), la TPP(*m*OH)₄ de Frontier Scientific® (USA). Tous les autres dérivés de la TPP ont été synthétisés à l'Institut Curie (UMR 176 CNRS) par l'équipe du Dr Philippe Maillard selon des protocoles publiés par ailleurs (31; 33; 41; 84). Le tampon PBS pH 7,4 et le diméthylformamide (DMF) sont fournis par Sigma-Aldrich® (Allemagne), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le méthanol par les laboratoires Prolabo® (France). Tous les produits sont de qualité analytique ou supérieure. L'eau ultrapure est obtenue avec l'appareil Alpha-Q (Millipore®, France). Les spectres d'absorption ont été enregistrés avec le spectrophotomètre UV – Visible Varian® Cary Bio 100 (Australie), les spectres de fluorescence avec le spectrofluorimètre Perkin-Elmer® LS 50B.

1 > Spectroscopie électronique à pH neutre

1.1.2 > Enregistrement des spectres

Etude en milieu méthanol – DMF 99:1 (v/v)

Les solutions-mères méthanoliques de TPP sont diluées dans des mélange méthanol – DMF (proportion finale 99:1 (v/v)) de telle sorte que l'absorbance soit de l'ordre de 1 au niveau de la bande de Soret. Les spectres d'absorption sont enregistrés de 350 à 800 nm (fentes de 2,5 nm et trajet optique de 10 mm). Les spectres de fluorescence sont enregistrés entre 550 et 900 nm sur des solutions moins concentrées (absorbance inférieure à 0,1 au niveau de la bande Q_{Y10}), à trois longueurs d'onde d'excitation différentes (510, 515 et 520 nm). Les fentes d'excitation et d'émission sont toutes les deux réglées sur 2,5 nm. La cuve utilisée mesure 10 mm de côté. Pour le calcul du rendement de fluorescence, la référence est la rhodamine 101 en solution dans l'éthanol ($\Phi_f = 1$). Après correction du spectre d'émission, les aires sous la courbe des différents spectres sont divisés par l'absorbance correspondante. La moyenne de ces valeurs de ces rapports est utilisée pour calculer le rendement de fluorescence à partir de la relation suivante :

$$\Phi_X = \Phi_{ST} \times \frac{Ratio_X}{Ratio_{ST}} \times \frac{\eta_X^2}{\eta_{ST}^2} \quad \text{(Equation 1)}$$

où les indices X et ST désignent respectivement la TPP étudiée et la référence, Φ le rendement de fluorescence et η l'indice de réfraction du solvant (85).

Etude en milieu aqueux

Une solution de porphyrine à la concentration de $5 \cdot 10^{-5}$ M dans le DMSO est diluée au 1/100^{ème} dans du tampon phosphate PBS pH 7,4. Des spectres d'absorption sont enregistrés de 350 à 500 nm juste après la dilution et à différents temps étalés sur 6 heures. Le trajet optique est de 1 cm. Les fentes sont réglées sur 2 nm.

1.1.3 > Analyse en Composantes Principales

Une Analyse en Composantes Principales est réalisée sur les spectres d'absorption et de fluorescence enregistrés dans le milieu méthanol – DMF 99:1 (v/v). Le calcul est réalisé à l'aide du *package FactoMineR* (86) développé pour le logiciel *R* (87).

1.2 > Agrégation en milieu aqueux

Diluées dans le tampon PBS à pH neutre, les TPP présentent un spectre nettement différent du spectre général présenté ci-dessus. La forte diminution d'absorbance, accompagnée d'un élargissement des différentes bandes, traduit une agrégation de la TPP, comme le montre

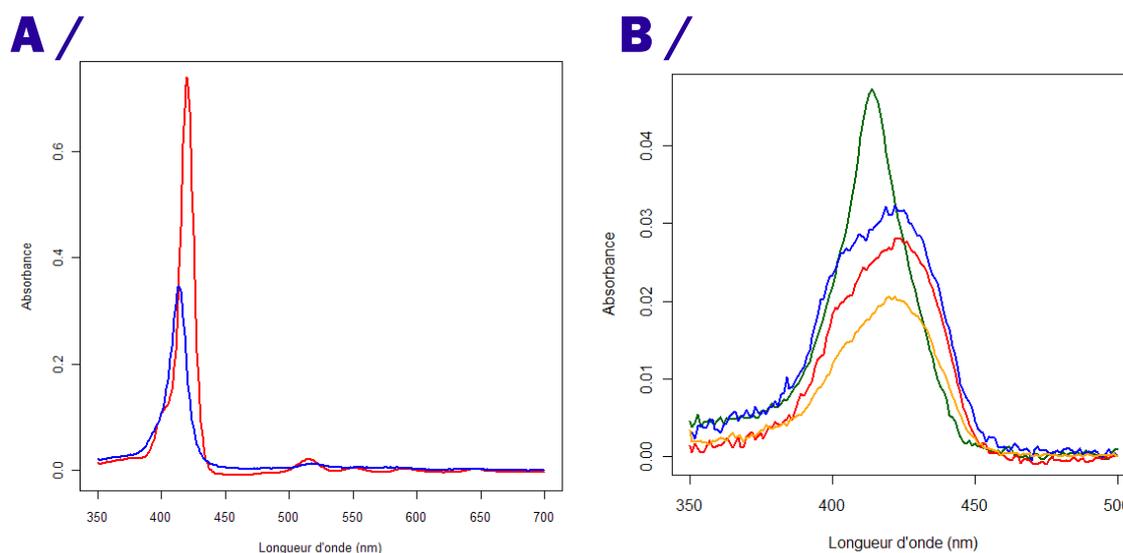


Figure 9 - Agrégation des TPP : effet de la structure

A / Spectres d'absorption de la TPP(*mOβGluOH*)₄ dans le DMSO en rouge et dans le tampon phosphate en bleu ; B / Spectres d'absorption au niveau de la bande de Soret enregistrés dans le tampon phosphate pour les composés suivants : TPP(*mOβGluOH*)₃ en vert foncé, TPP(*mOH*)₃ en rouge, TPP(*mOH*)₄ en orange, TPP(*pODEGOαManOH*)₃ en bleu

l'exemple de la TPP(*mOβGluOH*)₄ (Figure 9). De plus, la longueur d'onde du maximum de la bande de Soret est nettement décalée vers le bleu. Si les modifications spectrales sont nettes pour ce composé ou pour un composé tel que la TPP(*mOβGluOH*)₃, elles sont encore plus drastiques pour les composés hydroxylés correspondants, TPP(*mOH*)₃ et TPP(*mOH*)₄. Malgré la présence de trois sucres, la TPP(*pODEGOαManOH*)₃ présente, en milieu aqueux, un spectre plus proche de celui des dérivés hydroxylés que des glycoconjugués, spectre caractérisé par une bande de Soret très large (Figure 9). L'agrégation est donc un phénomène complexe dépendant de la substitution du noyau TPP, mais également susceptible d'évoluer au cours du temps. La figure 10 montre ainsi l'exemple de la TPP(*pOβGluOH*)₄, dont l'intensité d'absorption au niveau de la bande de Soret diminue au cours du temps, très rapidement au cours de la première heure, plus lentement ensuite. L'exemple de la TPP(*pOβGalOH*)₃ présente une particularité particulièrement intéressante, puisqu'une bande secondaire à 436 nm, initialement absente, apparaît nettement sur le spectre enregistré après 40 minutes, avant de diminuer progressivement. Les structures des agrégats varient donc, non seulement selon la substitution du noyau TPP, mais également au cours du temps.

Les décalages vers le rouge ou le bleu des bandes de Soret dépendent de l'arrangement des molécules de TPP au sein de l'agrégat. Un décalage vers le bleu, comme celui observé pour la TPP(*mOβGluOH*)₄, traduit un agrégat de type H, où les noyaux TPP se situent

1 > Spectroscopie électronique à pH neutre

face-à-face (88; 89). A l'inverse, un décalage vers le rouge, observé sur la TPP(ρ O β GluOH)₄, traduit une juxtaposition côte-à-côte des noyaux TPP, organisation dite de type J. L'existence transitoire d'un épaulement très décalé vers le rouge pour la TPP(ρ O β GalOH)₃ pourrait être interprétée comme l'existence d'oligomères de type J, avant que la taille des agrégats n'augmente. Lors de l'agrégation, le décalage de la bande du monomère doit augmenter avec le degré d'agrégation. Le fait que, pour cette TPP(ρ O β GalOH)₃, la bande principale présente un décalage vers le rouge inférieur à cet état transitoire, pourrait résulter d'agrégats non homogènes, où les noyaux TPP présenteraient différentes orientations relatives.

L'agrégation rend donc difficile la caractérisation des monomères de TPP en milieu aqueux. C'est pourquoi les études suivantes sur la relation structure – spectroscopie et sur l'ionisation seront réalisées dans des milieux organiques permettant d'assurer une solubilisation correcte des dérivés étudiés.

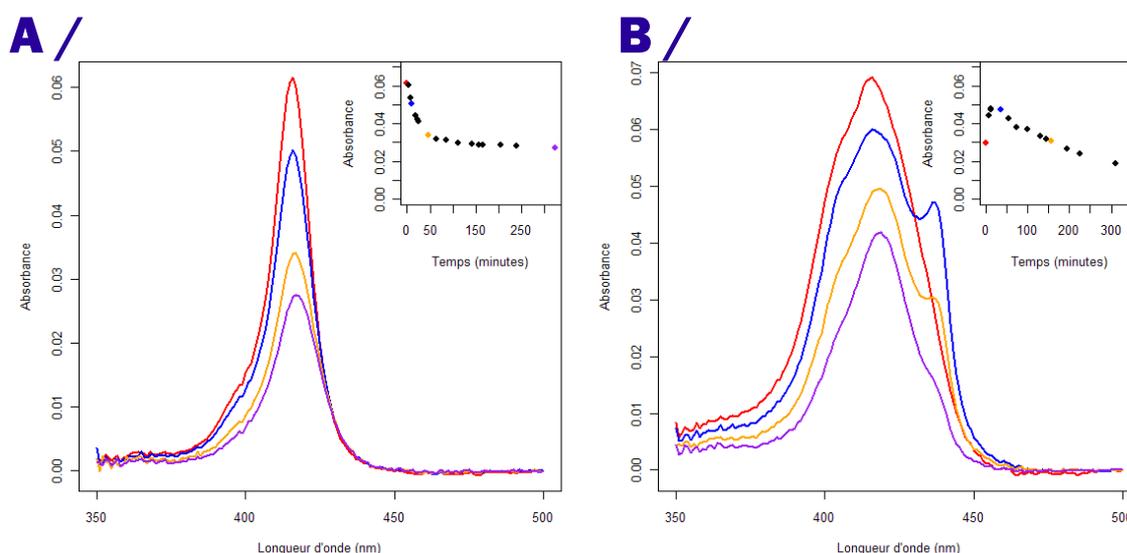


Figure 10 - Agrégation des TPP au cours du temps

A / exemple de la TPP(ρ O β GluOH)₄ (insert : absorbance à 416 nm au cours du temps) ;

B / exemple de la TPP(ρ O β GalOH)₃ (insert : absorbance à 436 nm au cours du temps)

1.3 > Relation Structure – Spectroscopie électronique des monomères

L'ensemble des dérivés étudiés présente, en milieu organique, les caractéristiques spectrales classiques des TPP (Tableau 2). Toutefois, de légères différences peuvent être observées en fonction de la substitution. Cette comparaison des spectres obtenus dans le mélange méthanol – diméthylformamide 99 / 1 (v/v) pour les différents dérivés permet d'évaluer l'impact de la substitution sur l'absorption et la fluorescence.

1.3.1 > Modifications des spectres sous l'effet de la substitution

1.3.1.1 > **Nombre & position des substituants : l'exemple des TPP hydroxylées**

La comparaison des spectres des quatre TPP hydroxylées avec le spectre du composé non substitué permet de distinguer deux effets de substitution : l'effet de la position du substituant (*mé*ta ou *para*) et l'effet du nombre de substituants (trois ou quatre hydroxyles selon le composé considéré) (Figure 11). Les spectres présentés sur la figure A sont normalisés selon l'absorbance maximale au niveau de la bande de Soret. Pour les dérivés de la série *para*, les bandes Q_{Y10} et Q_{X10} présentent une absorbance inférieure à la TPP, contrairement aux bandes Q_{Y00} et Q_{X00} plus intenses que les bandes correspondantes de la TPP. Les composés en *mé*ta présentent le comportement inverse, même si les différences sont moins nettes : des bandes Q_{Y10} et Q_{X10} légèrement plus intenses que celles de la TPP et des bandes Q_{Y00} et Q_{X00} moins intenses. La substitution en position *para* conduit à un décalage systématique des différentes bandes du spectre d'absorption vers le rouge et à une augmentation des ratios des intensités des bandes Q_{X00}/Q_{X10} et Q_{Y00}/Q_{Y10} . La présence d'un substituant en position *mé*ta a un effet plus complexe. Le décalage de la bande de Soret et des deux bandes Q_Y vers le rouge est moins net que pour les isomères *para* correspondants. De plus, les deux bandes Q_X sont, elles, décalées vers le bleu et les ratios Q_{X00}/Q_{X10} et Q_{Y00}/Q_{Y10} diminuent. L'ampleur de ces modifications relatives à la position des

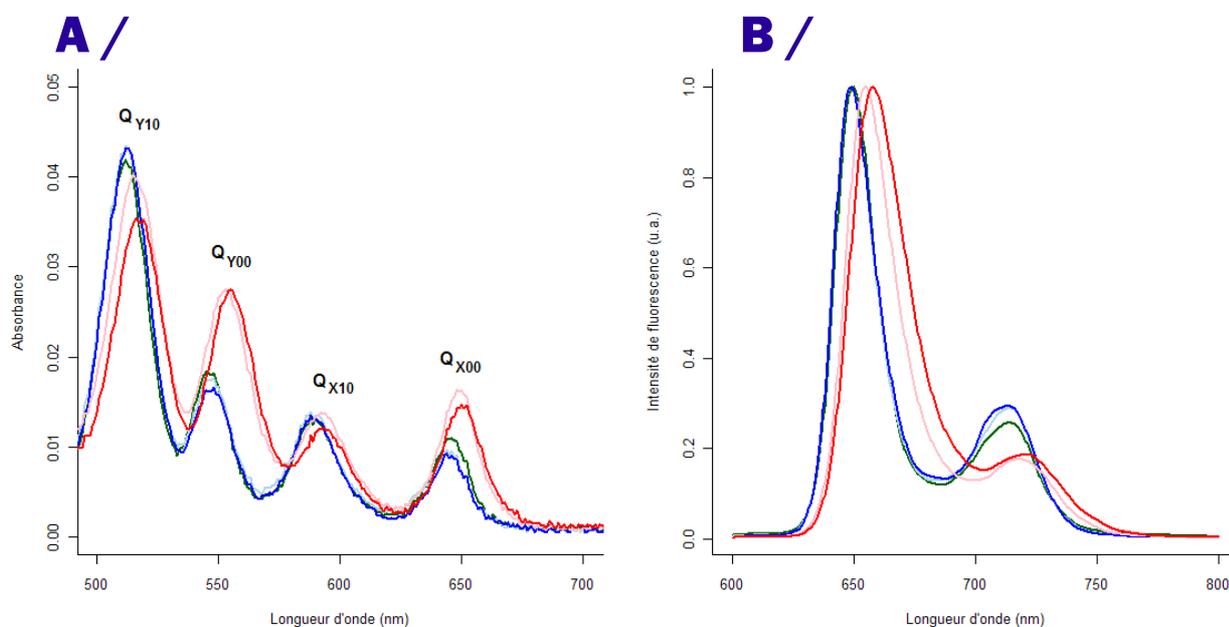


Figure 11 - Spectroscopie des TPP : effet du nombre et de la position du substituant

A / Bandes Q du spectre d'absorption ; **B /** Spectres de fluorescence. Spectres enregistrés dans le mélange méthanol – DMF 99:1 (v/v). TPP en vert, TPP(mOH)₃ en bleu clair, TPP(mOH)₄ en bleu, TPP(pOH)₃ en saumon, TPP(pOH)₄ en rouge

1 > Spectroscopie électronique à pH neutre

Composé	Absorption				Fluorescence			Rendement
	Soret	Q _{Y10}	Q _{Y00}	Q _{X10}	Q _{X00}	Q* _{X00}	Q* _{X01}	
TPP	413	512	548	590	646	650	714	0,063 ± 0,011
TPP(<i>m</i> OH) ₃	414	512	548	588	644	649	714	0,041 ± 0,003
TPP(<i>m</i> OH) ₄	415	512	548	588	644	649	713	0,047 ± 0,002
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₁	413	511	545	587	643	648	713	0,058 ± 0,012
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-10	413	511	545	588	644	648	713	0,057 ± 0,008
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-15	413	511	545	587	643	648	714	0,051 ± 0,006
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	414	513	547	587	644	648	714	0,051 ± 0,007
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄	415	513	548	588	644	648	714	0,043 ± 0,002
TPP(<i>p</i> OH) ₃	417	515	553	592	648	655	718	0,062 ± 0,004
TPP(<i>p</i> OH) ₄	418	516	555	593	652	658	721	0,064 ± 0,002
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₁	413	512	547	589	645	650	717	0,044 ± 0,007
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-10	414	513	549	589	646	651	716	0,057 ± 0,009
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-15	416	514	551	590	647	653	719	0,060 ± 0,010
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	416	514	550	591	646	653	718	0,067 ± 0,006
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₄	417	514	551	592	648	654	716	0,068 ± 0,009
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	417	516	552	592	648	654	717	0,061 ± 0,005
TPP(<i>p</i> OMEGOαLFucOH) ₃	417	515	551	591	649	654	719	0,063 ± 0,002
TPP(<i>p</i> OMEGOαDFucOH) ₃	417	515	551	592	648	654	717	0,058 ± 0,007
TPP(<i>p</i> OMEGOαManOH) ₃	417	515	551	591	648	653	716	0,066 ± 0,003
TPP(<i>p</i> ODEGOβGalOH) ₃	417	515	552	591	647	654	717	0,058 ± 0,004
TPP(<i>p</i> ODEGOβGluOH) ₃	417	515	552	591	648	654	718	0,051 ± 0,001
TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	417	515	551	590	647	654	718	0,059 ± 0,003
TPP(<i>p</i> O(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	417	515	552	592	648	654	719	0,065 ± 0,004
TPP[<i>p</i> -dendr(DEGOH) ₃]	413	512	546	588	644	648	713	0,055 ± 0,007
TPP[<i>p</i> -dendr(DEGOαManOH) ₃]	413	512	546	590	643	648	713	0,049 ± 0,008
TPP[<i>p</i> -dendr(MEGOαManOH) ₃]	413	512	546	587	645	648	713	0,046 ± 0,007

Tableau 2 - Propriétés spectroscopiques électroniques dans le mélange méthanol – DMF 99 / 1 (v/v)

hydroxyles dépend nettement de leur nombre pour la série *para* (la bande Q_{X00} est ainsi décalée de 4 nm vers le rouge en passant de la TPP(*p*OH)₃ à la TPP(*p*OH)₄), tandis que les spectres des deux dérivés *méta* sont très proches.

En fluorescence, l'effet de la substitution sur les bandes Q*_{X00} et Q*_{X01} est similaire à celui constaté sur les bandes Q_{X00} et Q_{X10} des spectres d'absorption : décalage vers le rouge pour les isomères *para*, décalage vers le bleu pour les *méta*. Ce décalage des bandes s'accompagne d'un élargissement pour les isomères *para* et d'une diminution de l'intensité de la bande Q*_{X01} relativement à la bande principale Q*_{X00}. Le rendement de fluorescence des dérivés hydroxylés est

peu affecté par la substitution en *para*, contrairement à la substitution en *mé*ta qui induit une diminution de ce rendement.

1.3.1.2 > Effet de la glycoconjugaison

Les effets de nombre et de position des substituants observés sur les composés hydroxylés s'appliquent également aux dérivés glycoconjugués correspondants : TPP(*m*OβGluOH)₃, TPP(*m*OβGluOH)₄, TPP(*p*OβGalOH)₃, TPP(*p*OβGalOH)₄ et TPP(*p*OβGluOH)₄. Toutefois, les modifications spectrales sont moins nettes que celles décrites précédemment ; ce moindre impact d'un sucre par rapport à un hydroxyle témoigne du rôle de la nature du substituant, très net dans la série *para* (Figure 12). La présence d'une chaîne espaceur entre le phényle et le sucre conduit à un comportement intermédiaire entre le dérivé glycoconjugué sans espaceur et le dérivé hydroxylé, observation valable quelque soit l'espaceur considéré (MEG, DEG, (CH₂)₃). Les spectres d'absorption des dendrimères, composés monosubstitués, présentent des caractéristiques proches de celles du composé monoglycoconjugué correspondant, la TPP(*p*OβGluOH)₁.

En spectroscopie de fluorescence, l'effet de la nature du substituant est similaire à celui décrit ci-dessus, avec un décalage des bandes vers le rouge dans le même ordre : la TPP puis la TPP(*p*OβGalOH)₃, les dérivés avec espaceur et enfin la TPP(*p*OH)₃. Ce décalage s'accompagne

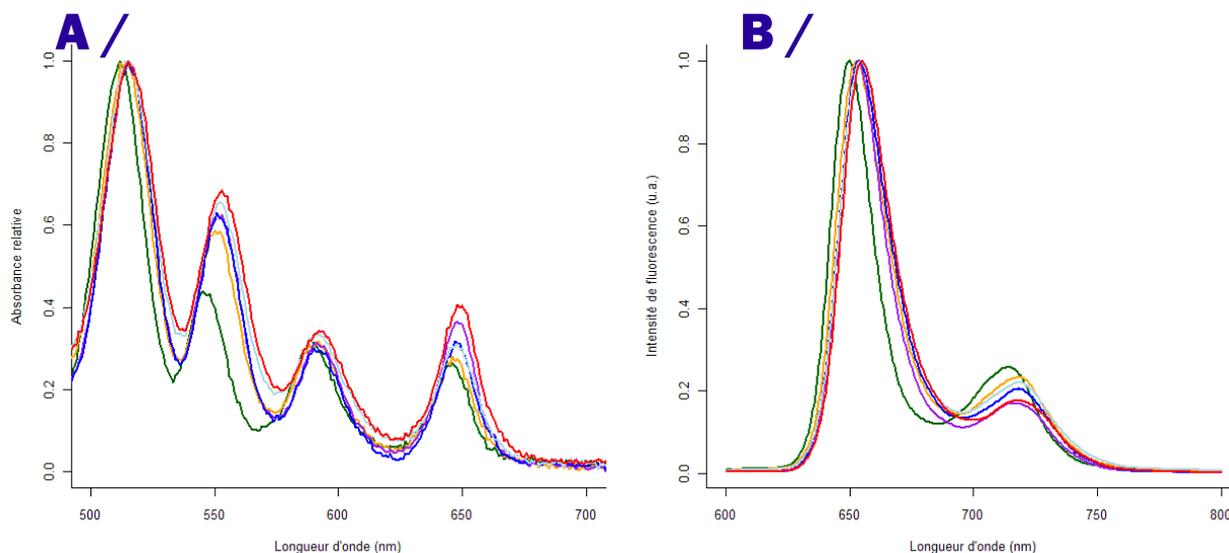


Figure 12 - Spectroscopie des TPP : effet de la nature du substituant

A / Bandes Q du spectre d'absorption ; **B /** Spectres de fluorescence. Spectres enregistrés dans le mélange méthanol – DMF 99:1 (v/v). TPP en vert, TPP(*p*OβGalOH)₃ en orange, TPP(*p*OMEGOαManOH)₃ en violet, TPP(*p*ODEGOαManOH)₃ en bleu, TPP(*p*O(CH₂)₃OαManOH)₃ en bleu clair, TPP(*p*OH)₃ en rouge

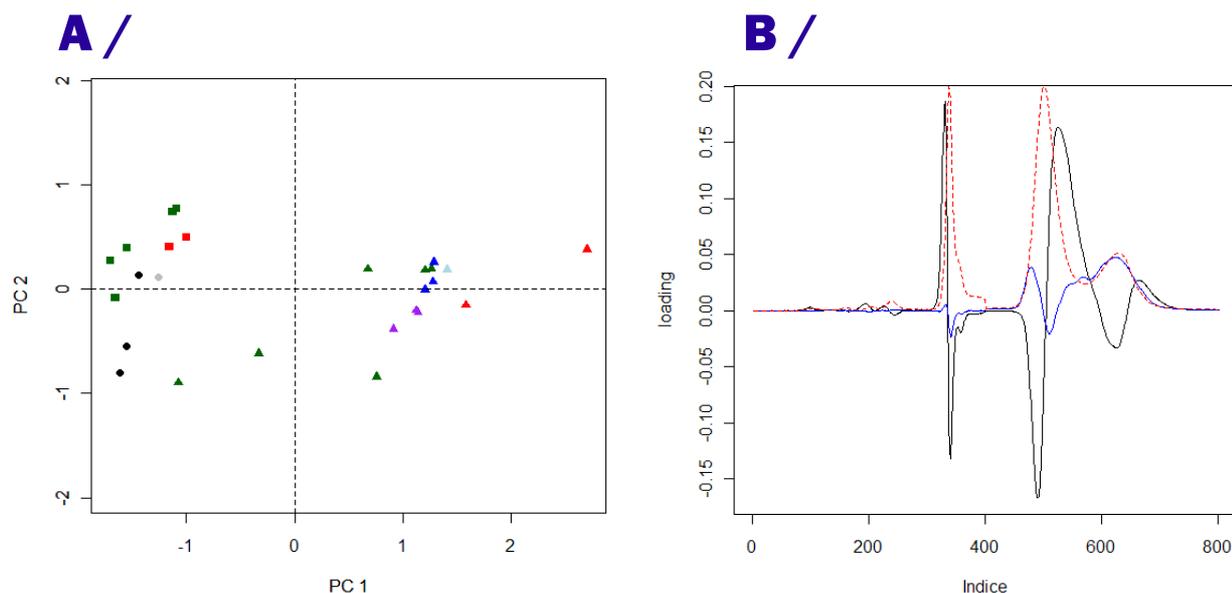


Figure 13 - Analyse en composantes principales

A / Score plot. TPP non substituée en gris, hydroxylées en rouge, glycoconjuguées sans espaceur en vert ; avec espaceur MEG en violet, DEG en bleu et TPP($\rho\text{O}(\text{CH}_2)_3\text{O}\alpha\text{ManOH}$)₃ en bleu clair, dendrimères en noir

B / Loading plot. Loadings pour la première composante en noir, pour la seconde en bleu ; spectre d'une TPP en rouge

d'un élargissement progressif des bandes. En revanche, les rendements de fluorescence sont proches d'un composé à l'autre, et diffèrent peu de celui du composé parent non substitué.

1.3.2 > Analyse en composantes principales sur les spectres

Au-delà de la simple description précédente, la relation structure – spectroscopie peut s'illustrer par une analyse en composantes principales (ACP). Cette méthode permet de calculer, à partir des variables existantes, de nouvelles variables latentes expliquant la plus grande proportion de l'information originelle. Deux composantes principales (CP) permettent d'expliquer plus de 95 % de la variance totale de la matrice des spectres initiale (Tableau 3). L'analyse des *loadings* (poids par lesquels les variables originales doivent être multipliées pour obtenir les coordonnées – ou

	Variance expliquée	Proportion de la variance totale	Proportion cumulative de la variance totale
CP 1	1,80	86,3 %	86,3 %
CP 2	0,20	9,7 %	96,1 %
CP 3	0,04	1,8 %	97,9 %

Tableau 3 - Choix du nombre de composantes principales

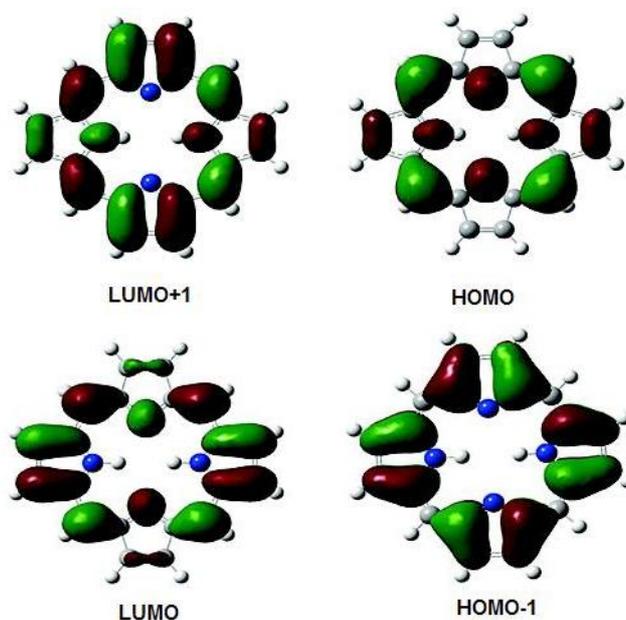


Figure 14 - Orbitales moléculaires du noyau porphyrine

d'après Petit *et al.* (doi :10.1021/jp055016w)

scores – dans le repère des CP) pour la première composante (Figure 13) montre l'importance des absorbances aux longueurs d'ondes caractéristiques des porphyrines ; par exemple au niveau de la bande de Soret, les *loadings* ont une valeur négative à 411 nm et positive à 420 nm. Ceci conduit logiquement à ce que, pour cette composante, les *scores* seront d'autant plus élevés que la bande de Soret sera plus décalée vers le rouge. Ce lien entre le décalage vers le rouge des bandes et le *score* pour la première composante explique l'emplacement des différents composés sur le *score plot* : TPP non substituée, dendrimères et dérivés en *méta* regroupés à gauche du *score plot* (proximité résultant notamment de la moindre sensibilité des dérivés de la série *méta* à la substitution), dérivés en *para* répartis le long de la première composante selon le nombre de substituants (score croissant avec le nombre de substituants) et leur nature (augmentation du score dans l'ordre : sucre sans espaceur, sucre avec espaceur, hydroxyle). Ceci confirme les commentaires faits précédemment sur les spectres et conduit à s'interroger sur l'origine de cet effet du substituant sur les propriétés spectroscopiques électroniques.

1.3.3 > Interprétation : du lien entre spectroscopie électronique et substitution

La relation entre substitution et spectroscopie peut s'expliquer à l'aide du modèle de Gouterman, modèle proposé, à la fin des années cinquante, pour expliquer l'absorption du noyau porphyrine à partir des transitions entre quatre orbitales (90). Ce modèle fait intervenir les deux orbitales occupées d'énergies les plus élevées (HOMO – *Highest Occupied Molecular Orbital* – et

1 > Spectroscopie électronique à pH neutre

HOMO-1) et les deux orbitales inoccupées d'énergies les plus faibles (LUMO – *Lowest Unoccupied Molecular Orbital* – et LUMO+1) (Figure 14). Dans l'orbitale HOMO, le nuage électronique se situe au niveau des ponts méthène et des azotes tétrapyrroliques. Dans l'orbitale HOMO-1, la densité électronique est plus élevée sur les atomes de carbone des tétrapyrroles (91). Dans les orbitales LUMO et LUMO+1, le nuage électronique se situe sur les carbones des ponts méthène et de deux pyrroles opposés : soit les deux pyrroles dont l'azote est lié à un hydrogène (axe x), soit les deux pyrroles dont l'azote n'est pas lié à un hydrogène (axe y). L'axe x correspond à une énergie plus faible que l'axe y (92; 93). Les transitions entre ces orbitales sont à l'origine des différentes bandes du spectre d'absorption, l'existence de deux axes de polarisation (orbitales LUMO et LUMO+1) expliquant la présence des quatre bandes Q dans le visible et l'épaulement sur la bande de Soret.

Un décalage vers le rouge du spectre de la TPP sous l'effet d'une substitution par des groupements électrodonneurs en position *para* a déjà été décrit précédemment par Fonda *et al.* En se basant sur le modèle de Gouterman, ils ont attribué cet effet à une augmentation de l'énergie de l'orbitale HOMO sous l'effet du caractère électrodonneur du substituant en *para* (Figure 15) et donc à une diminution des énergies de transition impliquant cette orbitale (83). L'orbitale HOMO joue un rôle plus ou moins important selon la bande considérée, ce qui pourrait expliquer pourquoi les bandes Q (notamment les bandes Q_{x10} et Q_{x00}) sont plus sensibles aux variations structurales que la bande de Soret (91; 94). A l'intérieur de la série *para*, des différences ont été constatées entre les dérivés étudiés selon le nombre et la nature des substituants. Ces deux aspects s'expliquent simplement par l'augmentation de la perturbation de l'orbitale HOMO, perturbation d'autant plus importante que le nombre de substituants sera élevé et que ceux-ci seront électrodonneurs. En effet, les radicaux hydroxyle sont plus électrodonneurs que les groupes sucre des dérivés glycoconjugués.

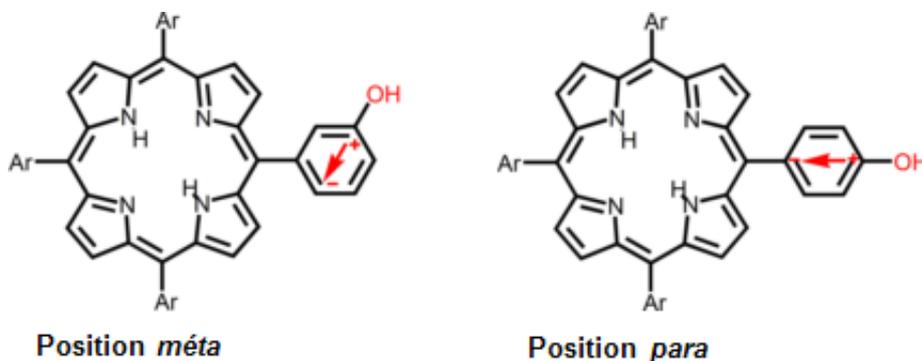


Figure 15 - Effet électrodonneur selon la position de substitution

La complexité des phénomènes mis en jeu trouve une autre illustration dans le comportement des dérivés de la série *méta*. Ainsi, le moindre caractère électrodonneur d'un substituant placé en position *méta* ne peut à lui seul expliquer les caractéristiques de ces composés (Figure 15). Pour comprendre le comportement de ces dérivés, moins étudiés dans la littérature, il faut peut-être le rapprocher de celui des dérivés en *ortho* : décalage vers le bleu des bandes et diminution des ratios (94). Dans ce cas, d'autres phénomènes devraient être envisagés : les groupements électrodonneurs en *ortho* voire en *méta* pourraient ainsi conduire paradoxalement à une diminution de la densité électronique au niveau des carbones des ponts méthènes, contrairement aux dérivés de la série *para*.

2 > Ionisation

Dans le système solvant utilisé pour l'étude spectroscopique précédente, les TPP se présentent sous une forme H_2TPP , forme pour laquelle deux des quatre azotes portent un hydrogène. En milieu acide, les deux azotes non protonés sont susceptibles de fixer chacun un proton pour donner l'espèce diprotonée H_4TPP^{2+} (Figure 16). L'étude d'ionisation présentée ici est centrée sur cette diprotonation des azotes tétrapyrroliques (caractère basique), étude complétée d'une approche de la déprotonation des hydroxyles phénoliques (caractère acide). En effet, seul le premier équilibre concerne l'ensemble des dérivés étudiés, le second ne concernant que les quatre dérivés hydroxylés ($TPP(mOH)_3$, $TPP(mOH)_4$, $TPP(pOH)_3$, $TPP(pOH)_4$). De plus, la protonation des azotes des TPP est très particulière, puisqu'elle s'accompagne d'une déformation du tétrapyrrole, quasi-plan dans le cas de la forme H_2TPP . Cette déformation, résultat combiné de l'encombrement stérique et de la répulsion électrostatique, facilite l'accès pour un autre proton au doublet libre du second azote de type imine (95).

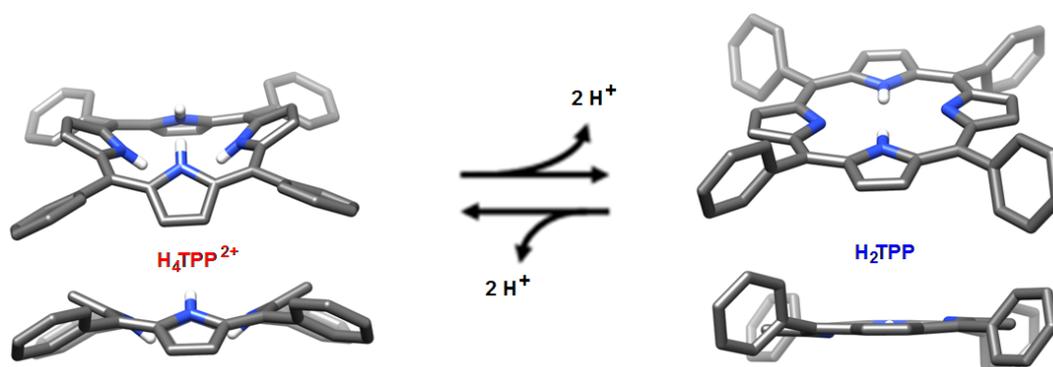


Figure 16 - Equilibre de diprotonation des TPP

Structures issues de la *Cambridge Structural Database* : MOLFEZ pour la H_2TPP et ASUNAD pour la H_4TPP^{2+} .

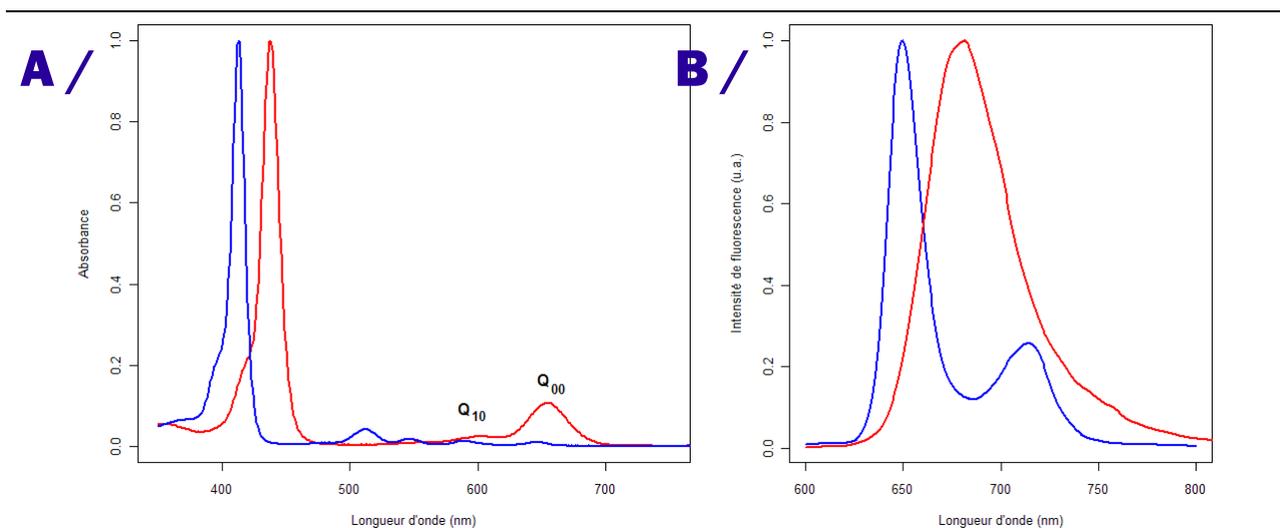


Figure 17 - Effet de la diprotonation sur les spectroscopies électroniques de la TPP non substituée

A / Spectres d'absorption ; B / Spectres de fluorescence. Formes H₂TPP en bleu et H₄TPP²⁺ en rouge

La fixation de protons sur les deux azotes de type imine modifie radicalement le spectre d'absorption des TPP. La bande de Soret est décalée vers des longueurs d'onde supérieures par rapport à la forme H₂TPP et, dans le visible, les quatre bandes de la forme non protonée se réduisent à deux bandes, notées Q₀₀ et Q₁₀, la seconde ne constituant parfois qu'un épaulement de la première (Figure 17). La diprotonation conduit donc à une simplification spectrale, phénomène également constaté en fluorescence, puisque le spectre d'émission ne présente plus qu'une bande au lieu de deux pour la forme H₂TPP (96). Cette simplification spectrale a été initialement attribuée à une augmentation de symétrie sous l'effet de la diprotonation (94). Les calculs d'orbitales moléculaires des TPP réalisés notamment par Vitasovic *et al.* ont montré que, au-delà d'une simple augmentation de symétrie, le changement de conformation est également impliqué dans les modifications spectrales sous l'effet de la diprotonation (97). En effet, si les pyrroles sont moins coplanaires suite à la diprotonation, ce n'est pas le cas des phényles en position *méso* (95), qui sont plus impliqués dans les orbitales moléculaires (97). Ce changement de conformation augmente l'énergie de l'orbitale HOMO, réduisant ainsi l'écart avec l'orbitale LUMO. Ceci explique le décalage vers le rouge des bandes et l'intense absorption dans le rouge (97-100). Le changement de conformation dû à la diprotonation est aussi impliqué dans l'élargissement des bandes (101).

Malgré la différence de spectres entre les formes non protonée et diprotonée, la détermination de constantes d'ionisation se heurte à l'impossibilité d'attribuer aisément un spectre à la forme monoprotinée H₃TPP⁺. En effet, les deux monoprotinés successives se produisent sur un très faible intervalle de pH, ce qui empêche d'objectiver la forme intermédiaire au cours

d'une étude spectrophotométrique. Sa présence ne peut être déduite qu'à partir de l'absence de point isobestique (102; 103). Cette difficulté, largement décrite dans la littérature, constitue un obstacle à la détermination classique de constantes d'ionisation par une méthode univariée. Cette détermination de pK est précédée d'une analyse de la spectroscopie des TPP sous forme diprotonée.

2.1 > Matériel & Méthodes

2.1.1 > Produits chimiques & matériel utilisés

La TPP et la TPP(ρ OH)₄ proviennent de Sigma-Aldrich® (Allemagne), la TPP(m OH)₄ de Frontier Scientific® (USA). Tous les autres dérivés de la TPP ont été synthétisés à l'Institut Curie (UMR 176 CNRS) par l'équipe du Dr Philippe Maillard selon des protocoles publiés par ailleurs (31; 33; 41; 84). L'hydroxyde de potassium, l'acide citrique monohydraté, l'acide orthoborique et le méthanol proviennent des laboratoires Prolabo® (France). L'acide chlorhydrique est fourni par VWR® (Allemagne) et le chlorure de potassium par Merck® (Allemagne). Tous les produits sont de qualité analytique ou supérieure. L'eau ultrapure est obtenue avec l'appareil Alpha-Q (Millipore®, France). Les spectres d'absorption ont été enregistrés avec le spectrophotomètre UV – Visible Varian® Cary Bio 100 (Australie), les spectres de fluorescence avec le spectrofluorimètre Perkin-Elmer® LS 50B. Les pH ont été mesurés avec un pH-mètre Metrohm® 691.

2.1.2 > Enregistrement des spectres

Spectroscopie des formes diprotonées

Les solutions-mères méthanoliques de TPP sont diluées dans des mélange méthanol – acide chlorhydrique (proportion finale 99:1 (v/v)) de telle sorte que l'absorbance soit de l'ordre de 1 au niveau de la bande de Soret. Les spectres d'absorption sont enregistrés de 350 à 800 nm (fentes de 2,5 nm et trajet optique de 10 mm). Les spectres de fluorescence sont enregistrés entre 550 et 850 nm sur des solutions moins concentrées (absorbance inférieure à 0,1 au niveau de la bande de Soret), à trois longueurs d'onde d'excitation différentes (440, 445 et 450 nm). Les fentes d'excitation et d'émission sont toutes les deux réglées sur 2,5 nm. La cuve utilisée mesure 10 mm de côté. Pour le calcul du rendement de fluorescence, la TPPH₂ a été prise comme référence. Le rendement absolu de ce composé en milieu acide est déterminé par comparaison avec sa valeur en milieu neutre (pour cette comparaison uniquement, les longueurs d'onde d'excitation sont de 415, 420 et 425 nm).

2 > Ionisation

Détermination des constantes d'ionisation

Les solutions-mères de TPP sont diluées dans le méthanol et mélangées avec des solutions aqueuses de différents pH dans un ratio de 50:50 (v/v). Les solutions aqueuses sont des tampons citrate 0,02 M pour les pH variant de 2 à 7 et des tampons borate 0,02 M pour les pH variant de 7 à 12. Les pH extrêmes (inférieurs à 2 et supérieurs à 12) ont été obtenus à l'aide de dilutions d'acide chlorhydrique ou d'hydroxyde de potassium. La force ionique est fixée à 0,15 M avec du chlorure de potassium (104). La concentration finale en TPP dans le mélange hydrométhanolique est de 3 μ M. Les pH mesurés sur ces mélanges hydrométhanoliques sont corrigés à l'aide de courbes de calibration établies par comparaison des valeurs de pH obtenues pour un acide fort (acide chlorhydrique) ou une base forte (hydroxyde de potassium) dans l'eau et dans le mélange méthanol – eau 50:50 (v/v) (105; 106). Les spectres UV – Visible sont enregistrés de 350 à 750 nm (fentes de 2 nm, trajet optique de 10 mm) sur des solutions thermostatées à 25°C.

Enregistrement des matrices excitation-émission

La solution-mère de TPP($pO\beta$ GluOH)₄ est diluée dans le méthanol et mélangée avec des solutions aqueuses de différents pH dans un ratio de 50:50 (v/v). Les solutions aqueuses sont soit des tampons préparés par mélange d'une solution alcaline (mélange d'acide citrique, d'acide phosphorique, d'acide orthoborique et d'hydroxyde de sodium) et d'une solution d'acide chlorhydrique (pour les pH compris entre 2 et 7), soit une solution d'acide chlorhydrique (solution de pH 1). Les pH mesurés sur ces mélanges hydrométhanoliques ont été corrigés à l'aide de courbes de calibration établies comme décrit dans le paragraphe précédent. Les matrices excitation-émission sont formées de 21 spectres d'émission enregistrés entre 600 et 800 nm pour des longueurs d'onde d'excitation variant de 410 à 450 nm. (fentes de 2 nm, trajet optique de 10 mm).

Traitement des données

Le traitement des données par MCR-ALS (*Multivariate Curve Resolution – Alternating Least Squares*) a été réalisé à l'aide du logiciel R (87), en se basant sur la méthode de Diewok *et al.* (107). L'optimisation est basée sur l'algorithme *als* issu du package ALS (108).

2.1.3 > Prédiction *in silico*

2.1.3.1 > *Prédiction à l'aide de Marvin*

Marvin Calculator Plugin (Chem Axon) (109) est un outil largement répandu, notamment pour la prédiction de constantes d'ionisation, application pour laquelle ce logiciel est un des plus

fiables (110). Les constantes macroscopiques obtenues sont obtenues à partir d'un calcul de constantes microscopiques, déterminées en prenant en considération les modifications des charges partielles et de la polarisabilité induites par la protonation et des spécificités structurales (liaisons hydrogène et contraintes stériques) (109).

2.1.3.2 > Prédiction à l'aide des indices ET-State

2.1.3.2.1 >Principe du calcul des indices ET-State

La valeur numérique de l'indice ET-State est calculée pour chaque atome d'une molécule. Elle encode des informations à la fois sur l'environnement topologique de l'atome en question et sur les interactions électroniques dues à tous les autres atomes de la molécule. L'aspect topologique est basé sur la distance entre atomes dans la structure développée. L'aspect électronique est basé sur l'état intrinsèque, affecté par les perturbations dues aux différences d'état intrinsèque entre les atomes de la molécule.

Etat intrinsèque

Une valeur d'état intrinsèque, I_i , est attribuée à chaque atome ou groupe du squelette de la manière suivante :

$$I_i = \frac{(2/N)^2 \times \delta^v + 1}{\delta} \quad \text{(Equation 2)}$$

où N est le nombre quantique principal, δ^v et δ sont des indices de connectivité moléculaire, obtenus ainsi :

$$\delta = \sigma - h = \text{nombre de connections dans le squelette} \quad \text{(Equation 3)}$$

où σ est le nombre d'électrons dans les orbitales σ ; h est le nombre d'atomes d'hydrogène liés à l'atome

$$\delta^v = Z^v - h = \sigma + \pi + n - h \quad \text{(Equation 4)}$$

où Z^v est le nombre d'électrons de valence, π est le nombre d'électrons dans les orbitales π , et n est le nombre d'électrons dans des doublets libres. La différence entre les deux valeurs ($\delta^v - \delta$) est égale à la somme des nombres d'électrons π et d'électrons présents dans les doublets libres. La valeur de l'état intrinsèque est donc élevée pour les atomes électronégatifs (notamment pour ceux possédant peu de connections dans la représentation semi-développée), et est plus faible pour les atomes moins électronégatifs et pour les atomes avec plusieurs liaisons σ .

2 > Ionisation

Perturbation

La perturbation sur un atome i , résultant de la présence de tous les autres atomes j , est une fonction de la différence entre les états intrinsèques des atomes $I_i - I_j$. La perturbation est diminuée par l'éloignement. L'expression de cette diminution dans la fonction est définie par le carré du nombre d'atomes composant le chemin le plus court entre les deux atomes plus un. Les perturbations sont additionnées sur l'ensemble de la molécule :

$$\Delta I_i = \sum \frac{(I_i - I_j)}{r_{ij}^2} \quad \text{(Equation 5)}$$

où r_{ij} est la distance entre les atomes sur le squelette plus un.

Indices ET-State par type d'atome

L'état électrotopologique, appelé E-State, de l'atome i , noté S_i , est la somme de l'état intrinsèque et des perturbations.

$$S_i = I_i + \Delta I_i \quad \text{(Equation 6)}$$

Une fois les indices calculés pour chaque atome, les indices correspondant à un même type d'atome sont additionnés. Un type d'atome est défini par l'élément, sa valence, le nombre de liaisons dans lequel il est engagé et le nombre d'hydrogènes auxquels il est lié.

2.1.3.2.2 > Calcul du modèle

Une régression linéaire multiple est calculée entre chacune des deux étapes de protonation et les prédicteurs, en l'occurrence les moyennes des indices ET-State par type d'atome calculés à l'aide du serveur *PClient* (111; 112). Les formes H_4TPP^{2+} et H_2TPP de chacun des dérivés de TPP ont été codés au format SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry Specification*) à l'aide du logiciel *ChemDraw Ultra*[®] (113). Les régressions sont calculées à l'aide du logiciel R (87) (fonction *lm*). Une série de procédures de tests a été réalisée afin de valider le modèle : normalité et homoscedasticité des résidus ont été testés graphiquement (114) et l'absence d'hétéroscedasticité a été vérifiée par le test de Breusch et Pagan (115; 116). Le test de Bonferroni a été utilisé pour rechercher les valeurs aberrantes (117). Les valeurs influentes ont été recherchés à l'aide des graphiques de Williams des résidus standardisés en fonction des *leverages* (« force de levier ») (118). Une validation croisée à k -passes (*k-fold*) a été réalisée et les *LMO* (*Leave Many Out*) Q^2 ont été calculés (119; 120). Un test de type *Y-scrambling* a été utilisé afin de permuter aléatoirement les données et les valeurs de R^2 et Q^2 obtenues pour 1 000 000 de permutations aléatoires ont été comparées aux valeurs de R^2 et Q^2 du modèle (121).

2.2 > Protonation des azotes tétrapyrroliques

2.2.1 > Spectroscopie électronique des formes diprotonées*Spectroscopie d'absorption*

Par rapport à l'étude dans le milieu méthanol – diméthylformamide, l'étude dans le mélange méthanol – acide chlorhydrique montre une bien plus grande sensibilité des spectres à la substitution. Ainsi, si la bande de Soret dans le milieu méthanol – diméthylformamide peut se situer à des longueurs d'onde variant de 413 à 418 nm selon les composés, sa longueur d'onde peut varier de 438 à 452 nm pour les mêmes composés dans le mélange méthanol – acide

Composé	Absorption		Fluorescence	
	Soret	Q ₀₀	Longueur d'onde	Rendement
TPP	438	655	681	0,117 ± 0,011
TPP(mOH) ₃	445	657	685	0,048 ± 0,004
TPP(mOH) ₄	447	658	688	0,038 ± 0,003
TPP(mOβGluOH) ₁	439	656	683	0,137 ± 0,026
TPP(mOβGluOH) ₂ 5-10	442	656	683	0,113 ± 0,020
TPP(mOβGluOH) ₂ 5-15	442	658	682	0,131 ± 0,030
TPP(mOβGluOH) ₃	444	657	684	0,112 ± 0,009
TPP(mOβGluOH) ₄	446	660	684	0,111 ± 0,013
TPP(pOH) ₃	451	688	727	0,057 ± 0,008
TPP(pOH) ₄	452	699	735	0,040 ± 0,005
TPP(pOβGluOH) ₁	442	662	690	0,118 ± 0,020
TPP(pOβGluOH) ₂ 5-10	445	669	702	0,118 ± 0,021
TPP(pOβGluOH) ₂ 5-15	448	679	706	0,088 ± 0,012
TPP(pOβGalOH) ₃	447	675	710	0,084 ± 0,012
TPP(pOβGalOH) ₄	449	682	715	0,095 ± 0,015
TPP(pOβGluOH) ₄	449	681	715	0,099 ± 0,016
TPP(pOMEGOαLFucOH) ₃	450	681	715	0,073 ± 0,009
TPP(pOMEGOαDFucOH) ₃	450	682	716	0,080 ± 0,012
TPP(pOMEGOαManOH) ₃	450	679	718	0,058 ± 0,007
TPP(pODEGOβGalOH) ₃	450	682	715	0,073 ± 0,011
TPP(pODEGOβGluOH) ₃	450	680	716	0,069 ± 0,009
TPP(pODEGOαManOH) ₃	450	682	722	0,069 ± 0,009
TPP(pO(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	451	682	720	0,069 ± 0,010
TPP[p-dendr(DEGOH) ₃]	439	656	683	0,138 ± 0,034
TPP[p-dendr(DEGOαManOH) ₃]	439	657	682	0,135 ± 0,027
TPP[p-dendr(MEGOαManOH) ₃]	439	655	680	0,126 ± 0,023

Tableau 4 - Propriétés spectroscopiques dans le mélange méthanol – HCl 99 / 1 (v/v)

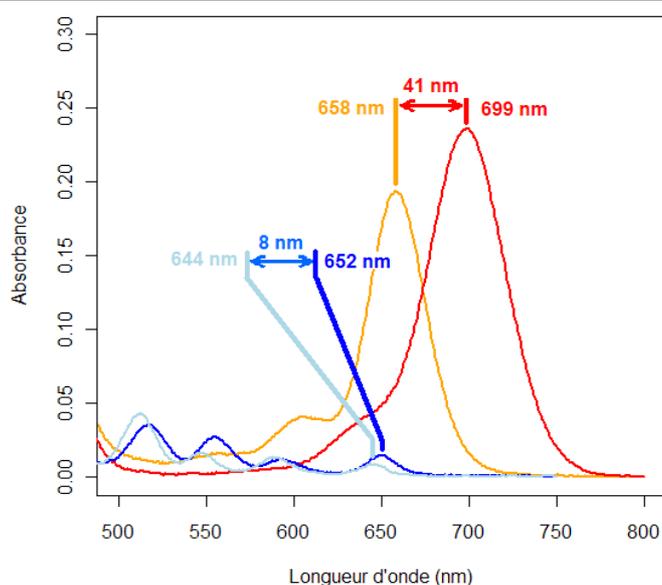


Figure 18 - **Exacerbation des effets de substitution à pH acide**

Les spectres des différentes formes ont été ajustés à 1 au niveau de la bande de Soret.

TPP(*m*OH)₄ : forme H₂TPP en **bleu clair** et H₄TPP²⁺ en **orange**

TPP(*p*OH)₄ : forme H₂TPP en **bleu** et H₄TPP²⁺ en **rouge**

chlorhydrique (Tableau 4). Une observation similaire peut être faite en ce qui concerne la bande Q_{x00} et la bande correspondante du spectre de la forme diprotonée, à savoir la bande Q₀₀. Si l'on considère la TPP(*p*OH)₄ et son isomère de la série *mé*ta, l'amplitude de l'intervalle de longueur d'onde observé à pH neutre (de 644 à 652 nm, soit 8 nm) augmente considérablement à pH acide (longueurs d'onde variant de 658 à 699 nm, soit une amplitude de 41 nm) (Figure 18). Ces résultats montrent que les différences spectrales dues à la structure augmentent fortement suite à la protonation des deux azotes. Autrement dit, l'effet du substituant est plus important à pH acide qu'à pH neutre. L'exacerbation des effets de substitution par diprotonation peut être expliquée à partir des résultats de cristallographie évoqués précédemment : les distorsions du tétrapyrrole dans la forme diprotonée conduisent à une diminution de l'angle entre le phényle et le macrocycle et donc à une augmentation de la conjugaison entre les phényles et le macrocycle. Les effets des modifications de substitution deviennent donc plus intenses qu'avec la forme non protonée.

Spectroscopie de fluorescence

En fluorescence, les formes H₄TPP²⁺ présentent une seule bande, à une longueur d'onde très dépendante de la substitution, à l'image de l'absorption. Ainsi, les longueurs d'onde des maxima des bandes varient de 680 nm (pour la TPP[*p*-*dendr*(MEGOαManOH)₃]) à 735 nm (pour la TPP(*p*OH)₄). Le rendement de fluorescence de la TPP non substituée est plus élevée sous forme H₄TPP²⁺ que sous forme H₂TPP. Les différentes substitutions affectent peu le rendement de

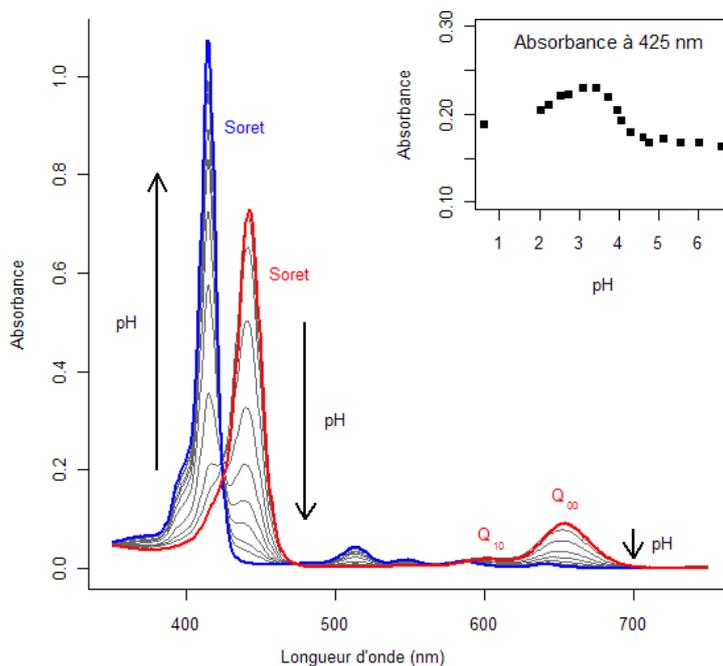


Figure 19 - Spectres enregistrés de pH 0,6 à 6,6

Exemple de la TPP(*mO*βGluOH)₄ ; spectre à pH 0,6 en rouge ; spectre à pH 6,6 en bleu

fluorescence, à l'exception de l'hydroxylation, qui induit une nette diminution du rendement de fluorescence.

2.2.2 > Élucidation de la diprotonation par MCR-ALS

La sensibilité de la spectroscopie à l'état de protonation du tétrapyrrole permet d'envisager son application au suivi de la diprotonation des dérivés de TPP. La spectroscopie d'absorption a été privilégiée pour la détermination de constantes d'ionisation et pour l'établissement de la relation structure – basicité. La spectroscopie de fluorescence a été utilisée sur un seul composé, la TPP(*pO*βGluOH)₄, dans le but de connaître l'allure du spectre de la H₃TPP⁺.

Un exemple de spectres d'absorption enregistrés pour un dérivé de TPP est présenté sur la figure 19. Cet exemple concerne la TPP(*mO*βGluOH)₄ pour un intervalle de pH compris entre 0,6 et 6,6. A pH neutre, la bande de Soret étroite et intense accompagnée des quatre bandes Q de plus faible intensité est caractéristique de la forme H₂TPP. En milieu acide, la bande de Soret est décalée vers le rouge tandis que le nombre de bandes Q est réduit à deux. Malgré l'intersection des bandes de Soret des deux formes H₂TPP et H₄TPP²⁺ à 425 nm, il n'y pas de point

2 > Ionisation

isobestique à cette longueur d'onde (voir insert de la figure 19). Cette variation d'absorbance à 425 nm témoigne de la présence d'une troisième espèce dans le mélange à des pH intermédiaires, la forme monoprotinée H_3TPP^+ .

2.2.2.1 > Présentation de la MCR-ALS

La difficile mise en évidence expérimentale de l'espèce intermédiaire renforce l'intérêt des méthodes multivariées, telles que la MCR-ALS, pour la détermination des constantes d'ionisation. En effet, dans ce cas, l'analyse univariée atteint ses limites (122). C'est pourquoi la plupart des études basées sur cette dernière approche se limitèrent à la détermination d'une constante d'ionisation globale et si le calcul était répété indépendamment à d'autres longueurs d'onde, plusieurs constantes globales significativement différentes étaient obtenues (123). Gensch *et al.* ont proposé une méthode exploitant les données sur un intervalle de longueurs d'onde plus large (124). Assimilant le spectre inconnu de la forme H_3TPP^+ à une somme de trois courbes gaussiennes, il était possible, par régression non-linéaire, de déterminer les paramètres (intensité, largeur à mi-hauteur et position) de ces trois bandes. Cette estimation permettait le calcul, dans un second temps, d'un profil de concentrations, duquel étaient extraites les valeurs des constantes d'ionisation. Cette méthode présente cependant deux inconvénients, une contrainte gaussienne excessive sur la forme du spectre et la restriction de l'étude à une seule portion du spectre UV-visible, en l'occurrence la région de la bande de Soret. Ces limites peuvent potentiellement être contournées en utilisant une méthode telle que la MCR-ALS. En effet, cette méthode a été élaborée pour ce genre de problématique, c'est-à-dire extraire de l'information concernant des espèces chimiques pures à partir d'enregistrements réalisés sur des mélanges comportant plusieurs espèces (125). La MCR-ALS a démontré son efficacité dans différentes applications (108; 126-129), incluant la détermination de constantes d'ionisation (130; 131).

La MCR-ALS consiste en la décomposition de la matrice D contenant les données expérimentales (les spectres d'absorption UV-Visible à différents pH pour un même composé dans notre cas) en un produit de deux matrices : 1) une matrice C contenant le profil de concentrations en fonction du pH des espèces chimiques pures, 2) une matrice S contenant leur spectre UV-Visible.

$$D=C.S^T+E \quad (\text{Equation 7})$$

La matrice E représente la différence entre les valeurs expérimentales et les données reproduites par le modèle, c'est-à-dire les résidus. Le calcul itératif consiste en une amélioration d'estimations initiales, par l'optimisation alternative des matrices C et S.

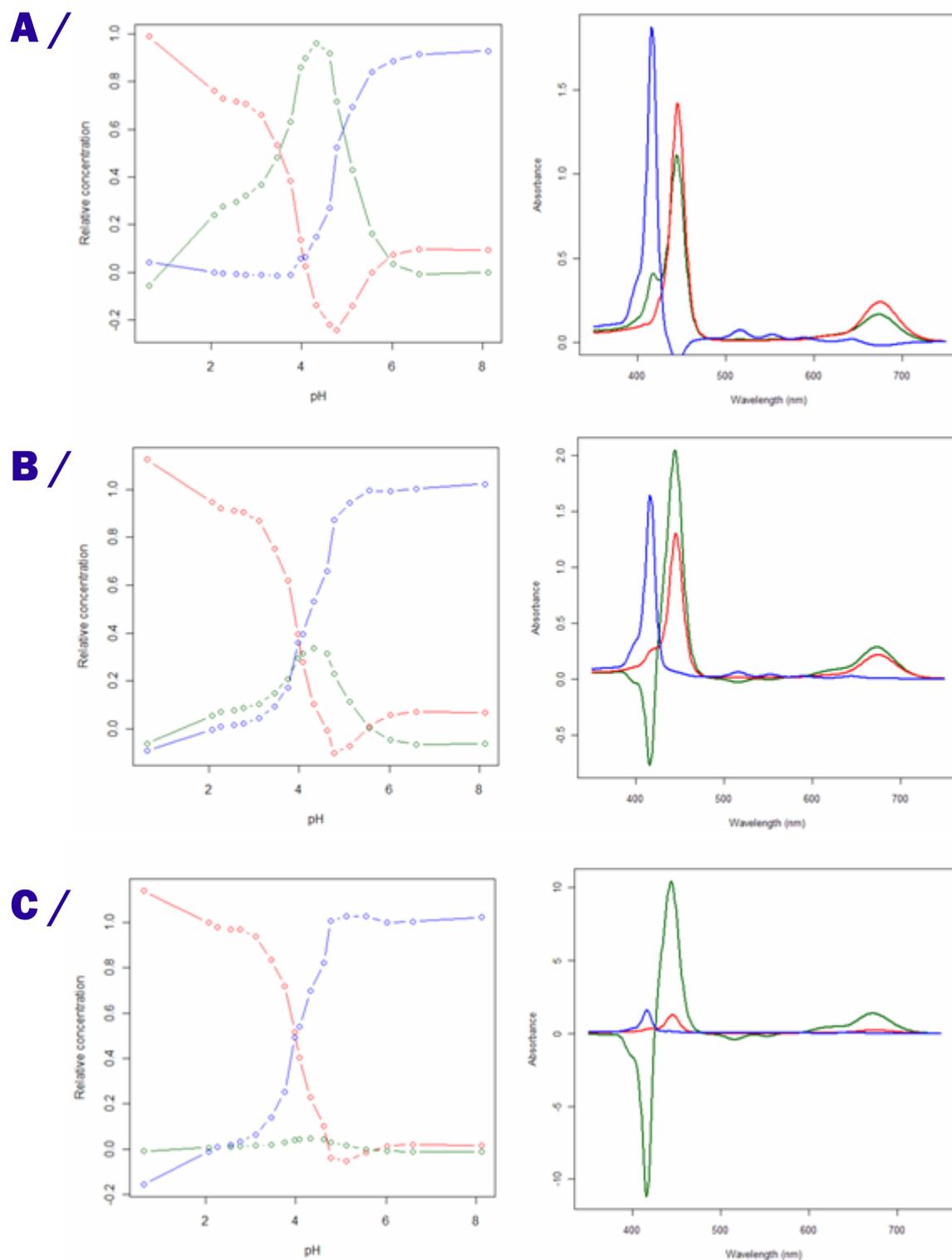


Figure 20 - MCR-ALS sans contraintes : illustration de l'ambiguïté rotationnelle

valeurs initiales de la matrice C correspondant aux couples de pK suivants : **A** / $pK_1 = 5$; $pK_2 = 3$; **B** / $pK_1 = 4$; $pK_2 = 4$; **C** / $pK_1 = 3$;

$pK_2 = 5$; dans les trois cas, lack of fit égal à 0,85 %

Forme H_4TPP^{2+} en rouge ; forme H_3TPP^+ en vert ; forme H_2TPP en bleu

2 > Ionisation

Importance des estimations initiales des paramètres

La principale limite de la MCR-ALS est qu'il existe plusieurs couples de matrices C et S permettant un ajustement des données de même qualité. Cet inconvénient, baptisé ambiguïté rotationnelle (132; 133), se traduit par la relation suivante :

$$D^* = C \cdot S^T = C \cdot T^{-1} \cdot T \cdot S^T = C_{\text{new}} \cdot S_{\text{new}}^T \quad \text{(Equation 8)}$$

où D^* est la matrice initiale des données reproduite par analyse en composantes principales pour un nombre de composantes correspondant au nombre d'espèces dans le mélange et où les matrices C_{new} et S_{new} représentent une solution alternative aux matrices C et S. La matrice de rotation T n'est pas unique et conduit donc à un intervalle de solutions équivalentes, intervalle dépendant de l'intervalle des matrices de rotation [T_{min} : T_{max}] (Figure 20). Cet intervalle peut cependant être réduit par le recours à des contraintes (125). Différentes contraintes sont classiquement employées pour les deux matrices : non-négativité, uni-modalité. Une contrainte habituelle est spécifique de la matrice C, il s'agit de la conservation de la matière. Ces contraintes représentent une traduction mathématique d'une connaissance *a priori* du système étudié.

Insertion des contraintes dans l'optimisation

Dans le cas de la diprotonation des TPP, aucune contrainte autre que la non-négativité ne peut s'appliquer aux spectres des différentes formes. En revanche, il est possible de forcer les profils de concentrations à suivre les équations classiques décrivant une diprotonation :

$$K_1 = \frac{(H_3O^+)(H_2TPP)}{(H_3TPP^+)} \quad \text{(Equation 9)}$$

$$K_2 = \frac{(H_3O^+)(H_3TPP^+)}{(H_4TPP^{2+})} \quad \text{(Equation 10)}$$

Inclure un modèle physico-chimique doit permettre de restreindre l'intervalle de solutions à une solution unique (107). Le nombre de colonnes des matrices C et S est égal au nombre de composants dans le mélange, c'est-à-dire les trois états de protonation du macrocycle porphyrine : forme non protonée (H_2TPP), forme monoprotée (H_3TPP^+) et forme diprotée (H_4TPP^{2+}). En théorie, les deux azotes de type imine ne sont pas identiques, et deux formes monoprotées différentes devraient être prises en compte. Cependant, les hydrogènes portés par les azotes pouvant s'échanger d'un azote à l'autre (134), une seule forme monoprotée peut être prise en considération. Les deux constantes d'ionisation considérées ici sont donc des constantes macroscopiques et ne doivent pas être confondues avec les quatre constantes microscopiques régissant les deux protonations successives des deux sites. En d'autres termes, chaque valeur de pK ne saurait être attribuée à un atome d'azote en particulier (135).

Une estimation initiale des concentrations des formes H_2TPP et H_4TPP^{2+} est calculée sur la base des absorbances à la longueur d'onde de la bande de Soret caractéristique de chacune de ces formes. La proportion de H_3TPP^+ à chaque pH est estimée à partir de la loi de conservation de la matière (la somme de chaque ligne de la matrice de concentrations est égale à un). Le profil de concentrations est alors recalculé à partir des valeurs de pK_1 et pK_2 résultant d'une régression non-linéaire des profils de distribution de la matrice C à partir des équations suivantes :

$$(H_4TPP^{2+}) = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_2} + 10^{2 \times pH - pK_2 - pK_1}} \quad \text{(Equation 11)}$$

$$(H_3TPP^+) = \frac{1}{1 + 10^{pH - pK_1} + 10^{pK_2 - pH}} \quad \text{(Equation 12)}$$

$$(H_2TPP) = \frac{1}{1 + 10^{pK_1 - pH} + 10^{pK_1 + pK_2 - 2 \times pH}} \quad \text{(Equation 13)}$$

Le calcul itératif consiste en deux étapes successives d'optimisation des matrices C et S^T selon les relations suivantes :

$$S^T = (C)^+ D^* \quad \text{(Equation 14)}$$

$$C = D^* (S^T)^+ \quad \text{(Equation 15)}$$

où $(C)^+$ et $(S^T)^+$ sont les pseudo-inverses des matrices C et S^T . Le calcul itératif de S^T et C est soumis à une contrainte de non-négativité. Dans l'algorithme, après chaque optimisation de la matrice C, la matrice de concentrations est ajustée pour suivre les relations 11 à 13. Le profil de concentrations ajusté est utilisé pour l'optimisation suivante de la matrice S. Le calcul se poursuit tant que les nouvelles itérations permettent de réduire les résidus. Les valeurs de pK sont déterminées à partir des équations 11 à 13. Le *lack of fit* (erreur d'ajustement) (136) est calculé selon la relation suivante :

$$\text{lof} = 100 \times \sqrt{\frac{\sum_{i,j} e_{ij}^2}{\sum_{i,j} d_{ij}^2}} \quad \text{(Equation 16)}$$

où d_{ij} est un élément de la matrice de données initiales D et e_{ij} le résidu correspondant.

Application au cas particulier des matrices excitation-émission

Dans le cas de la résolution des matrices excitation-émission, la matrice enregistrée à chaque pH comporte 401 lignes et 21 colonnes, correspondant respectivement aux 401 mesures de fluorescence du spectre d'émission et aux 21 longueurs d'onde d'excitation différentes. Cette

2 > Ionisation

matrice est convertie en un vecteur de longueur 8421 (401 x 21) par concaténation des 21 spectres d'émission. La répétition de cette opération pour les 14 pH à laquelle une matrice a été enregistrée permet d'obtenir 14 vecteurs, qui formeront la matrice de données. Le calcul par MCR-ALS selon la même méthode que celle décrite ci-dessus permet d'obtenir la matrice des concentrations des trois espèces et une matrice comportant 8421 lignes et 3 colonnes. Chaque colonne de cette matrice contient donc un vecteur constitué d'une concaténation des 21 spectres d'émission de ce composé enregistrés aux 21 longueurs d'onde. Le calcul des spectres d'excitation et d'émission de chaque espèce est reconstitué à partir de la matrice excitation-émission en réalisant une seconde étape de MCR-ALS. Cette seconde MCR-ALS suit la procédure simple, sans autre contrainte que la non-négativité des deux matrices. La seule différence est qu'une seule espèce est prise en compte et que les données sont interprétées comme le produit de deux matrices de spectres et non d'une matrice de concentrations et d'une matrice de spectres.

2.2.2.2 > *Caractéristiques de la forme monoprotinée*

L'utilisation de l'algorithme de MCR-ALS permet d'extraire, à partir des données d'absorption, à la fois les profils des spectres et des concentrations des composants du mélange. Pour cinq composés, l'élucidation n'a pas été possible dans les conditions expérimentales choisies, en raison d'une agrégation soit de la forme H_4TPP^{2+} (cas de la $TPP(mO\beta GluOH)_1$), soit de la forme H_2TPP (cas des trois dendrimères et de la TPP non substituée). Pour les autres composés, les valeurs de *lack of fit* (comprises entre 1,5 et 3,3 %) montrent que la décomposition en trois composants permet de reproduire correctement la matrice de données originelle (Tableau 5). La figure 21 présente un exemple de spectres d'absorption optimisés et de distribution des espèces pour deux dérivés, la $TPP(mO\beta GluOH)_4$ et la $TPP(pOH)_3$. Les résultats de l'application de l'algorithme aux matrices excitation-émission sont présentés sur la figure 22.

2.2.2.2.1 > *Spectres de la forme monoprotinée optimisés par MCR-ALS*

Spectres d'absorption

La matrice S contient les spectres des trois espèces, H_4TPP^{2+} , H_3TPP^+ et H_2TPP . Les spectres optimisés des formes H_4TPP^{2+} et H_2TPP présentent les caractéristiques classiques décrites précédemment. Quelle que soit la substitution du macrocycle, les bandes de Soret des formes H_3TPP^+ sont presque identiques à celles des formes H_4TPP^{2+} . La bande présente seulement un léger décalage vers le bleu et une légère diminution d'intensité dans le cas de la forme H_3TPP^+ (Tableau 5, Figure 21). Le recouvrement des spectres des formes H_3TPP^+ et H_4TPP^{2+} augmente la difficulté d'identifier la forme intermédiaire au cours du suivi spectrophotométrique d'un titrage, comme cela a déjà été suggéré par Pasternack *et al.* dans le

Composé	Constantes		Iof (%)	Propriétés spectrales		
	pK ₂	pK ₁		H ₂ TPP	H ₃ TPP ⁺	H ₄ TPP ²⁺
TPP	-	-	-	-	-	-
TPP(mOH) ₃	3,2 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,3 ± 0,2	414 (1)	438 (0,56)	440 (0,56)
TPP(mOH) ₄	3,3 ± 0,3	3,7 ± 0,1	2,7 ± 0,6	414 (1)	439 (0,50)	443 (0,52)
TPP(mOβGluOH) ₁	-	-	-	-	-	-
TPP(mOβGluOH) ₂ 5-10	3,2 ± 0,2	3,5 ± 0,1	2,4 ± 0,3	414 (1)	436 (0,71)	438 (0,80)
TPP(mOβGluOH) ₂ 5-15	3,2 ± 0,1	3,5 ± 0,1	2,3 ± 0,3	414 (1)	436 (0,65)	438 (0,75)
TPP(mOβGluOH) ₃	3,3 ± 0,1	3,7 ± 0,1	3,0 ± 0,7	414 (1)	438 (0,65)	440 (0,73)
TPP(mOβGluOH) ₄	3,5 ± 0,2	3,6 ± 0,1	2,8 ± 0,2	414 (1)	439 (0,61)	442 (0,69)
TPP(pOH) ₃	4,3 ± 0,1	4,8 ± 0,1	2,0 ± 0,4	417 (1)	444 (0,54)	447 (0,70)
TPP(pOH) ₄	4,9 ± 0,1	5,1 ± 0,1	1,5 ± 0,7	418 (1)	445 (0,45)	448 (0,64)
TPP(pOβGluOH) ₁	3,3 ± 0,1	3,8 ± 0,1	2,4 ± 0,3	414 (1)	437 (0,72)	438 (0,82)
TPP(pOβGluOH) ₂ 5-10	3,8 ± 0,1	3,9 ± 0,1	2,0 ± 0,3	415 (1)	439 (0,62)	441 (0,75)
TPP(pOβGluOH) ₂ 5-15	3,8 ± 0,2	4,3 ± 0,1	2,2 ± 0,5	416 (1)	444 (0,56)	444 (0,73)
TPP(pOβGalOH) ₃	4,3 ± 0,1	4,3 ± 0,1	2,2 ± 0,7	416 (1)	440 (0,50)	444 (0,75)
TPP(pOβGalOH) ₄	4,4 ± 0,1	4,5 ± 0,1	2,1 ± 1,3	416 (1)	442 (0,52)	445 (0,79)
TPP(pOβGluOH) ₄	4,3 ± 0,3	4,4 ± 0,2	2,2 ± 0,9	416 (1)	441 (0,49)	445 (0,82)
TPP(pOMEGOαLFucOH) ₃	4,2	4,3	1,6	416 (1)	444 (0,61)	447 (0,76)
TPP(pOMEGOαDFucOH) ₃	4,3	4,2	1,6	416 (1)	444 (0,70)	447 (0,80)
TPP(pOMEGOαManOH) ₃	4,2	4,4	2,7	416 (1)	444 (0,60)	447 (0,73)
TPP(pODEGOβGalOH) ₃	4,3 ± 0,1	4,5 ± 0,1	2,4 ± 0,1	417 (1)	443 (0,48)	447 (0,75)
TPP(pODEGOβGluOH) ₃	4,3 ± 0,1	4,5 ± 0,1	2,4 ± 0,9	417 (1)	443 (0,51)	447 (0,72)
TPP(pODEGOαManOH) ₃	4,5 ± 0,1	4,5 ± 0,1	1,7 ± 0,2	417 (1)	443 (0,56)	447 (0,73)
TPP(pO(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	4,3	4,4	1,9	417 (1)	446 (0,74)	448 (0,82)
TPP[p-dendr(DEGOH) ₃]	-	-	-	-	-	-
TPP[p-dendr(DEGOαManOH) ₃]	-	-	-	-	-	-
TPP[p-dendr(MEGOαManOH) ₃]	-	-	-	-	-	-

Tableau 5 - Constantes de protonation des azotes & propriétés spectrales des espèces mises en jeu

Entre parenthèses : absorbance au niveau de la bande de Soret par rapport à la forme H₂TPP

Les écart-types mentionnés résultent de trois répétitions des expériences.

cas de la tétra-(4-N méthylpyridyl)porphyrine (137). Les bandes Q de la H₃TPP⁺ présentent également un décalage vers le bleu par rapport à celles de la forme H₄TPP²⁺, mais les différences les plus notables entre les bandes Q de ces deux formes concernent leur intensité relative : l'absorbance de H₃TPP⁺ est plus faible que celle de H₄TPP²⁺ à la longueur d'onde de la bande Q₀₀ mais plus élevée dans la région de la bande Q₁₀.

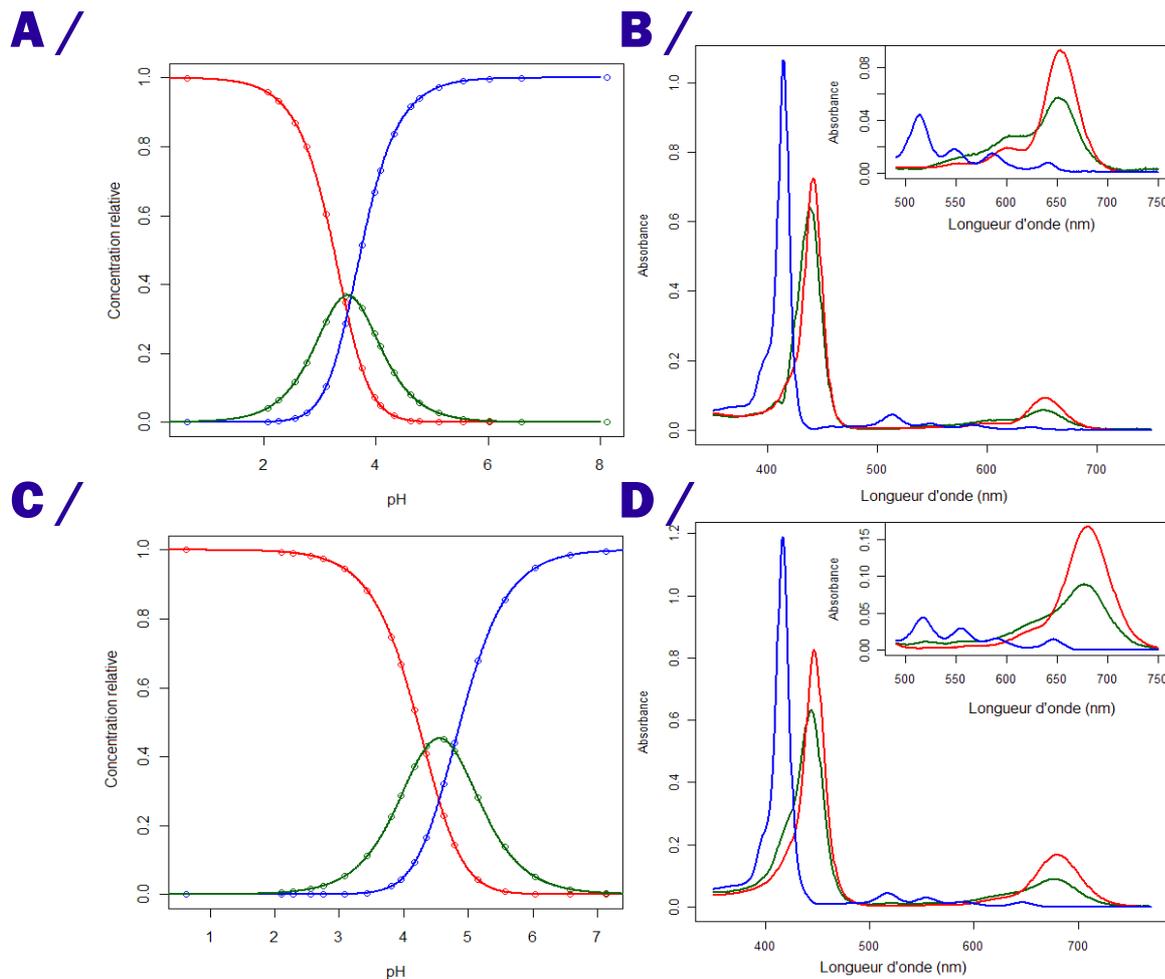


Figure 21 - Résultats de la MCR-ALS

A / Distribution des espèces et **B /** Spectres optimisés de la TPP($mO\beta$ GluOH)₄

C / Distribution des espèces et **D /** Spectres optimisés de la TPP(pOH)₃

Forme H_4TPP^{2+} en rouge ; forme H_3TPP^+ en vert ; forme H_2TPP en bleu

Spectres de fluorescence

Les spectres d'excitation de fluorescence optimisés par MCR-ALS présentent une forme similaire aux spectres d'absorption décrits ci-dessus. En effet, ce spectre présente la même forme que celui de l'espèce H_4TPP^{2+} , se distinguant par un léger décalage vers le bleu. Les spectres d'émission de la H_3TPP^+ présentent également de fortes similitudes avec le spectre de la forme H_4TPP^{2+} , avec une seule large bande. Comme pour les spectres d'absorption ou ceux d'excitation, le spectre d'émission est légèrement décalé vers le bleu. Les résultats de la résolution des matrices excitation-émission sont donc cohérents avec les résultats obtenus en absorption, mais également avec ceux décrits par Gensch *et al.* (124) et De Luca *et al.* (102). Ces auteurs ont proposé deux des rares études de la spectroscopie de fluorescence de la forme monoprotonée

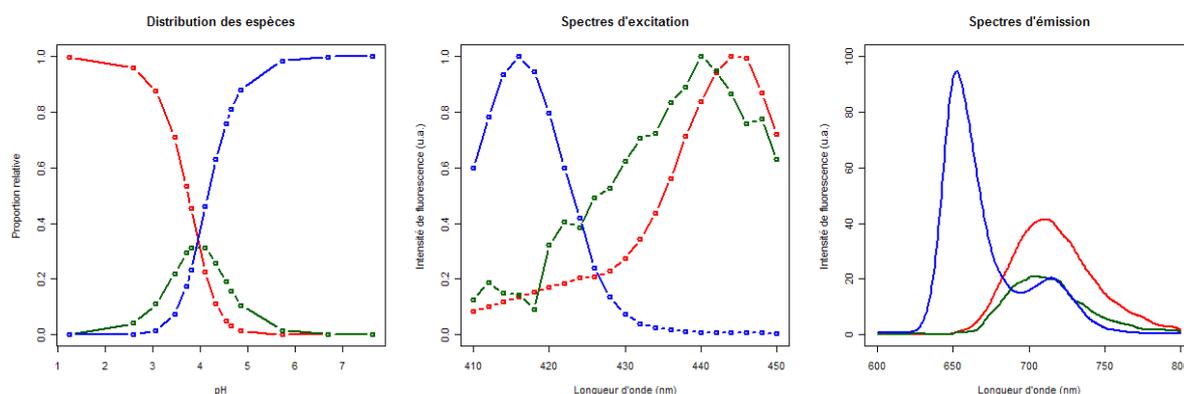


Figure 22 - Résultats de la MCR-ALS sur les matrices excitation – émission pour la TPP($pO\beta GluOH$)₄
 Forme H₄TPP²⁺ en rouge ; forme H₃TPP⁺ en vert ; forme H₂TPP en bleu

d'une TPP.

2.2.2.2.2 >Interprétation du spectre d'absorption de la forme monoprotinée

Dans la littérature, la connaissance des spectres d'absorption des porphyrines monoprotinées se limitait essentiellement à des alkylporphyrines, telles que la N-méthylcoproporphyrine I (138). En ce qui concerne les arylporphyrines, les spectres des formes monoprotinées ont été décrits pour une tétraaryltétracyclohexénoporphyrine (139) ou une dodécaphénylporphyrine (140). Cependant, ces structures présentent des contraintes stériques particulières à la conformation du macrocycle, ce qui est à l'origine d'une forte modification de la basicité (141). A notre connaissance, en ce qui concerne les dérivés coplanaires, mis à part l'étude de Gensch *et al.* (124), des spectres de forme monoprotinée ont été seulement obtenus par De Luca *et al.* (102), une étude qui mérite un intérêt tout particulier puisque les spectres de ces formes monoprotinées n'ont pas été obtenus par des méthodes chimiométriques : la forme monoprotinée a été stabilisée expérimentalement dans le dichlorométhane, à l'aide de contre-ions volumineux tels que le tétrakis[3,5-bis(trifluorométhyl)phényl] borate et son spectre expérimental a été comparé à une approche par modélisation (calculs de type TDDFT – *Time Dependent Density Functional Theory*).

Les spectres de H₃TPP⁺ optimisés par MCR-ALS présentent d'évidentes similitudes avec les spectres décrits par ces auteurs, principalement sa forme proche de celle de la forme diprotinée de la porphyrine correspondante. La bande de Soret étroite et intense des formes H₃TPP⁺ est similaire à celle décrite par Honda *et al.* pour la dodécaphénylporphyrine (140). A première vue, ce résultat peut sembler différent de celui obtenu par De Luca avec un sel de H₃TPP⁺. En réalité, la largeur de la bande de Soret décrite par De Luca *et al.* résulte de la

2 > Ionisation

coexistence de deux conformations de la H_3TPP^+ stabilisée par des contre-ions volumineux. Sur la base des calculs de TDDFT, les auteurs ont conclu que le remplacement du contre-ion par un ion chlorure conduirait à l'existence d'une seule conformation, proche de celle de la forme H_4TPP^{2+} mais avec une distorsion moindre (102). Cette sensibilité du profil spectral à la nature du contre-ion renforce l'intérêt d'une étude par MCR-ALS, qui donne accès aux spectres de la forme H_3TPP^+ dans un milieu dissociant (106). Ainsi, la similitude des spectres obtenues pour les formes H_3TPP^+ et H_4TPP^{2+} par MCR-ALS concorde avec la similitude structurale de ces deux espèces obtenue par De Luca *et al.* par des calculs de TDDFT. La moindre distorsion des formes H_3TPP^+ réduit la conjugaison entre les phényles et les pyrroles, et donc diminue l'énergie de déstabilisation de l'orbitale HOMO. L'augmentation de l'écart entre les orbitales HOMO et LUMO explique le décalage vers le bleu des bandes tandis que la moindre différence entre les orbitales HOMO et HOMO-1 résulte en une diminution d'absorbance (102).

Il faut noter que De Luca *et al.* concluent à l'existence de trois bandes Q pour H_3TPP^+ (102). Ce problème du nombre de bandes Q est en fait assez mineur. En effet, les bandes Q sont des bandes composites, résultant du recouvrement de plusieurs transitions (96). Ainsi, selon le degré de recouvrement, les bandes pourront être plus ou moins discernées, parfois réduites à un simple épaulement. Ce degré de recouvrement dépend probablement du solvant, mais aussi d'effets structuraux. En effet, parmi les spectres optimisés par MCR-ALS, un épaulement est nettement visible à 550 nm sur le spectre de la $TPP(mO\beta GluOH)_4$ et sur celui des autres dérivés de la série *méta* (Figure 21). L'épaulement est moins net pour les dérivés de la série *para*, notamment la $TPP(pOH)_3$.

2.2.2.2.3 >Faible concentration relative de la forme intermédiaire

Pour les deux exemples présentés sur la figure 21, les plus fortes proportions possibles de H_3TPP^+ sont respectivement de 45 % pour la $TPP(pOH)_3$ et de 37 % pour la $TPP(mO\beta GluOH)_4$. Considérant l'ensemble des résultats (Tableau 5), la différence moyenne des pK (0,3) signifie que la proportion relative de H_3TPP^+ peut atteindre un maximum d'environ 40 %. Cette faible proportion de la H_3TPP^+ peut être expliquée par des changements de niveaux d'énergie lors de la transition d'une forme non protonée quasi coplanaire vers des formes mono- ou di-protonées présentant une distorsion hors du plan (139). Le degré de planarité de la porphyrine non protonée affecte sa diprotonation, ce qui explique la possibilité de mettre facilement en évidence la forme monoprotinée pour certains dérivés, tels que l'uroporphyrine octaméthylester, et pas pour d'autres, comme les TPP étudiées ici (103). Parmi les composés étudiés ici, les substituants du phényle n'ont pas d'impact net sur la plus forte proportion possible de forme intermédiaire, probablement en raison de trop faibles variations structurales.

La faible proportion de H_3TPP^+ , combinée avec sa similarité spectrale avec H_4TPP^{2+} explique la difficulté de mettre en évidence sa présence au cours d'un dosage spectrophotométrique. Sutter *et al.* obtinrent des différences similaires entre les constantes des deux étapes de protonation pour une porphyrine hydrosoluble, la TPPS4 mais son approche monovariée a atteint ses limites pour la TPP dans un mélange DMF – eau : seulement une constante globale put être déterminée (122; 142). Ceci illustre le fait que les conditions environnementales, comme la polarité du solvant ou la nature du contre-ion, affectent la proportion maximale de forme monoprotinée (102). Pour la TPPS4, Gensch *et al.* calculèrent une proportion maximale de forme intermédiaire égale à 15 %, une valeur significativement inférieure aux nôtres (124). Cette différence doit être liée à la nette différence entre les formes des bandes de Soret obtenues par les deux méthodes, résultat de l'assimilation par Gensch *et al.* du spectre de la porphyrine monoprotinée à une somme de courbes gaussiennes.

2.2.2.3 > Constantes de protonation

2.2.2.3.1 >Relation structure – propriété

Selon la substitution du phényle, les valeurs de pK_1 varient de $3,5 \pm 0,1$ à $5,1 \pm 0,1$ et celles de pK_2 de $3,2 \pm 0,2$ à $4,9 \pm 0,1$ (Tableau 5). Ces intervalles relativement importants témoignent de l'influence des groupements périphériques sur les propriétés des atomes situés au coeur du macrocycle. Les valeurs de pK_1 et pK_2 obtenues pour les dérivés *méta* sont plus faibles que celles des dérivés *para*. Les composés substitués en *méta* sont nettement moins sensibles aux effets de substitution que les dérivés *para*. Ainsi, les valeurs de pK_1 des dérivés *méta* varient de 0,3 unité pH, contre plus de 1 unité pH pour les dérivés *para*. Cette moindre sensibilité à la substitution explique l'absence de relation structure – basicité nette dans la série *méta*, contrairement à la série *para*. Dans cette dernière série, les valeurs de pK des composés hydroxylés sont supérieures à celles des glycoconjugués. De plus, la basicité augmente avec le nombre de substituants. Par exemple, la valeur de pK_1 de la $TPP(pOH)_4$ ($5,1 \pm 0,1$) est supérieure à celle de son homologue trisubstitué ($4,8 \pm 0,1$ pour la $TPP(pOH)_3$) et à celle de son dérivé glycoconjugué ($4,4 \pm 0,2$ pour la $TPP(pO\beta GluOH)_4$). Les valeurs de pK obtenues ici pour la $TPP(pO\beta GluOH)_4$ et la $TPP(mO\beta GluOH)_4$ sont du même ordre de grandeur que les constantes globales de diprotonation déterminées pour ces mêmes composés par Kohata *et al.* à l'aide d'une méthode univariée (4,75 et 4,05 respectivement) (143).

Il n'y a pas de différence significative entre les composés portant des sucres différents (β -glucose, α -mannose ou β -galactose), que ce soit dans le cas d'une glycoconjugaison directe ($TPP(pO\beta GalOH)_4$ et $TPP(pO\beta GluOH)_4$) ou par l'intermédiaire d'un espaceur (comparaison entre

2 > Ionisation

TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃, TPP(*p*ODEGO β GluOH)₃ et TPP(*p*ODEGO β GalOH)₃). L'insertion d'un espaceur entre le phényle et le sucre augmente légèrement la basicité du dérivé. Par exemple, la valeur de pK₁ de la TPP(*p*O β GalOH)₃ (4,3 ± 0,1) augmente à 4,5 ± 0,1 pour le dérivé avec un espaceur DEG (TPP(*p*ODEGO β GalOH)₃).

La relation structure – basicité dans la série *para* résulte clairement de l'effet électrodonneur du substituant. En effet, parmi les TPP trisubstituées en *para*, le caractère électrodonneur du substituant augmente dans l'ordre : sucre sans espaceur, sucre avec espaceur, hydroxyle, ordre similaire à celui de la basicité des composés. Une telle relation entre le caractère électrodonneur et les constantes de diprotonation globales avait déjà été décrite pour des TPP tétrasubstituées en position *para*, sulfonatéés (142) ou non (94; 144). Nos résultats confirment que ces relations s'appliquent également aux deux constantes correspondant aux deux étapes de protonation de TPP glycoconjuguées et hydroxylées et étendent les observations précédentes à des composés présentant un nombre plus faible de substituants. Les effets électrodonneurs doivent également être invoqués pour rendre compte de la diminution de basicité observée sur les composés présentant un plus faible degré de substitution. De plus, dans cette perspective, la plus faible basicité et la moindre sensibilité à la substitution des dérivés *méta* s'expliquent simplement par des phénomènes classiques de résonance, déjà évoqués pour la relation structure – spectroscopie : un groupe électrodonneur sur un phényle induit une plus forte augmentation de la densité électronique sur les positions *ortho* et *para* que sur la position *méta* (145). Ainsi, l'intensité du caractère électrodonneur, et l'augmentation de basicité correspondante, sera plus élevée avec un dérivé *para* qu'avec un dérivé *méta*.

2.2.2.3.2 >Corrélation entre les caractéristiques des spectres et la basicité

Les effets structuraux mis en jeu dans la relation structure – basicité sont également impliqués dans la relation structure – spectroscopie, comme le montre la forte corrélation entre la longueur d'onde de la bande de Soret de la forme H₄TPP²⁺ et les valeurs de pK (r² = 0,83 que l'on considère le pK₁ ou le pK₂). Une autre illustration de cette similitude dans la relation structure – propriété est de traiter les constantes de protonation comme variables quantitatives supplémentaires dans l'ACP précédente : on peut noter une forte corrélation des valeurs de ces constantes avec les scores pour la première composante (r² = 0,98 pour les pK₁ et 0,94 pour les pK₂). En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le caractère électrodonneur du substituant déstabilise l'orbitale HOMO, cette orbitale étant caractérisée par une forte densité électronique au-dessus des carbones en *méso*. L'augmentation d'énergie de l'orbitale HOMO entraîne un décalage vers le rouge des bandes accompagné d'un élargissement (83; 94). Ainsi, plus le substituant sera électrodonneur, plus les bandes seront décalées vers le rouge et larges. Ce dernier effet est

Composé	Azotes pyrroliques		Hydroxyyles phénoliques			
	pK ₂	pK ₁	pK _{OH1}	pK _{OH2}	pK _{OH3}	pK _{OH4}
TPP	4,24	4,85	-	-	-	-
TPP(<i>m</i> OH) ₃	4,20	4,81	9,23	9,71	10,19	-
TPP(<i>m</i> OH) ₄	4,19	4,81	9,11	9,53	9,88	10,31
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₁	4,23	4,84	-	-	-	-
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-10	4,21	4,82	-	-	-	-
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-15	4,21	4,82	-	-	-	-
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	4,20	4,81	-	-	-	-
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄	4,19	4,80	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OH) ₃	4,27	4,90	9,12	9,60	10,07	-
TPP(<i>p</i> OH) ₄	4,29	4,91	9,00	9,42	9,77	10,20
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₁	4,24	4,86	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-10	4,25	4,87	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-15	4,26	4,88	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	4,27	4,89	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₄	4,28	4,89	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	4,28	4,90	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OMEGOαLFucOH) ₃	4,28	4,89	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OMEGOαDFucOH) ₃	4,28	4,89	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> OMEGOαManOH) ₃	4,27	4,89	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> ODEGOβGalOH) ₃	4,27	4,89	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> ODEGOβGluOH) ₃	4,27	4,89	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	4,27	4,89	-	-	-	-
TPP(<i>p</i> O(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	4,27	4,89	-	-	-	-
TPP[<i>p-dendr</i> (DEGOH) ₃]	4,50	5,04	-	-	-	-
TPP[<i>p-dendr</i> (DEGOαManOH) ₃]	4,50	5,04	-	-	-	-
TPP[<i>p-dendr</i> (MEGOαManOH) ₃]	4,50	5,04	-	-	-	-

Tableau 6 - Constantes d'ionisation déterminées à l'aide de Marvin

particulièrement net en comparant les spectres des formes H₃TPP⁺ de la TPP(*m*OβGluOH)₄ et de la TPP(*p*OH)₃, le dérivé *méta* présentant un spectre beaucoup plus structuré que le composé substitué en *para* (Figure 21). La distortion du noyau TPP sous l'effet de la diprotonation augmente la résonance entre les phényles et le tétrapyrrole, exacerbant ainsi la sensibilité des spectres à la substitution (94; 100; 146). Ceci est illustré en comparant la TPP(*m*OH)₃ et son isomère de la série *para* (la TPP(*p*OH)₃). L'écart entre les bandes de Soret de ces deux composés sous la forme

2 > Ionisation

H₂TPP (3 nm) atteint respectivement les valeurs de 6 et 7 nm si l'on considère les formes H₃TPP⁺ et H₄TPP²⁺ (Tableau 5). La similitude de la sensibilité à la substitution de ces deux dernières espèces est un indice supplémentaire de la distorsion de la forme H₃TPP⁺.

2.2.3 > Prédiction *in silico*

Les TPP possèdent un mécanisme de diprotonation original doublé d'une forte sensibilité à la substitution. Ces deux caractéristiques en font un défi pour une approche *in silico*.

2.2.3.1 > *Valeurs déterminées par Marvin*

Le logiciel *Marvin Calculator Plugin* permet de calculer une constante de protonation macroscopique pour chacun des deux azotes de type imino (Tableau 6). La proportion de H₃TPP⁺ peut atteindre un maximum de 50 %, valeur relativement proche de la valeur expérimentale, surtout si l'on considère la diprotonation très particulière des TPP. En effet, cette proportion maximale de H₃TPP⁺ est susceptible de varier en fonction des conditions expérimentales (polarité du solvant, force ionique, nature du contre-ion,...). De plus, le classement des composés est correct. En effet, la corrélation des valeurs prédites avec les valeurs expérimentales est satisfaisante ($r^2 = 0,85$ pour les pK_1 et $r^2 = 0,82$ for pK_2). Cependant, même si *Marvin* est capable de prévoir correctement la tendance due à l'effet du substituant sur la basicité, il est incapable de correctement prédire l'intensité de cet effet. En effet, les valeurs de pK_1 prédites par *Marvin* varient de 4,80 à 4,91 alors que les valeurs expérimentales varient de 3,5 à 5,1. La même observation s'applique aux valeurs de pK_2 : l'intervalle prédit (0,10) est loin de celui des valeurs expérimentales (1,7). La forte sensibilité des valeurs de pK des TPP à leur substitution constitue un défi dans une perspective de relation structure – propriété. C'est pourquoi, il nous a semblé opportun de créer un outil spécifique pour les TPP à partir de la relation observée entre substitution et basicité.

2.2.3.2 > *Prédiction à partir des indices ET-State*

La faible qualité de prédiction de *Marvin* conduit à envisager l'élaboration d'un modèle prédictif spécifique des TPP. De tels modèles ont déjà été proposés pour des séries de porphyrines afin de prédire leur potentiel de réduction, d'oxydation ou leur pK à partir des constantes de Hammett (142; 147; 148). La limite de ce type d'approche est qu'un modèle ne peut s'appliquer *a priori* qu'à un même nombre de phényles substitués et à une même position de substitution. De plus, cette approche présuppose de connaître la constante de Hammett du substituant, ce qui est problématique pour des substituants aussi variés et complexes que ceux de la série étudiée ici. C'est pourquoi il nous a semblé préférable d'utiliser une approche différente,

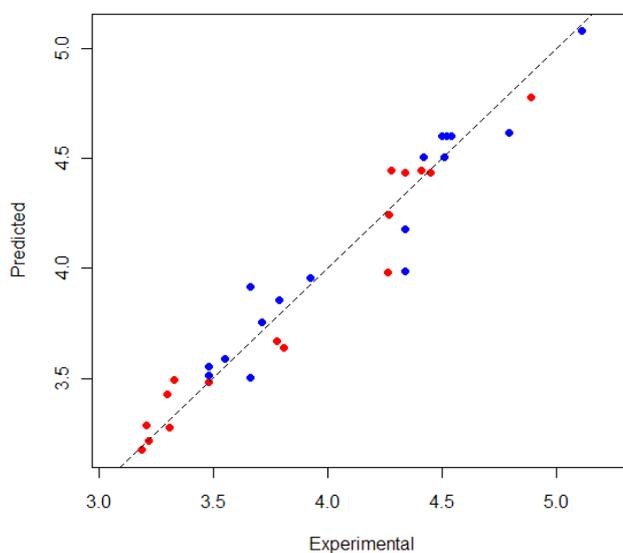


Figure 23 - Prédiction des pK à partir des indices ET-State

Valeurs de pK₁ en bleu et de pK₂ en rouge

basée sur des indices électrotopologiques : les indices ET-state (*Electrotopological state indices*). En effet, ces indices, mis au point par Hall et Kier, peuvent être calculés simplement à partir de la structure de la molécule (149-155). Ils ne nécessitent donc aucune connaissance préalable sur les propriétés des substituants et peuvent donc s'intégrer facilement dans une démarche de *drug design*. De plus, ces indices décrivent l'état de la densité électronique, ce qui, en raison du lien entre effets électrodonneurs et basicité, en fait de possibles prédicteurs des pK.

Le modèle, basé sur une régression linéaire multiple, inclut les moyennes des indices ET-State par type d'atomes présents dans le noyau TPP. Le mode de calcul de ces indices, comportant un terme reflétant la perturbation de l'état intrinsèque de ces atomes, permet de prendre en compte l'effet de la substitution du noyau TPP. Un modèle ainsi conçu a l'avantage de pouvoir potentiellement s'appliquer à des dérivés comportant des substituants avec des types d'atomes non inclus dans le modèle.

Les indices ET-State ont été calculés pour les espèces H₂TPP et H₄TPP²⁺ de 17 des 21 TPP étudiés (les quatre dérivés pour lesquels une seule détermination de pK a été réalisée serviront à évaluer le modèle). La forte corrélation entre les indices des atomes correspondants dans les 2 espèces a conduit à limiter le modèle aux indices de la forme H₂TPP. De même, la forte corrélation entre les indices des deux types de carbone présents dans le noyau de la H₂TPP, a conduit à ne considérer qu'un seul des deux types de carbone dans la régression. Au final, seuls

2 > Ionisation

trois indices sont inclus dans le modèle, indices décrivant l'état électrotopologique des atomes d'azote de type amine (SssNH), des atomes d'azote de type imine (SdsN) et les carbones hybridés sp² portant un hydrogène (SdsCH), tous ces indices étant calculés sur l'espèce H₂TPP.

Le calcul des deux régressions linéaires conduit aux relations suivantes :

$$pK_2 = -64,5(\pm 4,5) - 27,3(\pm 1,7) \times SdsCH - 16,4(\pm 1,3) \times SdsN + 56,1(\pm 3,6) \times SssNH \quad \text{(Equation 17)}$$

$$pK_1 = -54,1(\pm 5,3) - 24,3(\pm 2,0) \times SdsCH - 16,6(\pm 1,5) \times SdsN + 52,1(\pm 4,2) \times SssNH \quad \text{(Equation 18)}$$

La figure 23 illustre la corrélation entre les valeurs expérimentales et les valeurs prédites par le modèle. Les coefficients de corrélation ajustés sont égaux à 0,94 et 0,91, respectivement pour les modèles des pK₂ et pK₁. Les Q² de la validation *Leave-Many-Out* avec *Bootstrap* sont respectivement égaux à 0,93 et 0,86 pour les modèles des pK₂ et des pK₁. Les résidus répondent aux critères de normalité (tous les points sont situés dans l'intervalle de confiance des droites de Henry) et l'homoscédasticité (les valeurs de p des tests de Breusch-Pagan sont de 0,72 et 0,60 respectivement pour les modèles pK₂ et pK₁). Aucune valeur aberrante n'a été détectée (pas de résidu normalisé présentant un p de Bonferonni inférieur à 0,05). Aucune variable influente n'a été mise en évidence. Les permutations aléatoires des Y (*Y-scrambling*, un million de permutations aléatoires) donnent des valeurs de R² et Q² nettement inférieures à celles du modèle. Les valeurs de F pour les modèles des pK₂ et pK₁ (pour 3 et 13 degrés de liberté) sont égales respectivement à 90,1 et 52,6, valeurs fortement significatives (p < 0,01). Tous les coefficients des deux modèles sont statistiquement significatifs (p < 0,01).

Ces modèles prédictifs doivent pouvoir s'appliquer aux dérivés de TPP substitués en positions *méta* et *para*. En effet, pour ces deux positions de substitution, les effets électrodonneurs suffisent à rendre compte de la modification de basicité. Dans le cas d'une substitution en position *ortho*, la basicité est affectée non seulement par des effets électroniques mais aussi par des contraintes stériques (143; 156), si bien que les TPP de la série *ortho* présentent des substituants situés au-dessus ou en-dessous du plan formé par le macrocycle. Par leur méthode d'évaluation

Composé	Valeurs expérimentales		Modèle ET-State	
	pK ₂	pK ₁	pK ₂	pK ₁
TPP(<i>p</i> OMEGO α LFucOH) ₃	4,2	4,3	4,38	4,56
TPP(<i>p</i> OMEGO α DFucOH) ₃	4,3	4,2	4,38	4,56
TPP(<i>p</i> OMEGO α ManOH) ₃	4,2	4,4	4,11	4,30
TPP(<i>p</i> O(CH ₂) ₃ O α ManOH) ₃	4,3	4,4	4,29	4,47

Tableau 7 - Exemples d'application du modèle basé sur les indices ET-State

des distances interatomiques (chemins entre atomes connectés), les indices ET-State sont incapables de refléter cette orientation spatiale si particulière des dérivés *ortho*. Le tableau 7 montre un exemple d'application du modèle élaboré ci-dessus pour les quatre dérivés non inclus dans son élaboration. Compte tenu des erreurs expérimentales inhérentes à une détermination de pK, les résultats obtenus par le modèle concordent avec les valeurs expérimentales.

2.3 > Déprotonation des hydroxyles phénoliques

La déprotonation des hydroxyles phénoliques concerne quatre composés : la TPP(*m*OH)₃, la TPP(*m*OH)₄, la TPP(*p*OH)₃ et la TPP(*p*OH)₄. Elle présente un certain nombre de points communs avec la diprotonation des azotes tétrapyrroliques : plusieurs équilibres d'ionisation sur un intervalle de pH restreint, pas de forme intermédiaire facilement décelable sur les spectres d'absorption,... Cependant, le cas est beaucoup plus complexe que celui de la diprotonation. En effet, il ne s'agit plus ici de déterminer deux constantes et les spectres de trois formes (dont deux peuvent être isolés). Il s'agit de déterminer trois (ou quatre) constantes et les spectres des quatre (ou cinq, selon le nombre de fonctions hydroxyle) formes correspondantes, spectres très largement superposés comme le suggèrent les spectres enregistrés sur l'intervalle de pH entre 7,6 et 13,8 pour la TPP(*m*OH)₄ (Figure 24).

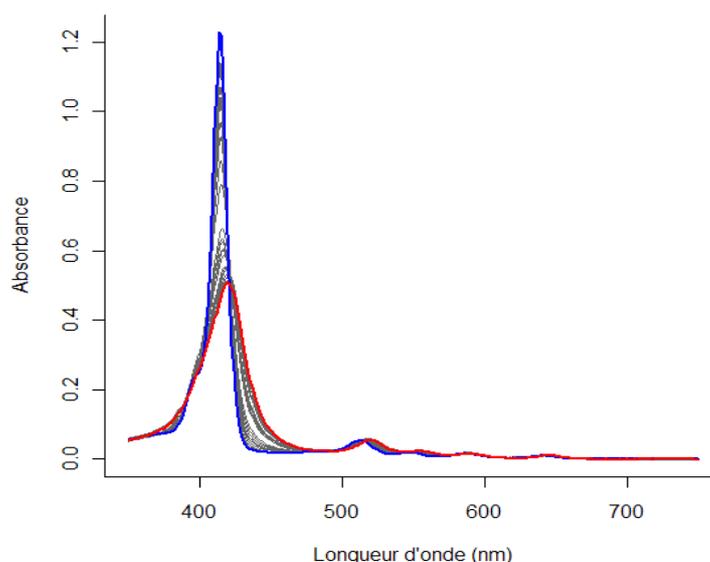


Figure 24 - Spectres de la TPP(*m*OH)₄ à pH basiques

Spectre à pH 7,6 en **bleu** et à pH 13,8 en **rouge** ; spectres enregistrés à des pH intermédiaires en gris

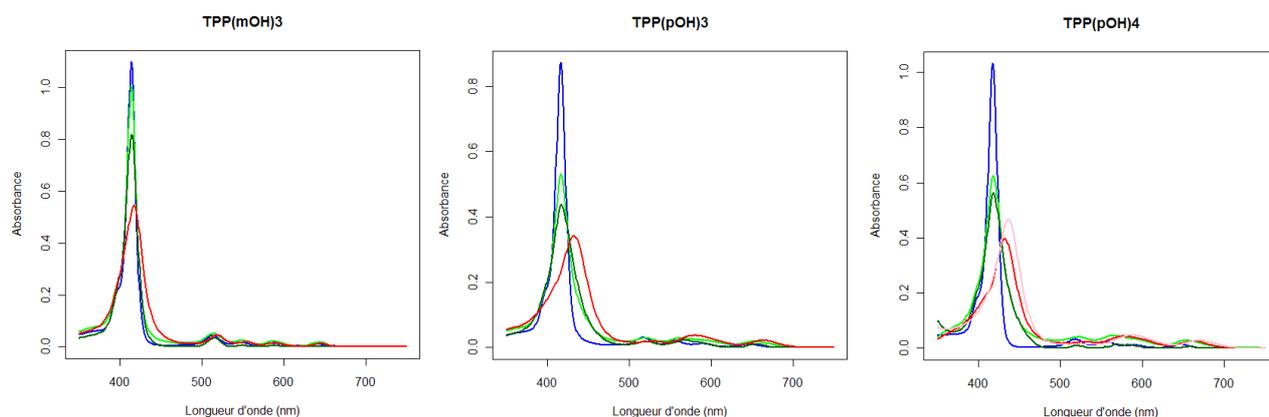


Figure 25 - Spectres des TPP portant des hydroxyles déprotonés obtenus par MCR-ALS

Nombre d'hydroxyles périphériques déprotonés : 0 en **bleu**, 1 en **vert clair**, 2 en **vert foncé**, 3 en **rouge**, 4 en **saumon**

En raison de ce grand nombre d'inconnues, et malgré la contrainte imposée par le modèle physico-chimique, il n'est plus possible d'obtenir une solution unique indépendante des estimations initiales. Cependant, la comparaison des résultats obtenus avec les différents composés permet de proposer une solution cohérente, à la fois en ce qui concerne les spectres des différentes formes (Figure 25) et les valeurs des constantes de déprotonation (Tableau 8), pour trois composés : la TPP(*m*OH)₃, la TPP(*p*OH)₃ et la TPP(*p*OH)₄. Le cas de la TPP(*m*OH)₄ est plus complexe que les précédents, en raison du nombre de substituants (cinq formes sont en équilibre) et de leur position. En effet, comme l'avaient montré la relation structure – spectroscopie présentée dans la section 1.3, un substituant en *mé*ta affecte moins les propriétés spectrales qu'un substituant en *para*, phénomène à l'origine d'une plus forte superposition des spectres des différentes formes de la TPP(*m*OH)₄. Ce recouvrement accru, préjudiciable à l'optimisation par MCR-ALS, empêche le calcul de spectres et de constantes d'association cohérentes pour le dérivé tétrahydroxylé en *mé*ta.

Composé	pK _{OH1}	pK _{OH2}	pK _{OH3}	pK _{OH4}	lof (%)
TPP(<i>m</i> OH) ₃	9,6	9,9	10,6	-	1,9
TPP(<i>m</i> OH) ₄	ND	ND	ND	ND	ND
TPP(<i>p</i> OH) ₃	9,6	10,0	10,7	-	2,4
TPP(<i>p</i> OH) ₄	9,5	10,1	10,4	11,1	2,1

Tableau 8 - Constantes de déprotonation des hydroxyles périphériques

A l'instar de la diprotonation du tétrapyrrole, la déprotonation des hydroxyles phénoliques induit un décalage vers le rouge de la bande de Soret, accompagnée d'un

élargissement et d'une diminution d'absorbance (Figure 25). Cet effet est plus prononcé pour les dérivés de la série *para* que pour ceux de la série *méta*. Dans le visible, les dérivés en *para* présentent une nette simplification spectrale, les quatre bandes de la forme à pH neutre se réduisant au nombre de trois. Cette simplification spectrale dans le visible s'observe dès la première déprotonation, résultats concordant avec ceux décrits par Guo *et al.* (157). Ces auteurs ont étudié, dans le mélange DMF – eau 50:50 (v/v), la déprotonation des hydroxyles de TPP portant de un à quatre hydroxyles phénoliques, ce qui leur a permis d'attribuer des spectres résultant des différentes déprotonations. Des calculs d'orbitale ont montré que ces modifications spectrales ne sauraient être attribuées à une délocalisation de la charge de l'hydroxyle (charge qui reste sur le substituant) ou à une modification des états fondamentaux du macrocycle TPP, mais à la possibilité de nouvelles transitions π (anion phénoxy) $\rightarrow \pi^*$ (porphyrine).

L'intérêt de l'approche par MCR-ALS est de proposer des constantes de déprotonation (Tableau 8). Les déprotonations successives d'un même composé se déroulent sur un intervalle de pH relativement restreint. D'un composé à l'autre, les constantes régissant chacune des étapes de déprotonation sont proches. Cette proximité des valeurs résulte probablement de l'éloignement des groupements hydroxyle dans l'espace, et donc d'une faible influence de la déprotonation de l'un sur la déprotonation de l'autre. La comparaison avec les valeurs prédites par le logiciel *Marvin Calculator Plugins* montre que ce logiciel tend à sous-estimer les valeurs de pK_{OH} déterminées expérimentalement (d'environ une demi-unité pH) (Tableau 6), mais propose une estimation assez juste des écarts entre les constantes régissant les différentes déprotonations successives.

3 > Lipophilie des différentes espèces

Protonation des azotes tétrapyrroliques et déprotonation des hydroxyles phénoliques sont des phénomènes négligeables quantitativement à pH neutre. Sur la base des résultats précédents, il semblerait que, pour les TPP glycoconjuguées, une potentielle ionisation des azotes *in vivo* se cantonnerait aux compartiments les plus acides, tels que les lysosomes (pH voisin de 5), et ne serait que partielle. Mais ces équilibres sont susceptibles d'être affectés *in vivo*, et notamment risquent d'être déplacés selon les interactions des TPP avec leur environnement (agrégation, liaison aux protéines et aux structures lipidiques). Ces interactions dépendent entre autres de la lipophilie des différentes espèces.

Le lien entre lipophilie et efficacité ne concerne pas que les photosensibilisateurs utilisés en photothérapie dynamique. En effet, les premières observations de relation structure – propriété à la fin du 19^{ème} siècle portaient sur la relation entre efficacité narcotique et solubilité en

3 > Lipophilie des différentes espèces

milieu aqueux (Richet en 1893). Meyer et Overton établirent une relation entre activité et partage de la molécule entre milieux aqueux et membranes biologiques. Le premier modèle de mesure proposé était le système huile d'olive – eau (158). En 1964, Hansch et Fujita ont proposé d'utiliser le logarithme du coefficient de partage d'une molécule entre l'octanol et l'eau (log P) pour appréhender les interactions de cette molécule avec les membranes biologiques. Depuis ces travaux précurseurs, l'étude du log P s'est imposée comme une étape incontournable dans le développement de nouveaux médicaments. Cependant, la détermination du log P n'est pas toujours aisée. En effet, les composés amphiphiles tels que les TPP glycoconjuguées, risquent non seulement de former une couche à l'interface entre les deux phases, mais aussi de s'agréger en milieu aqueux. Ces deux éléments conduiraient à une erreur dans la détermination expérimentale du log P. C'est pourquoi nous avons utilisé une autre estimation de la lipophilie, par chromatographie liquide haute performance (CLHP), méthode complétée d'une approche *in silico*.

3.1 > Matériel & Méthodes

3.1.1 > Approche chromatographique : détermination du CHI

3.1.1.1 > Principe

Facteur de rétention

La CLHP constitue une alternative à la détermination classique du log P. Différentes méthodes d'évaluation de la lipophilie ont été proposées. Il est ainsi possible d'utiliser les facteurs de rétention calculés à partir des temps de rétention t_{iso} dans des conditions isocratiques, selon la relation suivante :

$$\log k = \log \frac{t_{iso} - t_0}{t_0} \quad \text{(Equation 19)}$$

La détermination des facteurs de rétention d'un composé avec différentes proportions de solvant organique permet de calculer un $\log k_w$, facteur de rétention théorique extrapolé en l'absence de solvant organique (Figure 40).

$$\log k = \log k_w - S \times \Phi \quad \text{(Equation 20)}$$

où Φ est la proportion de solvant organique dans la phase mobile et S la pente.

Si cette méthode est recommandée par différentes institutions, les valeurs obtenues ne sont que faiblement corrélées avec les log P expérimentaux. De plus, les valeurs de $\log k_w$ dépendent du

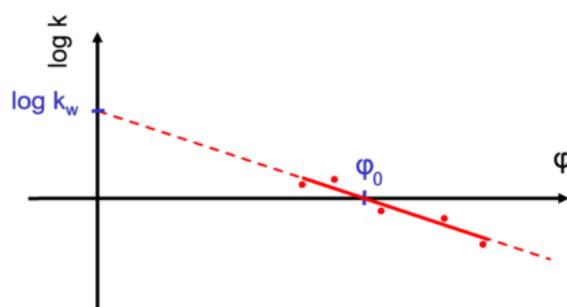


Figure 26 - Estimateurs de lipophilie en conditions isocratiques

solvant organique utilisé pour sa détermination.

Chromatographic Hydrophobicity Index

Une autre approche a été proposée. Il s'agit d'utiliser le pourcentage d'acétonitrile (φ_0) nécessaire pour obtenir une distribution égale du composé entre la phase stationnaire et la phase mobile. Cette valeur est déterminée à partir des $\log k$ mesurés au voisinage de 0 selon la relation suivante :

$$\varphi_0 = \frac{\log k_w}{S} \quad (\text{Equation 21})$$

L'avantage principal du φ_0 , par rapport au $\log k_w$ est qu'il résulte d'une interpolation et non d'une extrapolation (Figure 40). En effet, même si certains composés peuvent avoir une valeur de φ_0 négative ou supérieure à 100 %, pour la plupart des composés le φ_0 est une valeur directement mesurable. Cette valeur caractérise l'hydrophobie d'une molécule, puisqu'une plus grande proportion de solvant organique est nécessaire à l'élution des composés plus hydrophobes.

Composé	c log P	φ_0	CHI
Théophylline	-0,05	17,0	15,8 ± 0,8
Phényltétrazole	1,42	20,0	20,2 ± 0,7
Benzimidazole	1,55	35,2	30,7 ± 0,4
Colchicine	0,92	40,0	41,4 ± 0,4
Acétophénone	1,66	66,0	64,9 ± 0,2
Indole	2,14	75,7	69,2 ± 0,2
Propiophénone	2,20	78,6	78,4 ± 0,1
Butyrophénone	2,73	86,0	88,5 ± 0,1
Valérophénone	3,26	91,2	97,7 ± 0,3

Tableau 9 - Références pour la détermination du CHI

Les valeurs présentées ici ont été déterminées par Valko *et al.* (doi : 10.1021/ac961242d)

3 > Lipophilie des différentes espèces

$\log k_w$ et φ_0 sont déterminés à partir de résultats obtenus lors d'élutions isocratiques. Plusieurs injections sont donc nécessaires pour chaque composé étudié. La lourdeur de ces protocoles a conduit au développement d'indices simplifiés obtenus lors d'une simple injection chromatographique. Valko *et al.* ont ainsi montré que les temps de rétention obtenus lors d'un gradient rapide sont fortement corrélés avec les φ_0 déterminés expérimentalement (Tableau 9) (159). Cette observation les a conduit à créer un nouvel estimateur de lipophilie, le CHI (*Chromatographic Hydrophobicity Index*), calculé à partir du temps de rétention mesuré en gradient t_{grad} selon la relation linéaire suivante

$$CHI = A.t_{grad} + B \quad (\text{Equation 22})$$

t_{grad} et φ_0 étant corrélés, le CHI peut être considéré comme une approximation du φ_0 : plus sa valeur est élevée, plus le composé est lipophile. En pratique, un ensemble de composés de référence (dont les CHI ont été déterminés par Valko *et al.*) (Tableau 9) est utilisé pour calibrer le système, c'est-à-dire calculer les paramètres A et B de l'équation 22. Le CHI d'un nouveau composé peut alors être simplement calculé à partir de son temps de rétention selon la même relation linéaire.

3.1.1.2 > Produits chimiques & matériels utilisés

La TPP et la TPP(*p*OH)₄ proviennent de Sigma-Aldrich® (Allemagne), la TPP(*m*OH)₄ de Frontier Scientific® (USA). Tous les autres dérivés de la TPP ont été synthétisés à l'Institut Curie (UMR 176 CNRS) par l'équipe du Dr Philippe Maillard selon des protocoles publiés par ailleurs (31; 33; 41; 84). La théophylline, le 5-phényltétrazole, l'indole, la propiophénone et la valérophénone sont des produits Acros Organics® (Etats-Unis). La butyrophénone, la benzimidazole et l'acétate d'ammonium sont des produits Merck® (Etats-Unis). L'acétophénone est fourni par Carlo Erba® (Italie). La colchicine est un produit Cooper® (France), l'acide formique (≥98%) et l'acétonitrile sont fournis par Prolabo (France). L'eau ultrapure est obtenue avec l'appareil Alpha-Q (Millipore®, France).

La chaîne CLHP utilisée est un modèle Bio-Tek série 500 (pompe Bio-Tek Kontron 525, injecteur automatique Bio-Tek Auto sampler 565, enceinte thermostatée Bio-Tek 582, détecteur à barrette de diodes Bio-Tek 545V), piloté à l'aide du logiciel Geminyx (version 1.91). Les pH ont été mesurés avec un pH-mètre Metrohm® 691.

3.1.1.3 > Méthode

La phase stationnaire utilisée pour la détermination de CHI est une colonne C18

Modulo cart QS uptisphere ODB (150 mm x 4,6 mm). La phase mobile est constituée d'un mélange acétate d'ammonium 50 mM – acétonitrile délivré au débit de 1 mL.min⁻¹ selon le gradient suivant : 0-1,5 min, 0% acétonitrile; 1,5 -10,5 min, 0-100% acétonitrile; 10,5-15,0 min, 100% acétonitrile; 15,5-16,0 min, 0% acétonitrile; 16,0-19,0 min, 0% acétonitrile. L'addition d'acide formique à la solution d'acétate d'ammonium permet d'obtenir des solutions de pH compris entre 2 et 7 (pour les mesures de pH sur la phase mobile, les mesures réalisées sur des mélanges tampon – acétonitrile ont été corrigées selon la méthode proposée par Gagliardi *et al.* (160)). Les TPP sont diluées à une concentration de l'ordre de 10⁻⁶ M dans un mélange eau – acétonitrile 50 : 50 (v/v), solution contenant également les standards à une concentration voisine de 0.25 mg.mL⁻¹. Le volume d'injection est de 5 µL. La détection est réalisée par lecture de l'absorbance à quatre longueurs d'onde : 254 nm pour les composés de calibration, 416 nm pour les porphyrines neutres, 435 nm et 440 nm pour les porphyrines ionisées.

Les temps de rétention des standards mesurés à 254 nm sont utilisés pour calculer les paramètres A et B de l'équation 22. Pour la détermination du CHI à pH neutre, l'ensemble des standards présentés dans le tableau 9 sont pris en compte. Pour l'évaluation de l'effet du pH sur le CHI, seuls quatre calibrateurs (acétophénone, butyrophénone, propiophénone, valérophénone) sont pris en compte, ces composés étant les seuls à ne pas présenter de variation de lipophilie sur l'intervalle de pH considéré. Le suivi de l'absorbance à 416, 435 ou 440 nm (selon l'état d'ionisation de la TPP) permet de déterminer le temps de rétention de la TPP injectée simultanément. Cette valeur peut alors être utilisée pour calculer l'indice CHI pour cette TPP. Un exemple de chromatogramme obtenu est illustré sur la figure 27. L'analyse chromatographique est répétée trois fois et les CHI déterminés sont les moyennes de ces valeurs.

3.1.2 > Approche *in silico* de la lipophilie

3.1.2.1 > *Principe*

De nombreuses méthodes de prédiction du log P à partir de la structure sont disponibles. Elles peuvent être regroupées en deux catégories : les méthodes par fragmentation et les méthodes globales (161).

Méthodes par fragmentation

Dans ce cas, le log P est obtenu par addition des contributions de différents atomes ou de différents fragments. Cette approche est le prolongement logique de l'estimation de la lipophilie par le logarithme du coefficient de partage. En effet, si Hansch et Fujita avaient proposé l'utilisation du logarithme, c'était pour conférer à cette propriété une additivité, en permettant l'addition des

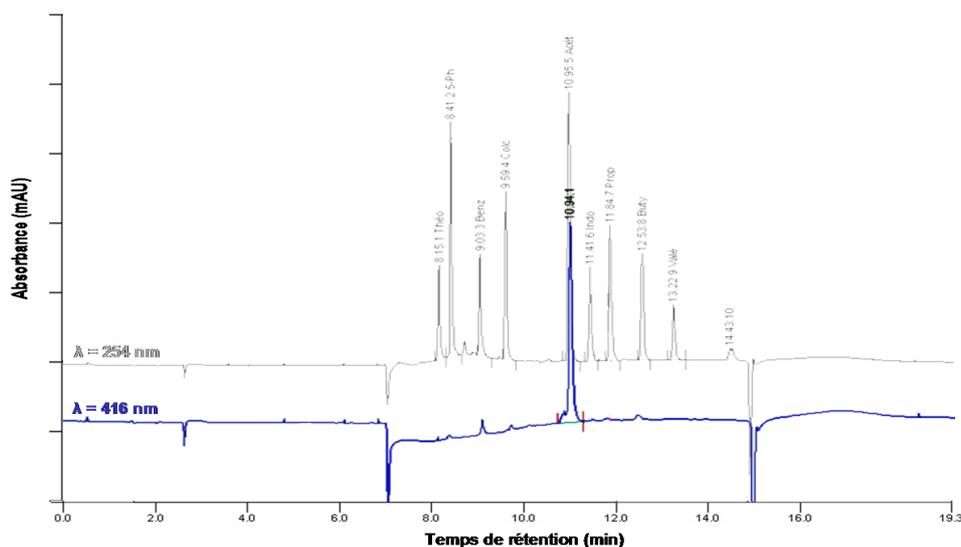


Figure 27 - Exemple de calcul du CHI de la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃

Chromatogramme enregistré à 254 nm (standards) en gris ;

chromatogramme enregistré à 416 nm (TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃) en bleu

contributions de différents groupements, sur le modèle des constantes de Hammett utilisées pour décrire les propriétés électroniques (158). Selon les méthodes, l'addition des contributions des différents fragments peut faire l'objet de corrections plus ou moins complexes. La principale limite de ce type d'approche est la nécessité de disposer d'un ensemble de composés très variés pour la calibration du système (162).

Méthodes globales

L'approche globale regroupe des approches empiriques utilisant la configuration spatiale de la molécule et des méthodes basées sur des indices topologiques. Elle nécessite des corrections complexes, parfois avec des données expérimentales (point de fusion, point d'ébullition) (161).

3.1.2.2 > Méthode utilisée

Le site vcclab.org propose une comparaison aisée de différentes méthodes de calcul du log P (112). Parmi les différentes méthodes proposées, trois sont présentées ici : XLOGP3 (163), miLOGP (164) et ALOGPS (165). L'intérêt de cette sélection est de couvrir les principales modes de calcul de la lipophilie. En effet, ALOGPS est une méthode globale, basée sur les indices E-State tandis que XLOGP3 et miLOGP sont des méthodes par fragmentation, la première par atome, la seconde par groupement. La comparaison inclut également les trois prédictions du log P

Composé	CHI	ALOGPs	miLogP	XLOGP3	VG	KLOP	PHYS
TPP	-	7,98	9,64	10,41	11,51	10,92	11,23
TPP(mOH) ₃	-	7,13	9,29	9,34	10,66	9,85	10,42
TPP(mOH) ₄	117,2 ± 0,1	6,84	9,14	8,99	10,38	9,49	10,15
TPP(mOβGluOH) ₁	-	6,14	9,05	8,25	8,57	8,40	8,98
TPP(mOβGluOH) ₂ 5-10	121,1 ± 1,6	4,58	7,56	6,09	5,62	5,89	6,73
TPP(mOβGluOH) ₂ 5-15	86,7 ± 0,1	4,59	7,56	6,09	5,62	5,89	6,73
TPP(mOβGluOH) ₃	55,7 ± 0,5	3,04	5,27	3,93	2,67	3,37	4,48
TPP(mOβGluOH) ₄	39,3 ± 0,1	1,82	2,98	1,77	- 0,28	0,85	2,23
TPP(pOH) ₃	-	7,20	9,31	9,34	10,66	9,85	10,42
TPP(pOH) ₄	100,2 ± 0,2	6,88	9,17	8,99	10,38	9,49	10,15
TPP(pOβGluOH) ₁	-	6,17	9,06	8,25	8,57	8,40	8,98
TPP(pOβGluOH) ₂ 5-10	100,7 ± 0,1	4,69	7,61	6,09	5,62	5,89	6,73
TPP(pOβGluOH) ₂ 5-15	62,1 ± 0,1	4,69	7,61	6,09	5,62	5,89	6,73
TPP(pOβGalOH) ₃	40,8 ± 0,1	3,19	5,34	3,93	2,67	3,37	4,48
TPP(pOβGalOH) ₄	26,5 ± 0,1	1,88	3,08	1,77	-0,28	0,85	2,23
TPP(pOβGluOH) ₄	28,3 ± 0,1	1,88	3,08	1,77	- 0,28	0,85	2,23
TPP(pOMEGOαLFucOH) ₃	79,2 ± 0,1	4,98	8,04	4,99	5,43	6,83	7,26
TPP(pOMEGOαDFucOH) ₃	79,1 ± 0,1	4,98	8,04	4,99	5,43	6,83	7,26
TPP(pOMEGOαManOH) ₃	55,6 ± 0,1	3,23	5,01	3,49	2,18	3,52	4,40
TPP(pODEGOβGalOH) ₃	54,7 ± 0,1	3,37	4,40	3,05	1,68	3,68	4,31
TPP(pODEGOβGluOH) ₃	56,7 ± 0,1	3,37	4,40	3,05	1,68	3,68	4,31
TPP(pODEGOαManOH) ₃	62,4 ± 0,1	3,37	4,40	3,05	1,68	3,68	4,31
TPP(pO(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	75,3 ± 0,1	3,68	6,11	4,56	2,33	3,56	4,74
TPP[p-dendr(DEGOH) ₃]	-	4,54	7,72	5,24	4,49	4,76	6,42
TPP[p-dendr(DEGOαManOH) ₃]	-	2,45	2,31	0,46	-1,86	-0,01	1,61
TPP[p-dendr(MEGOαManOH) ₃]	-	2,25	2,92	0,90	-1,37	-0,16	1,69

Tableau 10 - CHI mesurés et valeurs de log P calculées des TPP non protonées

proposées par *Marvin Calculator Plugin* : VG, KLOP et PHYS (109). Ces trois méthodes sont dérivées de la méthode ALOGP, basée sur une fragmentation atomique (166). Au total, ce sont donc six méthodes qui ont été comparées pour les TPP étudiées. Ces approches s'étaient révélées, parmi les meilleures, dans la comparaison réalisée par Mannhold *et al.* sur plus de 96 000 composés (161).

Les calculs ont été réalisés sur la structure codée au format SMILES. Certaines des méthodes permettent à l'utilisateur d'intégrer une bibliothèque de références (c'est-à-dire d'affiner la calibration du système à l'aide des log P expérimentaux d'un jeu de composés de structure proche des composés inconnus). Malgré l'intérêt de cette option pour améliorer la qualité des estimations (161), elle n'a pas été utilisée, en raison du manque de données fiables sur des

3 > Lipophilie des différentes espèces

composés structurellement proches.

Le logiciel *Marvin Calculator Plugin* a également été utilisé pour l'estimation des aires de projection (minimale et maximale) et des surfaces accessibles au solvant (167). Pour ces surfaces, le logiciel autorise le calcul pour différents rayons de solvation (de 0 à 5 angströms, la valeur de 1,4 étant utilisée par défaut). Il permet notamment de calculer, en plus de la surface totale, la surface hydrophobe (surface des atomes dont la valeur absolue de la charge partielle est inférieure ou égale à 0,125) et la surface polaire (surface des atomes dont la valeur absolue de la charge partielle est strictement supérieure à 0,125).

3.2 > Lipophilie des TPP sous forme non protonée

3.2.1 > Evaluation chromatographique

Le gradient utilisé permet de mesurer des CHI jusqu'à une valeur maximale voisine de 120. Les composés pour lesquels aucune valeur n'a pu être déterminée présentent des CHI supérieurs à cette valeur. C'est le cas de la TPP non substituée, des dérivés trihydroxylés (TPP(*m*OH)₃ et TPP(*p*OH)₃) ou monoglycoconjugués (TPP(*m*OβGluOH)₁ et TPP(*p*OβGluOH)₁) et des trois dendrimères. Leur forte lipophilie peut être interprétée comme le résultat de l'accessibilité du noyau TPP pour interagir avec la phase stationnaire. Une valeur de CHI a pu être déterminée pour les autres composés, ce qui permet d'évaluer l'impact du mode de substitution sur la lipophilie (Tableau 10). En effet, le nombre de substituants, mais également leur nature, leur position et l'éventuelle présence d'un bras espaceur sont susceptibles de modifier le CHI.

3.2.1.1 > **Dérivés hydroxylés ou glycoconjugués sans espaceur**

3.2.1.1.1 > *Effet du nombre de substituants*

Les substituants étudiés étant polaires, leur nombre va contribuer à diminuer la valeur de CHI des dérivés de la TPP, diminution plus forte avec les groupements sucre plus polaires que les hydroxyles. Ainsi, si les CHI de la TPP(*m*OH)₃ et de la TPP(*p*OH)₃ n'ont pas pu être déterminés, l'évaluation des CHI des dérivés tétrahydroxylés a été possible. L'effet de la substitution est net sur les dérivés glycoconjugués à l'intérieur d'une même série, *para* ou *méta*. Par exemple, la TPP(*m*OβGluOH)₄ (CHI = 39,3 ± 0,1) possède un CHI inférieur à la TPP(*m*OβGluOH)₃, (CHI = 55,7 ± 0,5), dérivé possédant également un CHI inférieur à chacun des deux isomères de la TPP(*m*OβGluOH)₂ (CHI de 121,1 ± 1,6 et 86,7 ± 0,1 selon l'isomère

considéré). Une observation similaire s'applique à la série *para*, même si des différences de nature du sucre (β -Glucose ou β -Galactose selon les dérivés) compliquent la comparaison.

Cet effet du nombre de substituants sur la lipophilie se retrouve dans les résultats de surface accessible au solvant (Tableau 11 et Figure 28). Dans le cas de la TPP non substituée, la surface polaire représente moins de 3 % de la surface totale de la molécule. La substitution, hydroxylation ou glycoconjugaison, entraîne une augmentation de la surface polaire. Les hydroxyles, groupements de petite taille, provoquent une faible augmentation de la surface totale, l'augmentation de la surface polaire s'accompagnant d'une diminution importante de la surface hydrophobe. Dans le cas de la glycoconjugaison sans espaceur, l'augmentation de la surface totale résulte à la fois de l'augmentation de la surface polaire et de la surface hydrophobe. L'augmentation de la surface polaire est toutefois supérieure à celle de la surface hydrophobe, ce qui entraîne une augmentation du pourcentage de surface polaire. La surface polaire des composés tétraglycoconjugués atteint ainsi environ 35 %.

3.2.1.1.2 >Effet de la position du substituant

Séries *méta* et *para*

Quelque soit le substituant considéré (sucre ou hydroxyle) et le degré de substitution, une TPP substituée en *méta* est plus lipophile que son isomère *para* (Tableau 10). Ainsi, la

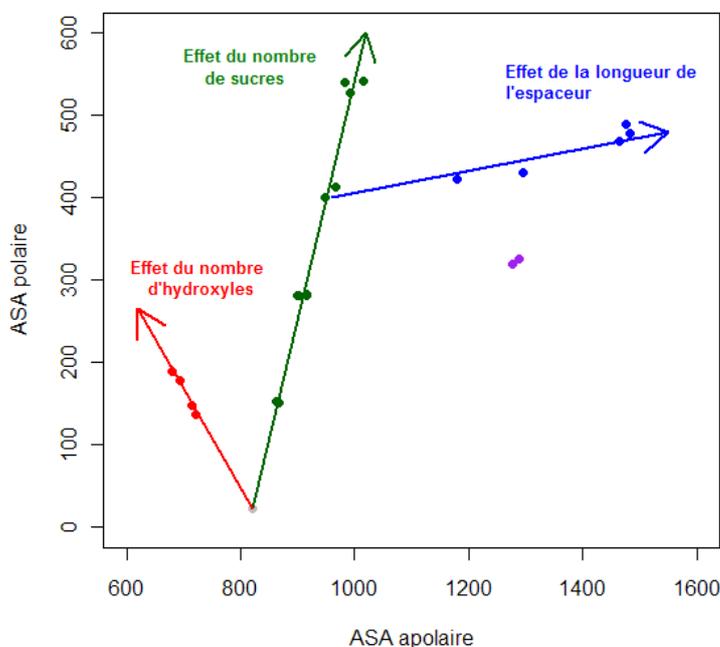


Figure 28 - Effet de la substitution sur les surfaces polaires et apolaires

TPP non substituée en gris; dérivés hydroxylés en rouge; dérivés glycoconjugués sans espaceur en vert; dérivés avec substituant sucre fucose et espaceur en violet; autres dérivés glycoconjugués avec espaceur en bleu

3 > Lipophilie des différentes espèces

TPP(*m*OH)₄ possède un CHI de 117,2 (± 0,1) contre 100,2 (± 0,2) pour la TPP(*p*OH)₄. De même, la TPP(*m*OβGluOH)₄ (CHI = 39,3 ± 0,1) est nettement plus lipophile que la TPP(*p*OβGluOH)₄ (CHI = 28,3 ± 0,1). Cet effet de substitution est surprenant si l'on ne considère que la représentation bidimensionnelle de ces dérivés. Par contre, la comparaison de leurs structures tridimensionnelles respectives (Figure 29) montre le rôle essentiel de la possibilité de rotation des phényles en position méso. Selon l'angle entre ces phényles et le plan du tétrapyrrole, le substituant en *mé*ta peut s'orienter de nombreuses manières différentes. Cette conformation est dite globulaire. Dans le cas d'une substitution en position *para*, malgré la libre rotation du phényle, le substituant se

Composé	ASA	ASA_H	ASA_P	% surface apolaire	Aire minimale	Aire maximale
TPP	843,37	820,78	22,58	97,3	66,15	140,8
TPP(<i>m</i> OH) ₃	859,59	721,9	137,69	84,0	80,65	152,84
TPP(<i>m</i> OH) ₄	871,14	692,64	178,51	79,5	71,76	144,67
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₁	1018,81	867,02	151,79	85,1	86,88	179,24
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-10	1197,12	915,66	281,46	76,5	112,09	210,64
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-15	1198,4	915,7	282,7	76,4	112,3	202,36
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	1378,53	965,77	412,76	70,1	131,55	230,12
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄	1556,43	1014,25	542,17	65,2	144,08	226,08
TPP(<i>p</i> OH) ₃	862,72	714,54	148,19	82,8	61,3	161,36
TPP(<i>p</i> OH) ₄	869,2	679,2	190	78,1	63,52	159,07
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₁	1015,21	862,75	152,46	85,0	85,1	176,77
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-10	1184,75	902,53	282,23	76,2	102	208,51
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-15	1182,32	900,39	281,93	76,2	91,73	203,4
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	1347,76	947,49	400,27	70,3	126,72	241,4
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₄	1518,66	991,6	527,05	65,3	136,34	272,6
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	1521,7	981,79	539,91	64,5	137,62	268,08
TPP(<i>p</i> OMEGOαLFucOH) ₃	1613,93	1287,52	326,41	79,8	118,42	257,14
TPP(<i>p</i> OMEGOαDFucOH) ₃	1594,7	1275,59	319,12	80,0	119,41	262,69
TPP(<i>p</i> OMEGOαManOH) ₃	1601,72	1178,32	423,4	73,6	120,63	276,74
TPP(<i>p</i> ODEGOβGalOH) ₃	1960,31	1481,43	478,88	75,6	148,91	289,93
TPP(<i>p</i> ODEGOβGluOH) ₃	1964,07	1475,28	488,79	75,1	146,78	294,65
TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	1933,28	1463,69	469,59	75,7	156,73	295,62
TPP(<i>p</i> O(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	1725,8	1294,4	431,4	75,0	132,09	278,18
TPP[<i>p</i> -dendr(DEGOH) ₃]	1816,2	1489,9	326,31	82,0	152,15	245,93
TPP[<i>p</i> -dendr(DEGOαManOH) ₃]	2250,18	1693,43	556,74	75,3	202,33	344,95
TPP[<i>p</i> -dendr(MEGOαManOH) ₃]	1922,84	1408,31	514,53	73,2	169,85	301,81

Tableau 11 - Surfaces accessibles au solvant (ASA) & aires de projection

Calcul pour un rayon de solvatation égal à 1,4 Å (cas de la molécule d'eau) ; ASA = Surface totale ; ASA_H = Surface hydrophobe ;

ASA_P = Surface polaire

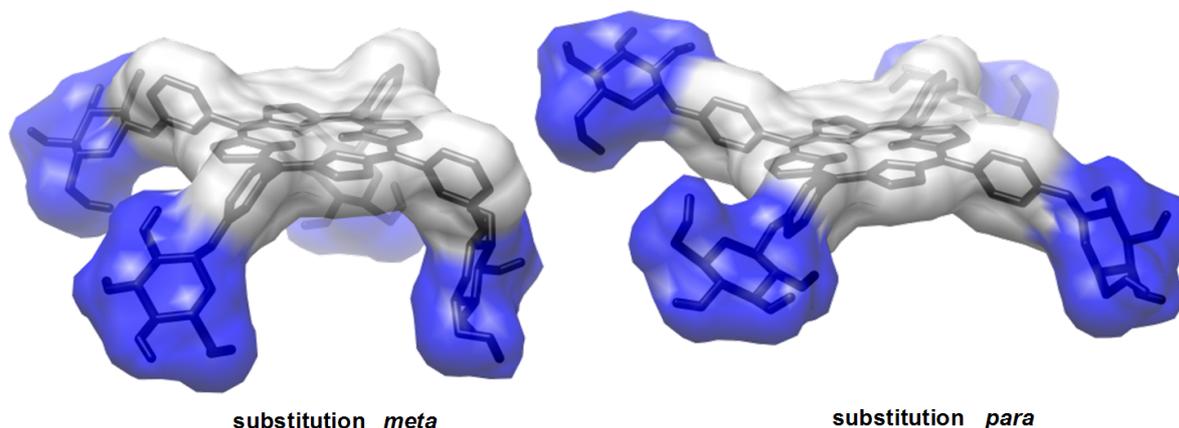


Figure 29 - Accessibilité du noyau TPP selon la position de la substitution

Représentation basée sur la structure MOLFEZ de la *Cambridge Structural Database*

situera toujours à proximité du plan formé par le tétrapyrrole. La conformation de ces dérivés de la série *para* est donc dite plane. Ainsi, il sera possible pour un isomère *méta* de présenter de nombreuses conformations différentes, certaines assez favorables à l'interaction du noyau TPP avec la surface hydrophobe de la colonne, à l'image de celle présentée sur la figure 29. Au contraire, dans la conformation plus rigide de l'isomère *para*, le noyau TPP est moins accessible pour interagir avec la phase stationnaire (29).

La comparaison des aires de projection de la TPP(*pO* β GluOH)₄ et de son isomère de la série *méta* laissent entrevoir ces différences : le dérivé *para* présente une plus grande différence entre ses aires de projection minimale et maximale, ce en raison de sa forme plane. En effet, la projection sur le plan du tétrapyrrole conduira à une aire élevée (l'aire de projection maximale) tandis que la projection sur un plan orthogonal au premier permettra d'obtenir une aire très faible. Un isomère *méta*, en raison de sa forme globulaire, présentera un moindre écart entre ses aires de projection maximale et minimale.

Dans le calcul de la surface accessible au solvant présenté dans le tableau 11, l'influence de la position de la substitution est relativement faible, même si les composés de la série *méta* présentent une surface totale légèrement supérieure. La comparaison des isomères de position montre que les proportions de surface apolaire varient peu. Il est possible de mieux mettre en évidence l'effet de position en faisant varier le rayon de solvation (fixé par défaut à 1,4 angströms) entre 0 et 5 angströms. Pour un rayon de solvation nul, les deux isomères, TPP(*pO* β GluOH)₄ et TPP(*mO* β GluOH)₄, présentent une même proportion de la surface accessible au solvant totale à être hydrophobe, comme le montre la figure 30. L'augmentation du rayon de

3 > Lipophilie des différentes espèces

solvatation conduit à une diminution de ce rapport de surfaces, diminution plus forte pour l'isomère *para* correspondant. Ceci traduit la faible accessibilité du noyau TPP à un substituant volumineux dans le cas d'une conformation plane relativement rigide. A l'inverse, la conformation globulaire caractéristique des isomères *méta* facilite l'accès au noyau TPP même pour des solvants relativement volumineux. L'effet est encore plus net si l'on compare les deux TPP tétrahydroxylées. La petite taille de ce substituant fait que la diminution du rapport de surfaces est très faible pour la TPP(*m*OH)₄, tandis qu'elle est beaucoup plus forte pour la TPP(*p*OH)₄.

Cas particulier des diglycoconjugués : phényles adjacents et opposés

Dans le cas des TPP diglycoconjuguées, deux positionnements relatifs des sucres peuvent être envisagées : sur deux phényles adjacents (cas des TPP(*m*OβGluOH)₂ 5-10 et TPP(*p*OβGluOH)₂ 5-10) ou sur deux phényles opposés (cas des TPP(*m*OβGluOH)₂ 5-15 et TPP(*p*OβGluOH)₂ 5-15). Les composés substitués en positions 5 et 10 présentent des CHI très nettement supérieurs à ceux substitués en positions 5 et 15. Cette différence est mal rendue par le calcul des surfaces accessibles au solvant pour un rayon de 1,4 angströms. En revanche, le calcul pour différents rayons de solvation montre que la proportion de surface apolaire varie moins pour le dérivé 5-10 que pour le dérivé 5-15 correspondant. Cette différence, traduction de la moindre exposition du coeur hydrophobe à un solvant volumineux dans le cas d'une substitution 5-15, concorde avec la moins forte lipophilie de ces dérivés. Le calcul des aires de projection permet de rendre compte de la différence de forme entre les deux dérivés, notamment dans le cas des dérivés *para*. La substitution 5-15 donne une molécule présentant des aires de projection minimale et maximale inférieures.

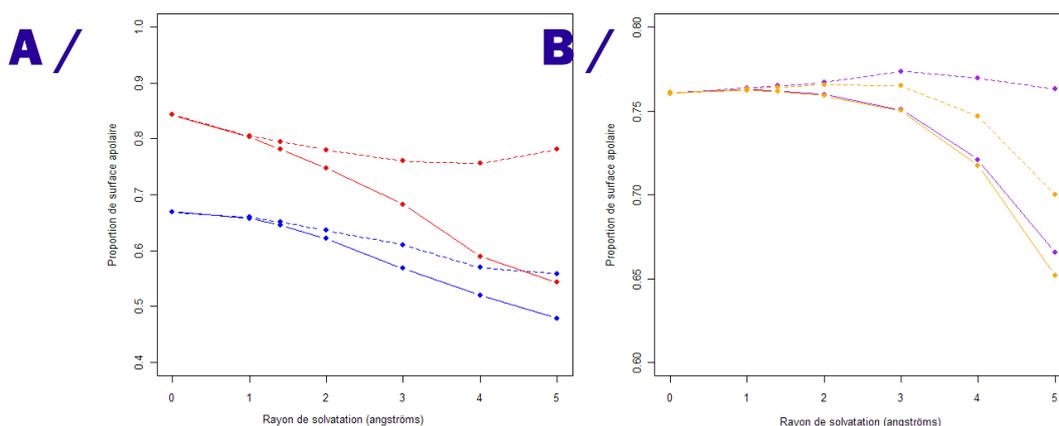


Figure 30 - Proportion de surface apolaire en fonction du rayon de solvation considéré

A / comparaison *méta* / *para* : TPP(*m*OH)₄ et TPP(*p*OH)₄ en rouge ; TPP(*m*OβGluOH)₄ et TPP(*p*OβGluOH)₄ en bleu ;

B / TPP(*m*OβGluOH)₂ 5-10 et TPP(*p*OβGluOH)₂ 5-10 en violet ; TPP(*m*OβGluOH)₂ 5-15 et TPP(*p*OβGluOH)₂ 5-15 en orange

Isomère *méta* en ligne pointillée ; isomère *para* en ligne pleine

3.2.1.2 > *Dérivés glycoconjugués avec espaceur*

3.2.1.2.1 > *Effet de la chaîne espaceur*

L'insertion d'une chaîne espaceur DEG entre le phényle et le sucre conduit à une nette augmentation du CHI, comme le montre la comparaison de la TPP(p ODEGO β GalOH)₃ (CHI = 54,7 ± 0,1) avec la TPP(p O β GalOH)₃. (CHI = 40,8 ± 0,1). L'ampleur de cette variation du CHI dépend de la nature de la chaîne espaceur. Ainsi, une chaîne espaceur éthylène glycol plus courte (MEG) confère à la TPP un CHI inférieur au dérivé avec un espaceur DEG (CHI de 55,6 ± 0,1 pour la TPP(p OMEGO α ManOH)₃ contre 62,4 ± 0,1 pour la TPP(p ODEGO α ManOH)₃). Ces deux dérivés mannosylés présentent un CHI nettement inférieur à la TPP(p O(CH₂)₃O α ManOH)₃ (CHI = 75,3 ± 0,1).

Les composés avec espaceur sont des structures plus volumineuses, ce que confirme le calcul des aires de projection. En ce qui concerne le calcul des surfaces accessibles au solvant, la présence d'un espaceur entre le sucre et le phényle conduit, par rapport au composé sans espaceur, à une augmentation nette de la surface apolaire, combinée à une légère augmentation de la surface polaire. Logiquement, plus la longueur de l'espaceur augmente (TPP(p OMEGO α ManOH)₃, TPP(p O(CH₂)₃O α ManOH)₃, TPP(p ODEGO α ManOH)₃), plus les surfaces polaire et hydrophobe augmentent. Sur la figure 28, à l'exception des dérivés avec substituant sucre fucose, ces dérivés se répartissent donc selon la longueur de l'espaceur.

3.2.1.2.2 > *Effet de la nature du sucre*

Malgré la différence de conformation du sucre, les deux composés portant des fucoses (TPP(p OMEGO α DFucOH)₃ et TPP(p OMEGO α LFucOH)₃) présentent des CHI identiques. En revanche, ils se distinguent nettement de la TPP(p OMEGO α ManOH)₃. Cette différence est due à la structure particulière des fucoses par rapport aux autres sucres, les premiers possédant un hydroxyle de moins que les seconds. La comparaison des trois composés avec espaceur DEG permet de classer les autres sucres testés dans l'ordre suivant de lipophilie croissante : galactose < glucose < mannose. La comparaison entre la TPP(p O β GalOH)₄ et la TPP(p O β GluOH)₄ confirme l'ordre pour les deux premiers sucres. Le calcul des surfaces accessibles au solvant polaire et apolaire permet de rendre compte du comportement particulier des dérivés portant un sucre fucose, mais pas des différences entre les autres sucres.

3.2.2 > Comparaison des CHI avec les estimations *in silico* du log P

Les commentaires sur les valeurs de CHI déterminées expérimentalement ont permis

3 > Lipophilie des différentes espèces

de mettre en évidence de nombreux effets de structure au sein de la série de composés étudiés, effets qui constituent des difficultés plus ou moins grandes pour les différents logiciels testés (Tableau 10). Les corrélations entre les valeurs de CHI déterminées expérimentalement et chacune des méthodes d'estimation *in silico* du log P testées sont proches pour toutes les méthodes testées, puisque les coefficients de détermination varient de 0,73 (pour VG) à 0,76 (pour XLOGP3). Les différentes méthodes présentent des résultats fortement corrélés entre eux, avec des coefficients de détermination compris entre 0,90 et 0,99 selon les couples de méthodes comparés.

L'examen des valeurs de log P estimés montrent de nettes différences entre les méthodes. Le plus frappant est la différence entre les valeurs de log P, puisque ces valeurs présentent des écarts voisins de 3 quelque soit le composé considéré. L'impact de la substitution est également très variable d'une méthode à l'autre. En effet, si l'on se limite aux composés pour lesquels une valeur de CHI a pu être déterminée, on remarque que les log P s'échelonnent sur un intervalle de 5,06 unités pour la méthode ALOGPS (de 6,88 pour la TPP(p OH)₄ à 1,82 pour la TPP($mO\beta$ GluOH)₄) alors que cet intervalle atteint 10,66 pour la méthode VG (de 10,38 pour les TPP(m OH)₄ et TPP(p OH)₄ à -0,28 pour les TPP($mO\beta$ GluOH)₄, TPP($pO\beta$ GalOH)₄ et TPP($pO\beta$ GluOH)₄).

Toutes les méthodes présentées ici permettent de rendre compte de l'effet du nombre de substituants et de la plus forte lipophilie des hydroxylés par rapport aux glycoconjugués correspondants. Si l'effet de la nature du substituant (hydroxyle ou sucre) est correctement prédit, différencier l'effet des différents types de sucre est plus difficile : la lipophilie particulière des sucres fucose est correctement rendue, mais pas l'ordre de lipophilie entre les autres sucres. En effet, ces sucres ne se distinguent que par leur isomérisation, phénomène non pris en compte dans le calcul des différentes méthodes testées. Les effets de l'insertion d'un espaceur et de la variation de sa nature ne sont correctement prédits que par le logiciel ALOGPS, les autres méthodes prédisant une diminution de lipophilie due à l'espaceur (cas de miLogP, XLOGP3, VG et PHYS) ou étant incapables de classer correctement les différents espaceurs (cas de KLOP).

Le plus grand défi pour les méthodes *in silico* est de rendre compte de l'effet de la position du substituant. Seules deux méthodes conduisent à des résultats différents pour les deux isomères *mé*ta et *para* : il s'agit des méthodes ALOGPS et miLogP. En effet, les autres méthodes, basées sur une fragmentation à l'échelle atomique, ne peuvent distinguer ces isomères de position. Si les modes de calcul sur lesquels s'appuient les méthodes ALOGPS (méthode globale) et miLogP (fragmentation par groupes) permettent de distinguer l'isomérisation de position, la lipophilie relative des deux isomères est incorrectement estimée. En effet, ces deux méthodes attribuent aux

dérivés *méta* des valeurs inférieures aux dérivés *para*. En ce qui concerne l'autre effet de position mis en évidence, le cas particulier des diglycoconjugués, les différentes méthodes testées ne permettent pas de prédire correctement les différences.

3.3 > Lipophilie des TPP sous forme protonée

3.3.1 > Variation du CHI en fonction du pH

Fuguet *et al.* ont proposé l'étude de la variation du CHI selon le pH, et ce afin de déterminer simultanément les pK régissant les équilibres existant sur l'intervalle considéré et les CHI caractéristiques des différentes espèces mises en jeu (168). En effet, le CHI mesuré à un pH donné dépend de ces différents paramètres selon la relation suivante :

$$CHI = \frac{CHI_{H_4TPP^{2+}} + 10^{s_1(pH-pK_1)} \times CHI_{H_3TPP^+} + 10^{s_1(pH-pK_1)+s_2(pH-pK_2)} \times CHI_{H_2TPP}}{1 + 10^{s_1(pH-pK_1)} + 10^{s_1(pH-pK_1)+s_2(pH-pK_2)}} \quad \text{(Equation 23)}$$

où s_1 et s_2 sont des facteurs empiriques exprimant l'effet de l'acétonitrile sur le pH du tampon. En effet, le pourcentage d'acétonitrile modifie le pH de la phase mobile ; plus ce pourcentage est élevé, plus le pH de la phase mobile s'écartera du pH du tampon. Les tampons utilisés ont des pH variant de 2,0 (pH le plus acide supporté par la phase stationnaire) à 6,9. Etant donnés les pK des TPP déterminés précédemment, cette gamme de pH devrait être suffisante pour déterminer les CHI des différentes formes. Les mesures de pH réalisées montrent que, en raison de cette présence d'acétonitrile, la gamme de pH utilisée (pH de 2,0 à 6,9) correspond, en réalité, à un intervalle de pH entre 2,8 et 7,5 en présence de 40 % d'acétonitrile et à un intervalle de pH entre 4,7 et 8,6 en présence de 80 % d'acétonitrile. Ainsi, plus un composé sera lipophile, plus il sera élué à un fort pourcentage d'acétonitrile et plus l'intervalle de pH étudié s'écartera des valeurs nécessaires à l'observation des formes protonées des dérivés de TPP.

Les phénomènes décrits ci-dessus expliquent que l'étude soit plus difficile pour les composés les plus lipophiles ou ceux ayant des pK plus faibles. A l'inverse, l'étude est particulièrement adaptée aux composés tétraglycoconjugués en *para*, TPP($pO\beta GalOH$)₄ et TPP($pO\beta GluOH$)₄ qui combinent les avantages d'une élution à un faible pourcentage d'acétonitrile et des pK parmi les plus élevés. Ces deux composés présentent un comportement analogue, avec des CHI respectivement égaux à $19,7 \pm 0,2$ et $22,1 \pm 0,4$ pour les TPP($pO\beta GalOH$)₄ et TPP($pO\beta GluOH$)₄ dans les conditions les plus acides (Figure 31). Les faibles variations pour des tampons entre 2 et 2,5 conduisent à attribuer cette valeur à la forme diprotonée, aucune hypothèse ne pouvant être faite quant au CHI de la forme H₃TPP⁺ pour ces deux composés. La

3 > Lipophilie des différentes espèces

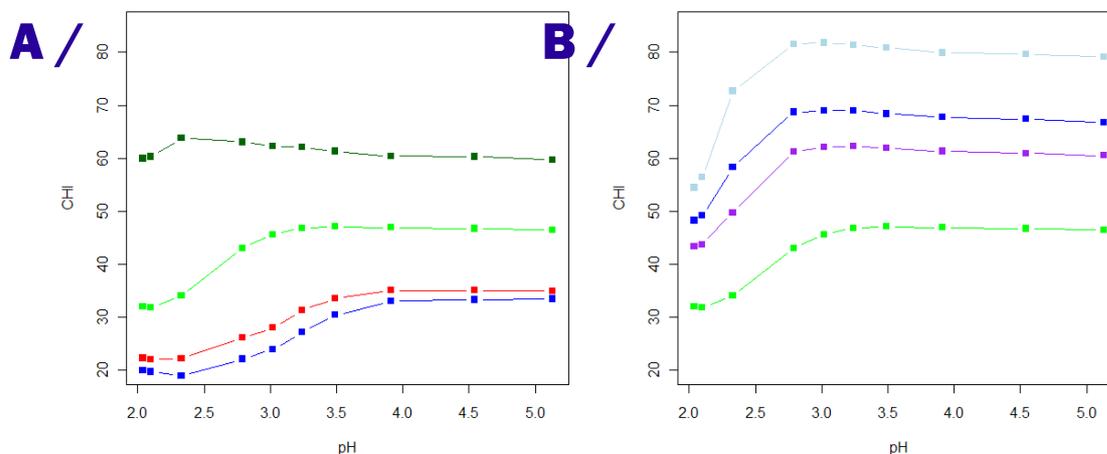


Figure 31 - Variation de CHI en fonction du pH

A / TPP($pO\beta$ GluOH)₄ en rouge ; TPP($pO\beta$ GalOH)₄ en bleu ; TPP($pO\beta$ GalOH)₃ en vert ; TPP($mO\beta$ GluOH)₃ en vert foncé.

B / TPP($pO\beta$ GalOH)₃ en vert ; TPP($pOMEGO\alpha$ ManOH)₃ en violet ;

TPP($pODEGO\alpha$ ManOH)₃ en bleu ; TPP($pO(CH_2)_3O\alpha$ ManOH)₃ en bleu clair

variation de CHI entre les formes H_2 TPP et H_4 TPP²⁺ peut sembler relativement faible. Elle pourrait s'expliquer par le changement de conformation du noyau TPP sous l'effet de la diprotonation.

Pour la TPP($pO\beta$ GalOH)₃, la plus forte lipophilie et les pK plus faibles conduisent à une absence de plateau aux pH les plus bas. Il est donc difficile pour ce composé d'obtenir un milieu suffisamment acide pour isoler la forme H_4 TPP²⁺. Un problème similaire se pose pour les composés possédant un espaceur : les composés présentant des pK proches, plus les composés sont lipophiles, plus il est difficile de mettre en évidence la forme H_4 TPP²⁺. L'étude de ces composés permet de mettre en évidence une variation de CHI en fonction du pH plus importante pour les molécules les plus lipophiles et une légère augmentation de CHI à des pH intermédiaires entre les pH les plus acides et les pH neutres. Le changement de conformation du tétrapyrrole dès la première protonation pourrait expliquer ce phénomène. Toutefois, si cette observation s'applique aussi à la plupart des autres composés (comme la TPP($mO\beta$ GluOH)₃), attribuer cette augmentation à une lipophilie supérieure de la forme H_3 TPP⁺ reste délicat.

3.3.2 > Prédiction *in silico*

Si l'approche chromatographique présente des limites pour estimer la lipophilie des formes protonées, c'est aussi le cas avec plusieurs des outils *in silico* testés ici (Tableau 12). Ainsi, les trois méthodes proposées par *Marvin* conduisent à une différence constante entre le log P de la forme H_4 TPP²⁺ et celui de la forme H_2 TPP, et ce quelque soit la structure considérée (écart de

Composé	Forme H ₄ TPP ²⁺			Forme H ₃ TPP ⁺		
	ALOGPs	miLogP	XLOGP3	ALOGPs	miLogP	XLOGP3
TPP	3,24	8,67	10,77	3,61	8,75	10,59
TPP(<i>m</i> OH) ₃	3,12	7,45	9,70	3,62	7,61	9,52
TPP(<i>m</i> OH) ₄	3,11	6,95	9,35	3,68	7,11	9,17
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₁	2,89	6,67	8,61	3,17	6,83	8,43
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-10	2,59	4,38	6,45	3,00	4,54	6,27
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₂ 5-15	2,59	4,38	6,45	2,99	4,54	6,27
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	2,47	2,09	4,29	2,48	2,25	4,11
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄	2,04	-0,20	2,13	1,96	-0,04	1,95
TPP(<i>p</i> OH) ₃	3,07	7,53	9,70	3,56	7,68	9,52
TPP(<i>p</i> OH) ₄	3,02	7,05	9,35	3,58	7,20	9,17
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₁	2,88	6,70	8,61	3,16	6,85	8,43
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-10	2,54	4,43	6,45	2,94	4,59	6,27
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₂ 5-15	2,54	4,43	6,45	2,94	4,59	6,27
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	2,35	2,16	4,29	2,49	2,32	4,11
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₄	2,12	-0,10	2,13	1,96	0,05	1,95
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	2,12	-0,10	2,13	1,96	0,05	1,95
TPP(<i>p</i> OMEGOαLFucOH) ₃	2,84	4,86	5,34	3,27	5,01	5,17
TPP(<i>p</i> OMEGOαDFucOH) ₃	2,84	4,86	5,34	3,27	5,01	5,17
TPP(<i>p</i> OMEGOαManOH) ₃	2,22	1,83	3,85	2,43	1,99	3,67
TPP(<i>p</i> ODEGOβGalOH) ₃	2,20	1,22	3,40	2,47	1,38	3,22
TPP(<i>p</i> ODEGOβGluOH) ₃	2,20	1,22	3,40	2,47	1,38	3,22
TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	2,20	1,22	3,40	2,47	1,38	3,22
TPP(<i>p</i> O(CH ₂) ₃ OαManOH) ₃	2,35	2,93	4,92	2,64	3,09	4,74
TPP[<i>p</i> -dendr(DEGOH) ₃]	2,35	4,54	5,60	2,67	4,70	5,42
TPP[<i>p</i> -dendr(DEGOαManOH) ₃]	1,57	-0,87	0,81	1,78	-0,71	0,63
TPP[<i>p</i> -dendr(MEGOαManOH) ₃]	1,56	-0,25	1,26	1,75	-0,10	1,08

Tableau 12 - Valeurs de log P calculées des formes protonées

3,34 pour la méthode VG, 3,94 pour KLOP et 2,90 pour PHYS). Cette différence constante, contradictoire *a priori* avec les résultats présentés sur la figure 31, résulte du mode de calcul du log P, basé sur une fragmentation par atome, ce qui explique que la même observation s'applique aux résultats obtenus avec la méthode XLOGP3. Mais alors que les trois méthodes proposées par Marvin parvenaient à correctement estimer la diminution de lipophilie sous l'effet de la diprotonation, ce n'est pas le cas avec la méthode XLOGP3, qui prédit une légère augmentation de lipophilie sous l'effet de la protonation.

Seules les deux dernières méthodes utilisées, ALOGPS et miLogP, permettent de prédire un effet de la protonation sur la lipophilie variable selon la structure considérée. Cependant

3 > Lipophilie des différentes espèces

la méthode miLogP prédit un écart entre les lipophilies des formes H_2TPP et H_4TPP^{2+} identique pour tous les composés portant au moins deux sucres. De plus, cette méthode prédit une variation de lipophilie plus faible pour les composés les plus lipophiles, en contradiction avec les résultats expérimentaux.

La méthode ALOGPS ne présente pas ces deux inconvénients. Ainsi, plus une molécule est lipophile, plus sa diminution de lipophile suite à la diprotonation sera grande. Ceci se traduit par une diminution des écarts entre les lipophilies des dérivés étudiés. Les résultats obtenus par cette méthode semblent donc mieux concorder avec l'approche expérimentale. Cependant, il faut noter que cette méthode conduit à une augmentation de la lipophilie pour les tétraglycoconjugués sous l'effet de la diprotonation. L'étude de la forme H_2TPP avait montré que ALOGPS était capable de rendre compte de l'augmentation de lipophilie due à l'insertion de l'espaceur mais incapable de prédire correctement l'effet de position *méta* / *para*. La comparaison des résultats sur la forme H_4TPP^{2+} montre que si la plus forte lipophilie des dérivés *méta* est correctement prédite, l'effet de l'insertion de l'espaceur n'est plus correctement pris en compte. Ainsi, si la $TPP(mOH)_4$ a un log P ALOGPS supérieur à son isomère *para* (3,11 contre 3,02), la $TPP(pODEGO\beta GalOH)_3$ présente un log P inférieur à la $TPP(pO\beta GalOH)_3$ (2,20 contre 2,35). Malgré ces problèmes particuliers, si l'on considère les résultats de prédiction sur les trois formes, la méthode ALOGPS semble être la meilleure des méthodes étudiée pour avoir une première estimation de la lipophilie des dérivés de TPP, conclusion concordante avec celle de Mannhold *et al.* (161).

Si le processus de diprotonation si particulier des TPP avait déjà été décrit par le passé, l'étude présentée ici a permis de préciser l'effet de la substitution sur la basicité du noyau TPP. Elle a été rendue possible par une approche associant la spectroscopie électronique à des méthodes de traitement des données appropriées. Selon le mode de substitution, les TPP présentent également une vaste étendue de lipophilies. Les différents modes de substitution envisagés sont donc susceptibles d'affecter de manière très différente le devenir *in vivo* du photosensibilisateur dans l'organisme, et notamment ses possibilités d'interactions avec les protéines et les structures lipidiques.

>>>

Des vaisseaux sanguins à la cellule tumorale

Distribution plasmatique &

Localisation subcellulaire

>>>

Une fois injecté au patient, le photosensibilisateur se retrouve dans un milieu aqueux, environnement défavorable à sa bonne solubilisation. Ceci favorise sa liaison aux structures présentes

dans son environnement, telles que les lipoprotéines et protéines plasmatiques. Ces interactions précoces dans le plasma conditionnent son devenir dans l'organisme, et notamment sa capacité à atteindre le tissu tumoral. Elles s'expliquent par la forte lipophilie des porphyrines. La lipophilie pourrait également être impliquée dans la localisation subcellulaire des photosensibilisateurs, même si d'autres phénomènes sont également évoqués : charge, symétrie,... En affectant différentes propriétés du macrocycle TPP, et notamment sa lipophilie, la glycoconjugaison est donc susceptible d'affecter deux étapes-clés de la distribution du photosensibilisateur dans l'organisme : 1. la liaison du photosensibilisateur aux lipoprotéines & protéines plasmatiques, qui influence la distribution tissulaire ; 2. la localisation du photosensibilisateur dans la cellule tumorale, qui régit le mécanisme d'action.

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

Les principaux transporteurs plasmatiques connus des photosensibilisateurs sont les lipoprotéines (LDL et HDL principalement), et l'albumine. Cette dernière est la protéine la plus abondante dans le plasma humain. Polypeptide unique de 585 acides aminés, elle est classiquement décrite comme constituée de trois domaines : I (acides aminés 1 à 195), II (196 à 383) et III (384 à 585). La structure tridimensionnelle de la molécule d'albumine peut être comparée à la forme d'un cœur, s'inscrivant dans un volume de $80 \times 80 \times 30$ angströms. Les domaines I et II forment un T, le sous-domaine IIa interagissant avec les sous-domaines Ia et Ib à la fois par des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogène. Le domaine III interagit uniquement avec le sous-domaine IIb. L'albumine comporte donc un large canal séparant le sous-

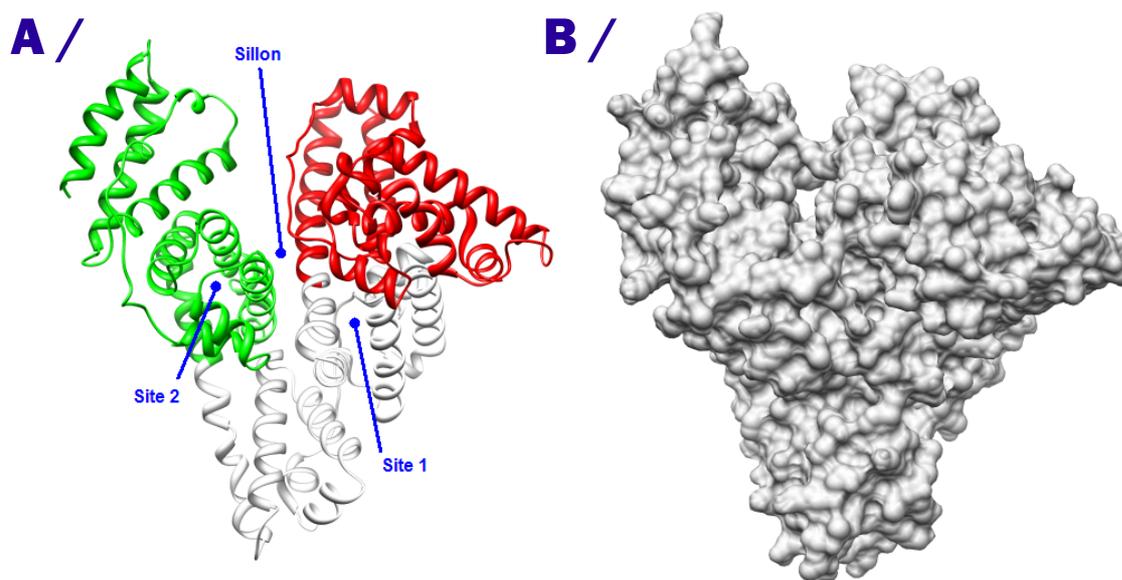


Figure 32 - Structure de la molécule d'albumine

A / Domaines I en rouge, II en blanc, III en vert ; B / Représentation en surface

domaine Ib des sous-domaines IIIa et IIIb (Figure 32) (169). Deux poches hydrophobes présentent un intérêt tout particulier puisqu'elles constituent des sites de fixation privilégiés des médicaments (170). Le premier site de fixation des xénobiotiques comprend les six hélices du sous-domaine IIa et un enchaînement boucle-hélice du sous-domaine Ib (résidus 148-150) (170). Le second site est composé des six hélices du sous-domaine IIIa. Point commun entre les deux sites, leur structure globale, une cavité principalement hydrophobe avec quelques résidus polaires. Le site 2 se distingue néanmoins du site 1 par sa forme, sa taille et sa polarité, facteurs expliquant les spécificités d'interactions des xénobiotiques entre ces deux sites (170).

La structure de l'albumine reste relativement simple en comparaison des lipoprotéines, assemblages complexes de lipides et protéines. Le rôle physiologique des lipoprotéines est principalement le transport des lipides qu'elles contiennent dans l'organisme. Leur modèle structural, des complexes micellaires avec une monocouche de surface amphiphile et un cœur lipidique hydrophobe, date de 1968 (171). Différentes classes de lipoprotéines (LDL, HDL, ...) ont été définies selon leur densité, propriété sur laquelle sont basées les techniques de séparation (Tableau 13). Ces classes se distinguent par leur diamètre (les lipoprotéines sont le plus souvent décrites comme étant sphériques, bien qu'une forme discoïdale ne puisse être exclue (172)) et par leur rapport triacylglycérols / protéine, ces deux facteurs déterminant la densité (Tableau 2). Les triacylglycérols ne sont qu'une des familles de lipides contenus dans les lipoprotéines. Celles-ci contiennent également du cholestérol (estérifié ou non) et des phospholipides, en proportion

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

variable selon la lipoprotéine considérée. Les composants protéiques, baptisés apoprotéines (ou apolipoprotéines), varient d'une lipoprotéine à l'autre ; ils jouent un rôle déterminant dans la structure de l'assemblage et dans son métabolisme (par exemple, par leurs interactions avec les récepteurs présents à la surface des membranes cellulaires) (173).

Les LDL sont définies comme étant la fraction des lipoprotéines plasmatiques de densité comprise entre 1,019 et 1,063 g.mL⁻¹. Leur diamètre moyen est de 25 nm. Leur composition protéique se distingue de celle des autres lipoprotéines par la présence d'Apo B100. Cette apoprotéine, insoluble dans l'eau, comporte 4536 acides aminés, ce qui en fait l'une des plus grandes protéines monomériques connues. Une LDL ne contient qu'une seule molécule d'Apo B100, insérée dans la monocouche lipidique à la surface de la lipoprotéine. Cette monocouche de surface est constituée essentiellement de phospholipides (700 molécules, majoritairement des phosphatidylcholines) et de cholestérol non estérifié (400 molécules). Le cœur hydrophobe se compose de triglycérides (170 molécules) mais surtout de cholestérol (200 sous forme non estérifiée, 1600 sous forme estérifiée). Par leur richesse en cholestérol, les LDL constituent le transporteur essentiel de ce lipide vers les tissus (174).

	LDL	HDL
Densité (g.mL ⁻¹)	1,006-1,063	1,063-1,210
Diamètre (Å)	250	70 – 120
Proportion de lipides (% m/m)	80	44
<i>dont</i> Triacylglycérols	10	6
Cholestérol estérifié	50	40
Cholestérol non estérifié	11	7
Phospholipides	29	46

Tableau 13 - Principales caractéristiques des lipoprotéines

Les HDL sont définies comme étant la fraction des lipoprotéines plasmatiques de densité comprise entre 1,063 et 1,210 g.mL⁻¹. Leur taille est inférieure à celle des LDL (diamètre moyen de 7 à 12 nm). Parmi les protéines présentes dans les HDL, la plus importante est l'Apo A-I, qui représente en masse 70 % du contenu protéique. Cette apoprotéine, séquence de 243 acides aminés, est amphiphile ; son pôle hydrophobe interagit avec les lipides de la lipoprotéine, son pôle hydrophile avec l'eau. De nombreuses autres apoprotéines peuvent être présentes dans les HDL, parmi lesquelles : l'apo A-II (15 à 20 % du contenu protéique), l'apo C, l'apo E, l'apo D, l'apo M ou l'apo A-IV. Les HDL sont moins riches en lipides que les autres lipoprotéines, même si leur composition lipidique exacte varie selon le type de HDL. D'une manière générale, les lipides les plus nombreux sont le cholestérol (deux tiers sous forme estérifiée, un tiers sous forme non

estérifiée) et les phospholipides. Les triglycérides sont présents en quantité plus restreinte (171).

1.1 > Matériel & Méthodes

1.1.1 > Produits chimiques & biologiques

La TPP(*p*OH)₄ est fournie par Sigma-Aldrich® (Allemagne), la TPP(*m*OH)₄ par Frontier Scientific® (Etats-Unis). Les autres TPP, hydroxylées ou glycoconjuguées, ont été synthétisées par l'équipe du Dr Philippe Maillard au sein de l'unité UMR 176 CNRS à l'Institut CURIE. Le tampon PBS pH 7,4 est fourni par Sigma-Aldrich® (Allemagne), le diméthylsulfoxyde (DMSO) et le méthanol par les laboratoires Prolabo® (France), le bromure de potassium (KBr) par Merck® (Allemagne). L'albumine de sérum humain provient de chez Sigma-Aldrich® (Allemagne). Deux références différentes (correspondant à deux niveaux de pureté différents) ont été testées : une albumine sans acides gras (teneur en acides gras inférieure à 0,007 % (m/m)) notée HSA et une albumine d'un niveau de pureté inférieure, contenant des acides gras (pureté électrophorétique supérieure à 99 %) notée HSALIP. L'eau ultrapure est obtenue avec un système de purification Alpha-Q (Millipore®, France). Le plasma est obtenu à partir de sang prélevé lors de saignées chez des sujets normolipémiques atteints d'hémochromatose. Les ultracentrifugations ont été réalisées, au sein du service de Biochimie de l'Hôpital-Européen-Georges-POMPIDOU (AP-HP, Paris), par l'équipe du Professeur Jean-Louis PAUL.

1.1.2 > Distribution plasmatique

Deux protocoles d'ultracentrifugation (présentés dans le paragraphe 1.1.2.1) ont été utilisés pour les expériences de distribution plasmatique, décrites dans les paragraphes 1.1.2.2 et 1.1.2.3.

1.1.2.1 > *Protocoles d'ultracentrifugation*

1.1.2.1.1 > *Ultracentrifugation à la densité de 1,21 g.mL⁻¹*

Le plasma est alourdi à une densité de 1,21 g.mL⁻¹ avec du KBr (320,2 mg de KBr pour un millilitre de plasma). Un volume de 3 mL de plasma alourdi est introduit dans un tube Optiseal Polyallomer (Beckman®). Une solution de KBr de densité 1,21 g.mL⁻¹ est utilisée pour compléter le volume du tube. Les tubes sont centrifugés pendant 8 heures, à la vitesse de 90 000 rpm et à la température de + 4°C dans une ultracentrifugeuse Beckman XL 90 munie d'un rotor NVT 90. Une

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

seringue permet alors de récupérer les trois phases isolées, respectivement de haut en bas : les lipoprotéines totales (densité inférieure à $1,21 \text{ g.mL}^{-1}$), une solution de KBr (densité égale à $1,21 \text{ g.mL}^{-1}$), les protéines plasmatiques (densité supérieure à $1,21 \text{ g.mL}^{-1}$).

1.1.2.1.2 > *Ultracentrifugation en gradient de densité*

Les couches suivantes sont coulées à l'intérieur d'un tube *Beckman Polyallomer*[®] dans l'ordre des densités croissantes : 1) une solution de chlorure de sodium (NaCl) $1,006 \text{ g.mL}^{-1}$ (1 mL), 2) une solution de KBr $1,019 \text{ g.mL}^{-1}$ (2,5 mL), 3) une solution de KBr $1,042 \text{ g.mL}^{-1}$ (2,5 mL), 3) une solution de KBr $1,063 \text{ g.mL}^{-1}$ (2,5 mL), 4) une fraction des lipoprotéines totales (volume x en mL), 5) une solution de KBr $1,21 \text{ g.mL}^{-1}$ (volume de $3 - x$ mL). Après 24 heures d'ultracentrifugation à la vitesse de 38 000 rpm (ultracentrifugeuse XL 90 munie du rotor SW 41), la fraction supérieure (densité inférieure à $1,006 \text{ g.mL}^{-1}$), correspondant aux lipoprotéines de très basse densité (VLDL), est prélevée. Les fractions suivantes sont séparées à l'aide d'un système comportant un *ISCO - Density Gradient Fractionator Model 185*, un collecteur *LKB Bromma - 2212 Hélicrac* et un détecteur *LKB Bromma - 2238 Uvicord S II* relié à un enregistreur *LKB Bromma - 2210 Recorder 1-Channel*. Les fractions sont identifiées à partir des mesures d'absorbance à 280 nm.

1.1.2.2 > *Approche qualitative par spectroscopie*

Une ultracentrifugation à la densité de $1,21 \text{ g.mL}^{-1}$ permet de séparer lipoprotéines et protéines. Ces fractions sont diluées avec la solution de KBr $1,21 \text{ g.mL}^{-1}$ de manière à obtenir une concentration en lipoprotéines ou protéines voisine de la concentration plasmatique initiale. Une solution de TPP dans le DMSO est diluée au centième dans ces fractions ou le plasma (concentration finale en TPP égale à $3 \mu\text{M}$). Les échantillons sont mis à incuber à 37°C pendant 24 heures avant enregistrement des spectres.

Absorption

Pour le plasma et chacune des deux fractions, les spectres des échantillons non dilués sont enregistrés à l'aide d'un spectrophotomètre *Varian*[®] Cary Bio 100 (Australie). La ligne de base est enregistrée sur un plasma ou des fractions témoin (sans TPP). Les spectres sont enregistrés entre 350 et 700 nm (trajet optique de 1 cm, fente optique de 2 nm).

Fluorescence

Les mesures sont effectuées sur un spectrofluorimètre *Perkin-Elmer LS50B*. Les cuves utilisées sont des cuves en quartz réduites de 4 mm. Un spectre de fluorescence est enregistré, de 600 à 800 nm, sur une dilution au vingtième dans le tampon PBS pH 7,4. La longueur d'onde

d'excitation est celle du maximum de la bande de Soret (fentes d'excitation et d'émission égales à 5 nm).

1.1.2.3 > **Évaluation quantitative**

Pour chaque TPP étudiée, 30 µL d'une solution dans le DMSO sont ajoutés à 2970 µL de plasma. La concentration finale en TPP, 10^{-6} M, est proche des taux plasmatiques classiquement rencontrés lors d'un traitement PDT, par exemple avec la *m*THPC (175). Après incubation à 37°C pendant 24 heures, les lipoprotéines et protéines sont séparées par ultracentrifugation à la densité de 1,21 g.mL⁻¹. La fraction des lipoprotéines totales fait alors l'objet d'une seconde ultracentrifugation, cette fois-ci en gradient de densité, afin de séparer quatre fractions : les VLDL, les lipoprotéines de densité intermédiaire (IDL), les LDL et les HDL. Les différentes fractions sont recueillies dans des tubes gradués, afin de mesurer leur volume. A 100 µL de chaque fraction est ajouté un volume de 900 µL de mélange méthanol – diméthylsulfoxyde 4 : 1 (v/v). Les tubes sont vortexés puis centrifugés pendant 10 minutes à 3000 rpm. Un spectre de fluorescence est enregistré, de 600 à 800 nm, sur le surnageant après une dilution supplémentaire dans le solvant d'extraction si nécessaire. La longueur d'onde d'excitation est celle du maximum de la bande de Soret, les fentes d'excitation et d'émission sont toutes les deux égales à 7,0 nm. L'intensité maximale de fluorescence (bande voisine de 650 nm) est utilisée pour calculer la distribution de la TPP, en corrigeant par le volume de la fraction.

1.1.3 > **Constantes d'affinité pour l'albumine & les lipoprotéines**

1.1.3.1 > **Préparation des fractions de lipoprotéines**

Le plasma humain est ajusté à une densité de 1,019 g.mL⁻¹ avec du bromure de potassium (KBr). Après 24 heures d'ultracentrifugation (45 000 rpm à + 4°C), le surnageant (correspondant aux VLDL) est retiré. Le reste est alourdi à la densité de 1,063 g.mL⁻¹ avec du KBr solide. Après 48 heures d'ultracentrifugation (45 000 rpm à + 4°C), on récupère deux fractions : la fraction supérieure correspond aux LDL, la fraction inférieure aux HDL. Les concentrations molaires en lipoprotéines ont été estimées selon la méthode proposée par Ohnishi *et al.* (176). Cette méthode repose sur l'hypothèse que HDL et LDL ont des masses molaires respectivement égales à $1,8 \cdot 10^5$ et $2,3 \cdot 10^6$ Da et des proportions d'apoprotéines respectivement égales à 50 % et 21 % de leur masse.

$$[HDL] = \frac{[apoprotéine (g.L^{-1})]}{0,50 \times 1,8 \cdot 10^5} \quad \text{(Equation 24)}$$

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

$$[LDL] = \frac{[\text{apoprotéine} (\text{g.L}^{-1})]}{0,21 \times 2,3 \cdot 10^6} \quad (\text{Equation 25})$$

1.1.3.2 > **Enregistrement des spectres**

Les échantillons sont préparés à partir d'une solution-mère de TPP dans le DMSO, diluée dans le tampon phosphate pH 7,4. La concentration finale en TPP est de $5 \cdot 10^{-7}$ M pour l'étude par absorption, de 10^{-7} M dans le cas de la fluorescence. La proportion de DMSO est égale à 0,5 % (v/v). Les concentrations de transporteur varient de 0 à $2 \cdot 10^{-4}$ M. Les mesures sont réalisées après 24 heures d'incubation à 37°C. Les spectres d'absorption sont enregistrés de 750 à 350 nm (chemin optique de 1 cm) à l'aide d'un spectrophotomètre Varian® Cary Bio 100 (Australie). Les spectres de fluorescence sont enregistrés, de 600 à 800 nm, en fixant la longueur d'onde d'excitation à 420 nm (fentes d'excitation et d'émission de 10,0 nm). Les mesures sont effectuées sur un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS50B. Les cuves utilisées sont des cuves en quartz réduites de 4 mm. L'exploitation des résultats est réalisée à l'aide du logiciel R (87).

1.1.4 > **Modélisation des interactions avec l'albumine**

L'ensemble des structures d'albumine humaine disponibles sur la RCSB Protein Data bank ont été téléchargées et comparées à l'aide du logiciel *UCSF Chimera* (177). Les critères de sélection incluaient le nombre de résidus manquants et la résolution des différentes structures. Pour obtenir les différents ligands, les substituants ont été ajoutés, à l'aide du logiciel *UCSF Chimera*, à une structure de la TPP disponible dans la base de données *Cambridge Structural Database* (référence = MOLFEZ) (178). Les ligands ont été préparés pour la modélisation à l'aide du logiciel *AutoDock Tools*, notamment pour sélectionner les torsions actives (les quatre liaisons entre les phényles et les carbones en méso, toutes les liaisons entre le phényle et le résidu sucre). Les calculs ont été réalisés à l'aide de l'exécutable *Java PaDEL-ADV*, basé sur le logiciel *Autodock Vina* (179). Les résultats de modélisation ont été analysés à l'aide du logiciel *UCSF Chimera*.

1.2 > Résultats

1.2.1 > **Approche qualitative par spectroscopie**

1.2.1.1 > **Mise en évidence des interactions**

Bien que le plasma soit composé à plus de 90 % d'eau, les spectres d'absorption

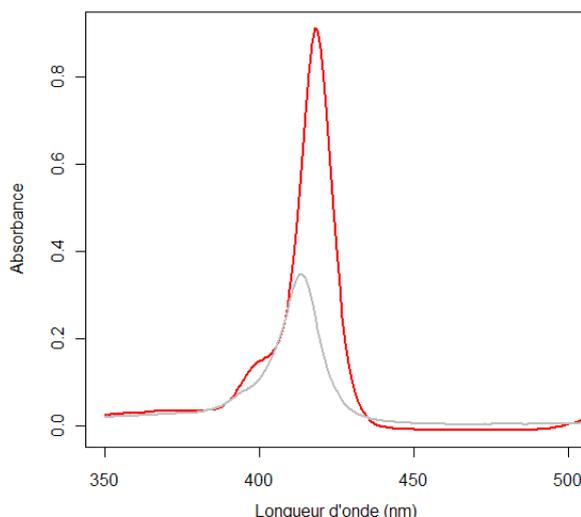


Figure 33 - Spectre d'absorption de la TPP($mO\beta\text{GluOH}$)₄ dans le plasma

Spectres dans le plasma en rouge ; dans l'eau en gris. [TPP] = $3 \cdot 10^{-6}$ M

obtenus dans ce milieu se distinguent nettement de ceux obtenus en milieu aqueux. A titre d'exemple, les spectres de la TPP($mO\beta\text{GluOH}$)₄ sont présentés sur la figure 33 : la bande de Soret est étroite et intense pour le spectre enregistré dans le plasma, très différente de celle de la forme agrégée en milieu aqueux. Les différents constituants du plasma permettent donc de solubiliser les TPP en évitant la formation d'agrégats.

1.2.1.2 > Identification des transporteurs plasmatiques

La sensibilité des spectres électroniques des TPP à son environnement permet non seulement de mettre en évidence les interactions dans le plasma, mais aussi d'identifier la fraction (lipoprotéine ou protéine) à laquelle un photosensibilisateur se lie préférentiellement par comparaison des spectres dans le plasma à ceux obtenus dans chacune des fractions.

Substitution en méta et liaison aux lipoprotéines

Pour la TPP($mO\beta\text{GluOH}$)₄, le spectre d'absorption enregistré dans la fraction protéines présente, par rapport au spectre enregistré dans le plasma, une bande de Soret légèrement décalée vers le rouge et plus large (Figure 34A). Le spectre enregistré dans la fraction lipoprotéines présente lui une bande de Soret fine et se superpose quasiment parfaitement à celui obtenu en milieu plasmatique. Ce dérivé substitué en *méta* doit donc être lié quasi-exclusivement aux lipoprotéines dans le plasma.

Substitution en para et affinité pour les protéines

En ce qui concerne les dérivés de la série *para*, tels que la TPP($pO\beta\text{GalOH}$)₄, la

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

séparation des deux bandes est très nette sur le spectre de fluorescence (Figure 34B) obtenu dans la fraction protéines. En revanche, dans le cas de la fraction lipoprotéines, la bande à 712 nm ne représente plus qu'un épaulement de la bande principale. Le spectre en milieu plasmatique est très proche de celui de la fraction protéines. Il est donc probable que ce dérivé substitué en *para* se lie principalement aux protéines plasmatiques.

Cette approche spectroscopique est un moyen simple de mettre en évidence les interactions avec les lipoprotéines et protéines plasmatiques et d'avoir un premier aperçu de la nature des transporteurs majoritaires. Cependant, une approche séparative est nécessaire pour obtenir des informations plus précises, à la fois qualitativement (distinction entre les différents types de lipoprotéines, notamment les LDL et HDL) et quantitativement (proportion du photosensibilisateur lié à chaque fraction).

1.2.2 > Evaluation quantitative

La distribution plasmatique des TPP est présentée dans le tableau 14. Pour onze des treize composés étudiés, plus de 75 % du photosensibilisateur est retrouvé dans la fraction lipoprotéique. Les deux composés faisant exception à cette observation sont les dérivés tétraglycoconjugués en position *para*, la TPP(*p*O β GalOH)₄ et la TPP(*p*O β GluOH)₄, seuls

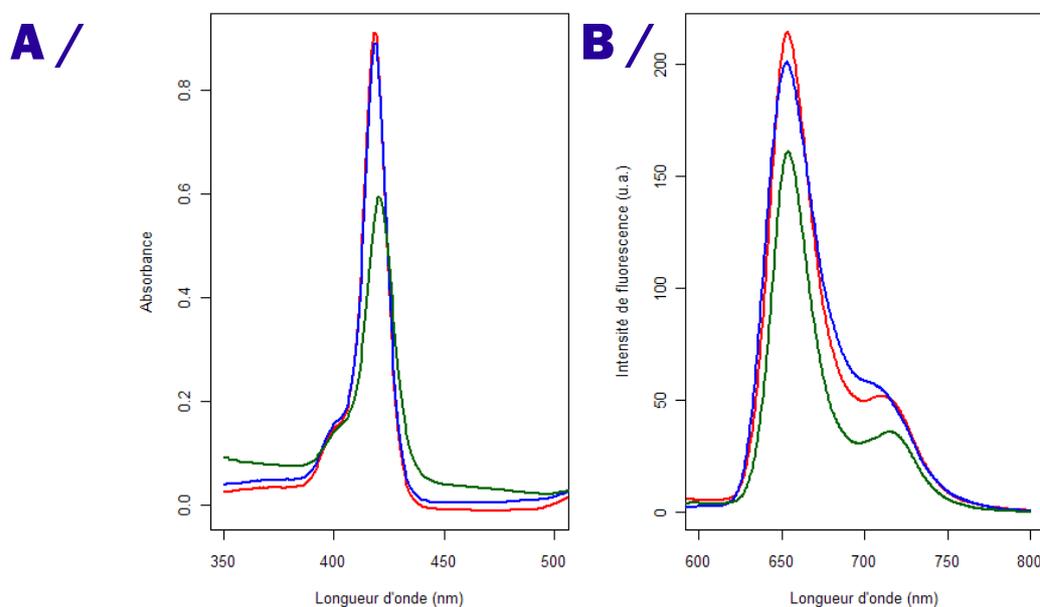


Figure 34 - Spectres des dérivés tétraglycoconjugués dans le plasma

A / Spectres d'absorption de la TPP(*m*O β GluOH)₄ ([TPP] = 3.10^{-6} M ; % (DMSO) = 1,0 %) ; B / Spectres de fluorescence de la TPP(*p*O β GalOH)₄ (λ_{exc} = 420 nm ; fentes = 5,0 / 5,0 nm ; [TPP] = $1,5.10^{-7}$ M ; % (DMSO) = 0,05 %).

Spectres dans le plasma en rouge ; dans la fraction lipoprotéines en bleu ; dans la fraction protéines en vert

Composé	Lipoprotéines			Protéines	
	Totales	dont	HDL		LDL
TPP(<i>m</i> OH) ₃	94,7 (± 1,3)		74,2 (± 5,2)	17,3 (± 4,8)	5,3 (± 1,3)
TPP(<i>m</i> OH) ₄	97,6 (± 0,4)		71,3 (± 1,0)	20,0 (± 3,0)	2,4 (± 0,4)
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	97,8 (± 1,0)		78,0 (± 4,9)	14,1 (± 3,4)	2,2 (± 1,0)
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄	95,6 (± 1,2)		60,8 (± 13,0)	22,1 (± 5,4)	4,4 (± 1,2)
TPP(<i>p</i> OH) ₃	95,0 (± 1,2)		77,6 (± 4,7)	13,4 (± 3,0)	5,0 (± 1,2)
TPP(<i>p</i> OH) ₄	96,4 (± 1,3)		86,7 (± 5,4)	7,7 (± 4,0)	3,6 (± 1,3)
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	77,3 (± 1,6)		67,7 (± 2,1)	7,1 (± 1,1)	22,7 (± 1,6)
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₄	10,4 (± 1,4)		8,7 (± 1,6)	1,4 (± 0,5)	89,6 (± 1,4)
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	13,7 (± 4,2)		11,3 (± 3,6)	1,8 (± 0,4)	86,3 (± 4,2)
TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	95,4 (± 1,3)		85,8 (± 3,0)	8,6 (± 4,0)	4,6 (± 1,3)
TPP[<i>p-dendr</i> (DEGOH) ₃]	98,3 (± 0,3)		72,8 (± 6,1)	22,3 (± 3,4)	1,7 (± 0,3)
TPP[<i>p-dendr</i> (DEGOαManOH) ₃]	97,0 (± 1,5)		75,6 (± 5,5)	16,9 (± 3,6)	3,0 (± 1,5)
TPP[<i>p-dendr</i> (MEGOαManOH) ₃]	95,7 (± 0,9)		74,0 (± 6,0)	16,4 (± 2,8)	4,3 (± 0,9)

Tableau 14 - Distribution plasmatique des photosensibilisateurs

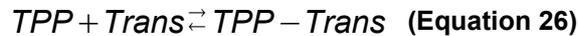
Distribution exprimée en pourcentage ; moyenne issue de trois répétitions

composés majoritairement liés à la fraction protéique (plus de 80 %). Cette distribution est particulièrement frappante dans la mesure où le dérivé tétraglycoconjugué en position *méta* se lie quasi-exclusivement aux lipoprotéines. Parmi les composés majoritairement liés aux lipoprotéines, la TPP(*p*OβGalOH)₃ présente une liaison aux protéines significativement plus élevée que les autres composés, parmi lesquels la TPP(*p*ODEGOαManOH)₃. La liaison aux protéines est voisine de 23 % pour le premier, mais est négligeable pour le second (moins de 6 %). Cette comparaison montre que l'insertion d'un espaceur entre le sucre et le phényle a un effet drastique sur la distribution plasmatique.

Parmi les lipoprotéines, les HDL constituent les principaux transporteurs plasmatiques des photosensibilisateurs. En effet, à l'exception des TPP(*p*OβGalOH)₄ et TPP(*p*OβGluOH)₄, ces lipoprotéines lient plus de la moitié du photosensibilisateur présent dans le plasma. La liaison aux LDL, si importante en PDT d'après la littérature, est toujours minoritaire. Les deux composés les moins liés aux LDL sont logiquement les TPP(*p*OβGalOH)₄ et TPP(*p*OβGluOH)₄, composés les plus liés aux protéines. Cependant, il faut noter que la TPP(*p*OβGalOH)₃, composé moins lié aux lipoprotéines, présente un taux de liaison aux LDL similaire, par exemple, à la TPP(*p*OH)₄. De même, les trois composés les plus liés aux LDL présentent des structures très différentes : TPP[*p-dendr*(DEGOH)₃] (22,3 (± 3,4) %), TPP(*m*OβGluOH)₄ (22,1 (± 5,4) %), TPP(*m*OH)₄ (20,0 (± 3,0) %).

1.2.3 > Affinité pour les lipoprotéines et l'albumine

Les interactions entre une TPP et un transporteur plasmatique (*Trans*) (LDL, HDL ou albumine) peuvent être décrites à l'aide de l'équilibre suivant :



où *TPP-Trans* représente le complexe formé par une molécule de TPP avec une molécule de transporteur. La constante d'association K_a peut alors s'écrire de la manière suivante :

$$K_a = \frac{[TPP - Trans]}{[TPP][Trans]} \quad (\text{Equation 27})$$

où $[TPP]$ est la concentration en TPP libre, $[Trans]$ la concentration en transporteur libre et $[TPP-Trans]$ la concentration en TPP liée à un transporteur.

Différentes approches sont possibles pour la détermination de constantes d'association, notamment la dialyse à l'équilibre, la chromatographie, l'électrophorèse ou la spectroscopie (180; 181). Si la spectroscopie requiert l'existence de différences spectrales entre la forme libre et la forme liée au transporteur, elle permet de s'affranchir de l'étape de séparation des deux formes. En absorption, la liaison d'une TPP telle que la TPP($pO\beta GalOH$)₃ à l'albumine conduit à une modification de son spectre avec une nette augmentation de l'absorbance. En l'absence d'albumine, le spectre de la TPP($pO\beta GalOH$)₃ présente une bande de Soret large à 417 nm, avec un net épaulement à 437 nm, signe de la présence d'agrégats de type J (88; 89) (Figure 35). L'addition d'albumine conduit à une disparition progressive de l'épaulement à 437 nm,

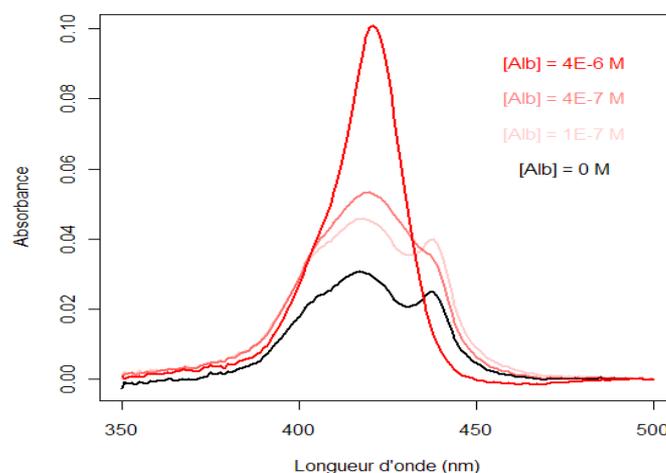


Figure 35 - Effet de la liaison à l'albumine sur l'absorption de la TPP($pO\beta GalOH$)₃

$$[TPP] = 5.10^{-7} M$$

accompagnée d'un léger déplacement vers le rouge (de 417 à 422 nm) et d'une augmentation d'intensité de la bande de Soret. A noter que l'utilisation de la spectroscopie d'absorption nécessite des concentrations relativement élevées en TPP (de l'ordre de 1 µM). En conséquence, la suite de l'étude fera donc essentiellement appel à la spectroscopie de fluorescence. En effet, cette technique permet de travailler à des concentrations plus faibles en TPP (10^{-7} M), ce qui facilite l'étude de rapports [transporteur] / [TPP] élevés.

1.2.3.1 > Traitement des données

1.2.3.1.1 > Méthodes usuelles de traitement des données spectroscopiques

Analyse d'après une variante de la méthode de Scatchard

La méthode de Scatchard repose sur une linéarisation des données expérimentales, obtenues pour une concentration fixe de ligand (c'est-à-dire de TPP). La pente et l'ordonnée à l'origine de la droite (ligand lié / ligand libre) = f (ligand lié) permet de connaître la constante d'affinité et le nombre de sites de liaison. La méthode originelle nécessite la connaissance de la concentration de ligand libre. Il est possible d'utiliser une méthode dérivée, reposant sur le calcul de la proportion de ligand (TPP) lié, proportion égale au rapport f (182).

$$f = \frac{F_{obs} - F_0}{F_{max} - F_0} \quad \text{(Equation 28)}$$

où F_{obs} est l'intensité de fluorescence enregistrée, F_0 celle de la TPP sous forme libre et F_{max} celle de la TPP sous forme liée au transporteur. Lorsque la saturation n'est pas encore atteinte, le nombre de sites occupés par molécule de transporteur (N_{occ}) peut s'écrire de la façon suivante :

$$N_{occ} = \frac{f [TPP]_{total}}{[Trans]_{total}} \quad \text{(Equation 29)}$$

A partir des deux relations précédentes et de la définition de la constante K_a , il est possible d'écrire la relation suivante :

$$\frac{[Trans]_{total}}{f} = \frac{1}{NK_a} \times \frac{1}{(1-f)} + \frac{[TPP]_{total}}{N} \quad \text{(Equation 30)}$$

où N est le nombre de sites de liaison de la TPP sur chaque molécule de transporteur, $[Trans]_{total}$ est la concentration totale en transporteur et $[TPP]_{total}$ est la concentration en TPP. Une régression linéaire du ratio $[Trans]_{total}/f$ en fonction de $1/(1-f)$ permet de calculer la pente et l'ordonnée à l'origine, puis le nombre de sites de liaison N et la constante d'affinité K . Cette relation, dérivant de l'équation 29, partage la condition de validité de cette dernière, à savoir que la saturation ne doit

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

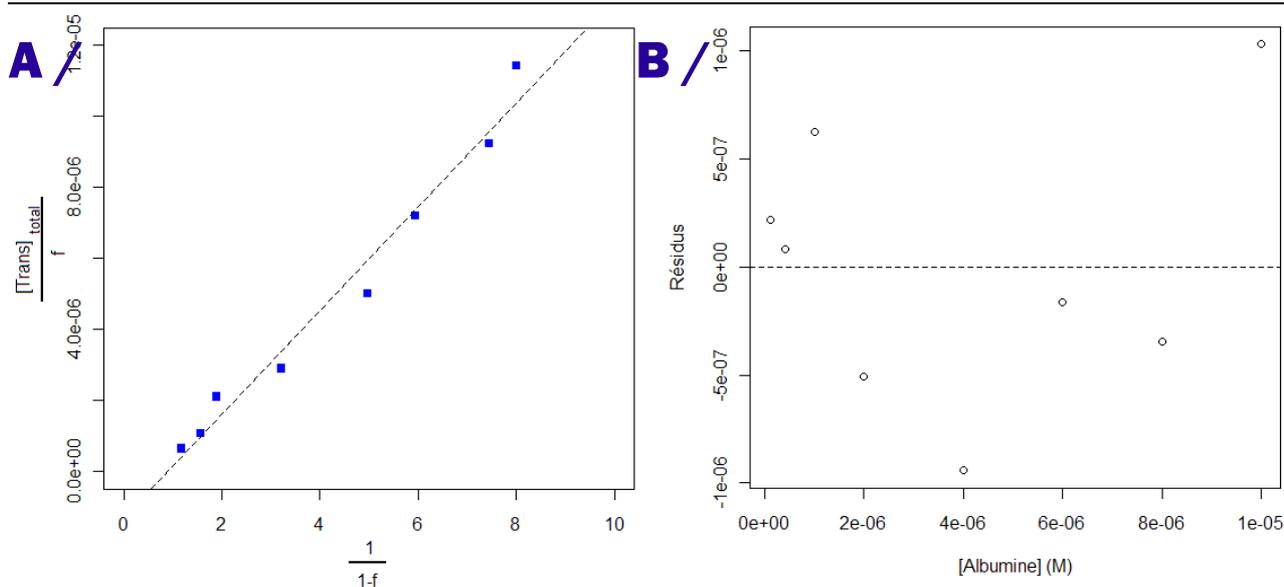


Figure 36 - Analyse d'après Scatchard de la liaison à l'albumine de la TPP(mOβGluOH)₃

A / Linéarisation des intensités de fluorescence – B / Graphique des résidus de la linéarisation

pas être atteinte. En pratique, ne sont conservées que les valeurs de $1/(1-f)$ inférieures à 10, valeurs correspondant à l'occupation de 90 % des sites de liaison.

L'étude de la liaison à l'albumine de la TPP(mOβGluOH)₃ montre que le coefficient de détermination est égal à 0,98 (Figure 36). Cependant, ceci n'est pas une condition suffisante pour valider la linéarité des données expérimentales (183). En effet, un graphique des résidus de l'ajustement linéaire en fonction de la valeur de x montre l'existence d'une tendance systématique dans la distribution des résidus. Ce cas illustre un des risques des méthodes reposant sur une transformation des données, celui d'appliquer un modèle inadapté (180).

Analyse univariée par ajustement non-linéaire

Dans la mesure où le transporteur est en large excès par rapport à la TPP, il est possible de faire l'hypothèse qu'une seule molécule de TPP est susceptible de se lier par molécule de transporteur, sur le site d'affinité la plus élevée. En d'autres termes, on peut ne considérer qu'un seul site de liaison. Une régression non-linéaire peut donc permettre l'ajustement des intensités de fluorescence F en fonction de la concentration en transporteur $[\text{Trans}]$, à l'aide de la relation suivante :

$$F = F_0 + (F_{\text{max}} - F_0) \times \frac{K_a \times [\text{Trans}]}{1 + K_a \times [\text{Trans}]} \quad \text{(Equation 31)}$$

Si les résultats obtenus par cette approche peuvent sembler cohérents à première vue, une

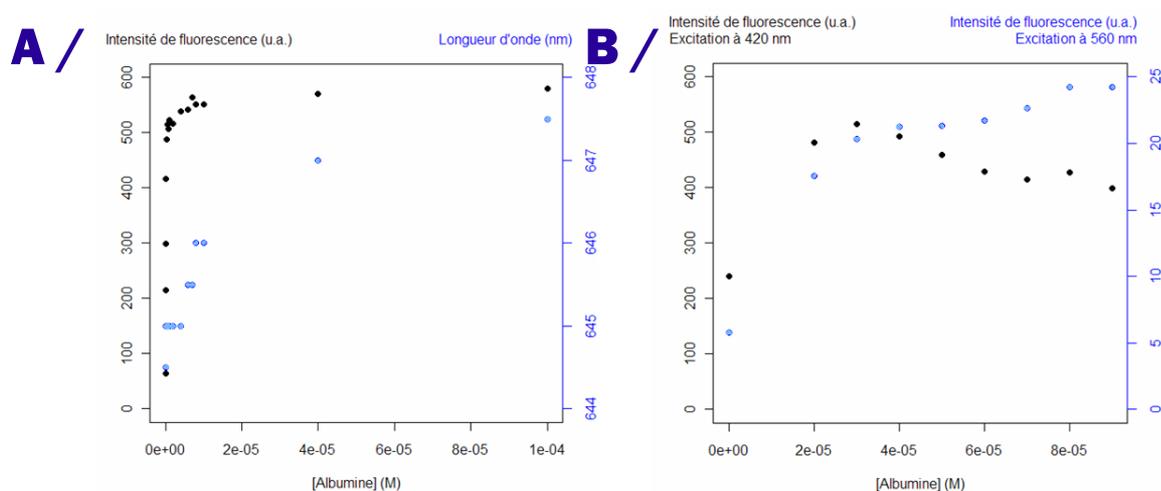


Figure 37 - Limites de l'approche univariée

A / Comparaison des évolutions des intensités de fluorescence à 647,5 nm (en **noir**) et de la longueur d'onde du maximum (en **bleu**) en fonction de la concentration en albumine pour la TPP(*mOβGluOH*)₄ ; **B /** Intensités de fluorescence de la TPP(*ρOβGluOH*)₄ enregistrées à 650 nm pour deux longueurs d'onde d'excitation : 420 nm (en **noir**) ou 560 nm (en **bleu**)

analyse plus précise montre qu'il n'en est rien. En effet, si l'on considère les ajustements des intensités de fluorescence de la TPP(*mOβGluOH*)₃ à différentes longueurs d'onde (640, 650 et 660 nm), différentes valeurs de K_a (Tableau 15) sont obtenues. De plus, on peut remarquer que la valeur expérimentale enregistrée en l'absence d'albumine ne se situe pas toujours dans l'intervalle de confiance de la valeur ajustée de F_0 .

La régression non-linéaire pour la liaison à l'albumine de la TPP(*mOβGluOH*)₄ conduit à la détermination d'une constante très élevée, de l'ordre de $200 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$. Une constante aussi élevée ne semble pas concordante avec le graphique décrivant l'évolution de la longueur d'onde du maximum en fonction de la concentration en albumine (Figure 37A). Ce dernier graphique conduit à envisager une affinité beaucoup plus faible. En effet, une affinité de $200 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1}$ conduirait à l'existence de plus de ~98% de forme liée pour une concentration en albumine de $4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$. En continuant à augmenter la concentration en albumine au-dessus de cette valeur, l'intensité de fluorescence forme un plateau (ce qui est cohérent avec une forte affinité), tandis que le spectre

Longueur d'onde	640 nm	650 nm	660 nm
K_a ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)	$27,3 \pm 4,0$	$10,5 \pm 1,4$	$11,5 \pm 1,5$
F_0 expérimental	13,9	16,5	11,8
F_0 ajusté	$17,9 \pm 6,8$	$30,6 \pm 10,1$	$21,2 \pm 7,1$

Tableau 15 - Divergence des résultats de régression non-linéaire selon la longueur d'onde

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

de fluorescence continue de se décaler vers le rouge. Cette dernière observation conduit à supposer une affinité nettement plus faible que celle déterminée par régression non-linéaire.

Une autre limite du modèle précédent apparaît avec la TPP($pO\beta$ GluOH)₄ (Figure 37B). Les résultats obtenus pour ce composé en excitant à la longueur d'excitation à 420 nm montrent que l'augmentation initiale de l'intensité de fluorescence à 650 nm est rapidement suivie d'une diminution lorsque la concentration d'albumine augmente. Ceci pourrait s'expliquer par une précipitation de complexes de plusieurs molécules d'albumine reliés par une molécule de TPP, phénomène déjà mis en évidence pour d'autres TPP (184). Cependant, cette hypothèse ne permet pas d'expliquer pourquoi la diminution de fluorescence n'est pas observée lorsque l'on fixe la longueur d'onde d'excitation à 560 nm.

Les deux méthodes usuelles présentées ci-dessus ne semblent donc pas adaptées aux mesures expérimentales. Pour mieux comprendre l'origine de ce problème, il est utile de considérer les données sur un plus large intervalle de longueurs d'onde.

1.2.3.1.2 >Principe de l'analyse par MCR-ALS

Dans le modèle précédent, la forme libre est considérée comme une forme homogène. En réalité, deux formes libres doivent être considérées : une forme agrégée (dont la fluorescence est très faible) et une forme solubilisée (présentant une nette fluorescence). La présence de ces deux formes libres différentes avait été objectivée en spectroscopie d'absorption (Figure 35). Les proportions de ces deux formes libres (solubilisée et agrégée) sont susceptibles de dépendre de nombreux facteurs : structure de la TPP, temps d'incubation, température, concentration de la forme libre... Ce phénomène explique les difficultés rencontrées précédemment lors de l'ajustement des données à une longueur d'onde. En effet, l'intensité de fluorescence de la forme libre n'est plus directement proportionnelle à sa concentration, puisqu'elle va dépendre de son taux d'agrégation, lequel risque de varier inversement à sa concentration. Dans ces conditions, F_0 n'est plus une constante dans l'équation 28 du modèle de Scatchard, ou dans la relation 31. Ces deux équations ne sont donc plus valides.

Pour contourner cette difficulté, il est possible de recourir à une analyse multivariée par MCR-ALS. Le calcul consiste en une optimisation alternative de la matrice des concentrations des deux espèces fluorescentes (la forme liée et la forme solubilisée) puis de celle de leur spectre. Les estimations initiales sont le spectre enregistré à la concentration la plus élevée en transporteur pour la forme liée et le spectre enregistré en l'absence de transporteur pour la forme solubilisée. Les optimisations sont poursuivies tant qu'elles permettent de diminuer les résidus. Après chaque optimisation de la matrice C, le vecteur de concentrations de la forme liée est recalculé pour suivre

l'équation suivante :

$$\alpha_{liée} = \frac{K_a \times [Trans]}{1 + K_a \times [Trans]} \quad \text{(Equation 32)}$$

où $\alpha_{liée}$ est la proportion de photosensibilisateur liée au transporteur. Aucune contrainte n'est appliquée au vecteur de concentrations de la forme solubilisée. En effet, en raison de l'existence d'une troisième forme non-fluorescente (les agrégats), il n'est pas possible d'appliquer la loi de conservation de la matière aux deux seules espèces fluorescentes, c'est-à-dire de contraindre la proportion de forme solubilisée à suivre la relation suivante :

$$\alpha_{solubilisée} = 1 - \alpha_{liée} \quad \text{(Equation 33)}$$

où $\alpha_{solubilisée}$ est la proportion de photosensibilisateur sous forme de monomères en solution. L'absence de contraintes applicables aux vecteurs de concentrations des formes libres solubilisée et agrégée (hormis la non-négativité) ainsi que l'absence de signal attribuable à cette dernière ne permet pas de déterminer les valeurs exactes de ces fractions libres. Il est uniquement possible d'avoir un aperçu du spectre de la forme libre solubilisée et de l'évolution de sa concentration en fonction de la concentration en transporteur.

Au lieu de réaliser quatre MCR-ALS par TPP étudiée (une par transporteur étudié : HSA, HSALIP, LDL, HDL), une seule MCR-ALS est réalisée sur l'ensemble des jeux de données enregistrées pour une même TPP, selon le principe de la variante *column-wise extended matrix* (185). Les matrices de concentrations et de spectres ont donc cinq colonnes chacune,

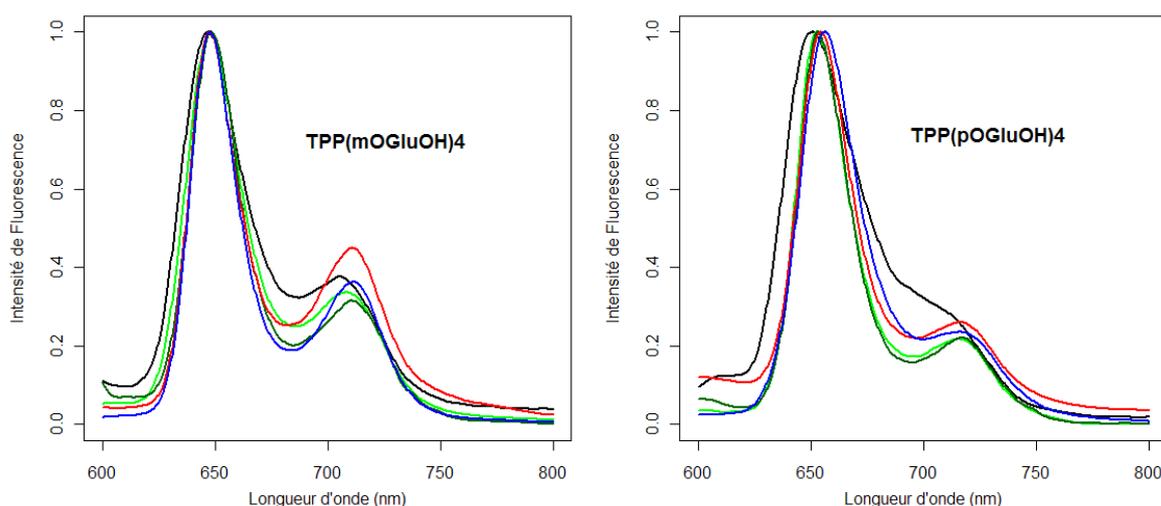


Figure 38 - Spectres des formes liées et non-liées optimisés par MCR-ALS

Porphyrine non-liée en noir ; Porphyrine liée aux LDL en rouge ; aux HDL en bleu ;
à l'albumine sans lipides en vert ; à l'albumine avec lipides en vert foncé

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

Composé	Albumine		Lipoprotéines	
	HSA	HSALIP	LDL	HDL
TPP(<i>m</i> OH) ₃	5,07	5,50	8,30	8,11
TPP(<i>m</i> OH) ₄	5,77	5,99	8,21	7,65
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₃	5,66	5,73	7,64	7,33
TPP(<i>m</i> OβGluOH) ₄	5,05	5,03	7,58	6,95
TPP(<i>p</i> OH) ₃	5,60	5,77	8,32	7,11
TPP(<i>p</i> OH) ₄	6,32	6,17	8,77	7,35
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₃	5,80	6,17	7,89	7,33
TPP(<i>p</i> OβGalOH) ₄	5,29	5,27	6,80	6,33
TPP(<i>p</i> OβGluOH) ₄	5,57	5,83	6,87	6,51
TPP(<i>p</i> ODEGOαManOH) ₃	4,90	5,19	7,78	7,01
TPP[<i>p</i> -dendr(DEGOH) ₃]	4,95	5,00	7,86	7,38
TPP[<i>p</i> -dendr(DEGOαManOH) ₃]	5,07	5,44	7,77	7,41
TPP[<i>p</i> -dendr(MEGOαManOH) ₃]	5,04	5,36	7,88	7,35

Tableau 16 - Logarithmes des constantes d'association des TPP pour les LDL, HDL et deux albumines

correspondant respectivement à la forme solubilisée, à la forme liée à l'HSA, à la forme liée à l'HSALIP, à la forme liée aux LDL et à la forme liée aux HDL. Cette méthode permet d'améliorer le résultat, puisqu'un plus grand nombre de données sera utilisé simultanément pour le calcul du spectre de la forme solubilisée. En effet, dans le cas de TPP présentant de très fortes affinités pour un transporteur, la forme solubilisée sera présente en faible proportion, ce qui rend son estimation difficile. Le traitement simultané permet d'utiliser les données obtenues avec d'autres transporteurs pour lesquels l'affinité de la TPP sera potentiellement plus faible, en d'autres termes de faire intervenir des données dans lesquelles la contribution de la forme solubilisée sera potentiellement plus grande.

1.2.3.2 > Résultats de détermination des constantes

Les spectres de fluorescence d'un même dérivé de TPP lié aux différents transporteurs plasmatiques sont assez proches entre eux, et se distinguent nettement de la forme non liée (Figure 38). En effet, les formes liées présentent des bandes plus étroites. On peut remarquer, selon le transporteur, des différences de largeur de bande (cas de la TPP(*m*OβGluOH)₄) ou de longueur d'onde du maximum (cas de la TPP(*p*OβGluOH)₄). Mais ces différences restent délicates à confirmer et à interpréter.

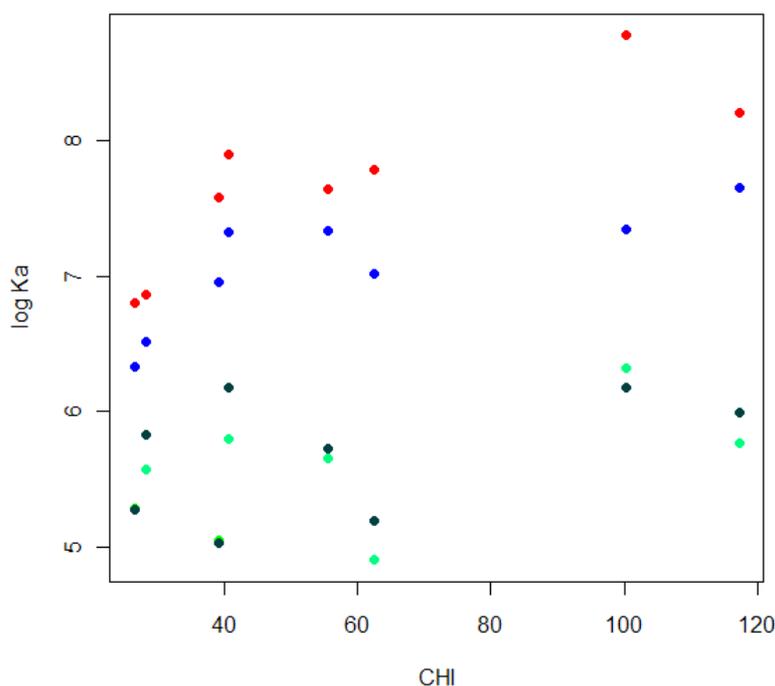


Figure 39 - Affinité pour les transporteurs plasmatiques en fonction de la lipophilie

LDL en rouge ; HDL en bleu ; albumine sans lipides en vert ; albumine avec lipides en vert foncé

Si toutes les TPP peuvent s'associer avec les LDL, les HDL et l'albumine (HSA ou HSALIP), les affinités varient considérablement selon le transporteur et la TPP considérés (Tableau 16). De manière remarquable, toutes les TPP présentent une affinité supérieure pour les LDL que pour les HDL et l'albumine. Ce résultat est d'autant plus surprenant, à première vue, que la liaison aux LDL était nettement minoritaire pour toutes les TPP dans le plasma (Tableau 14). Même les deux TPP tétraglycoconjuguées en *para*, TPP($pO\beta GalOH$)₄ et TPP($pO\beta GluOH$)₄, ont une affinité plus forte pour les LDL que pour l'albumine, résultat à comparer à leur présence majoritaire dans la fraction protéique dans le plasma. Ce résultat rappelle que l'affinité des interactions entre un xénobiotique et un transporteur n'est qu'un élément de son comportement dans le plasma et souligne l'importance des concentrations relatives des différents transporteurs. Il faut aussi noter que des composés présentant des distributions plasmatiques similaires peuvent se lier avec des affinités très différentes pour les constituants plasmatiques. C'est notamment le cas de la TPP(pOH)₄ et de la TPP($pODEGO\alpha ManOH$)₃, deux composés liés à ~85 % aux HDL. Le premier se lie beaucoup plus fortement aux composants plasmatiques que le second.

L'affinité des TPP pour les lipoprotéines, LDL et HDL, peut globalement s'expliquer par leur lipophilie, l'ordre des affinités croissantes étant assez proche de celui des lipophilies croissantes (Figure 39). Ce résultat laisse supposer que les interactions entre les lipoprotéines et le photosensibilisateur impliquent la fraction lipidique des lipoprotéines. En revanche, il n'existe

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

pas de lien clair entre les affinités pour les deux albumines testées et les CHI. Si l'on considère séparément les deux positions de substitution (*mé*ta et *para*), on peut noter une affinité supérieure pour les composés de lipophilie intermédiaire. Ceci signifie que les TPP les plus hydrophobes et, à l'opposé les TPP les plus hydrophiles, interagissent difficilement avec l'albumine. Ainsi la TPP(*m*OH)₄ et la TPP(*m*OβGluOH)₃ se lient plus fortement à l'albumine que la TPP(*m*OH)₃ et la TPP(*m*OβGluOH)₄. La même observation s'applique dans la série *para*, uniquement si l'on excepte la TPP(*p*ODEGOαManOH)₃, composé de structure très particulière avec son bras espaceur. Ce composé présente une des affinités pour l'albumine les plus faibles de tous les composés étudiés. La difficulté à comprendre l'affinité des photosensibilisateurs pour l'albumine conduit à envisager une modélisation des interactions entre les TPP et l'albumine.

1.2.4 > Modélisation des interactions avec l'albumine

La base de données *RCSB Protein Data bank* référence 52 structures d'albumine différentes, soit l'albumine seule, soit des complexes avec différents ligands. Le logiciel *UCSF Chimera* propose un outil permettant de superposer les différentes structures et de calculer un score de similitude structurale. Le calcul de ces scores pour l'ensemble des structures sert de base à une classification à l'aide du *package cluster* du logiciel *R Project* (87). Le dendrogramme calculé à l'aide de l'algorithme *DIANA (Divisive ANalysis Clustering)*, algorithme original par son approche discriminante, les autres méthodes étant agglomératives) (Figure 40) conduit à la formation de quatre groupes (réduits à un seul individu pour l'un d'entre eux) :

1. un groupe de 1AO6 à 2BXE : ce groupe est composé exclusivement de

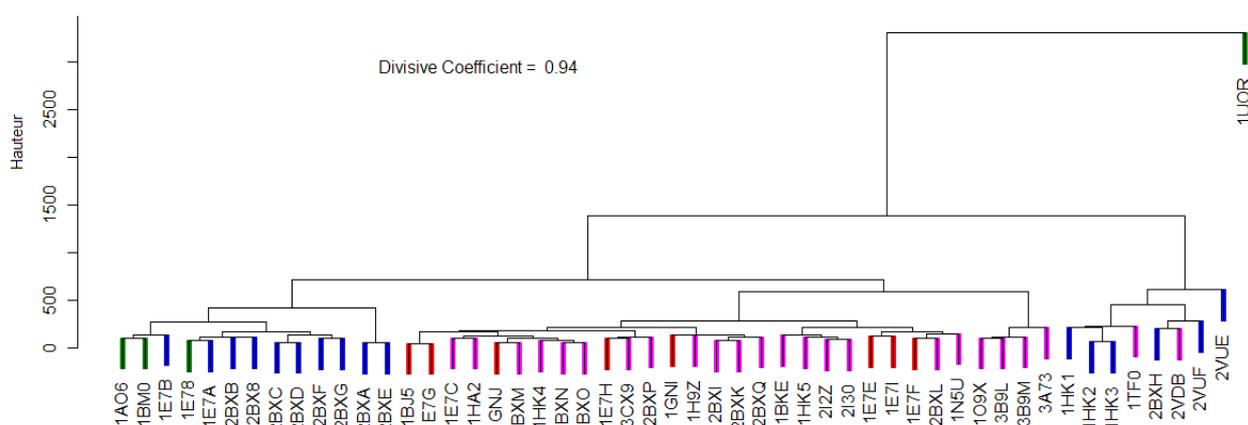


Figure 40 - Structures d'albumine humaine disponibles

HSA sans ligand en **vert** ; Complexes {HSA + acide gras} en **rouge** ; Complexes {HSA + autre ligand} en **bleu** ;
Complexes {HSA + acide gras + autre ligand} en **violet**

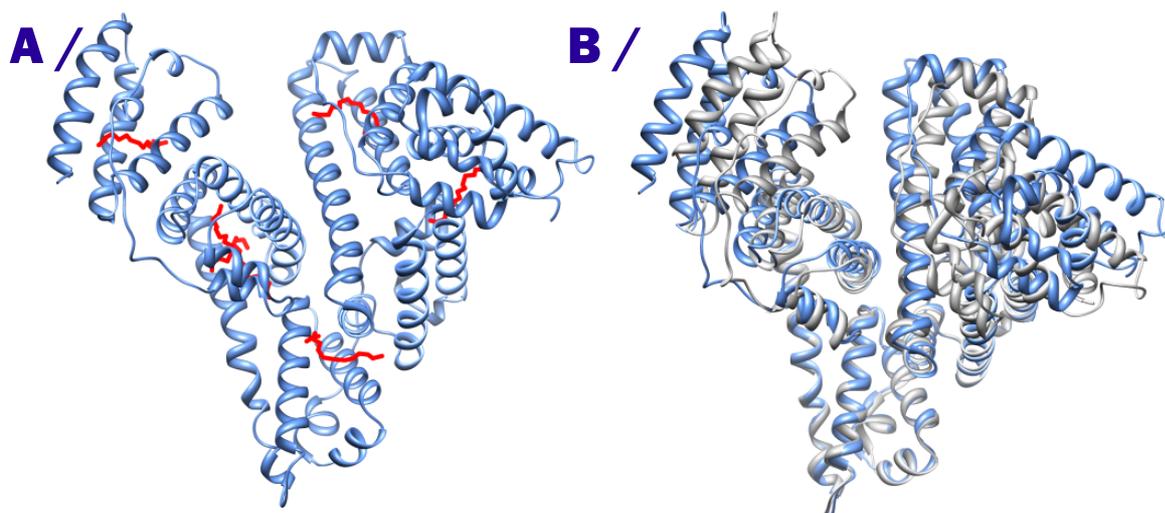


Figure 41 - **Structure de la molécule d'albumine en présence d'acides gras**

A / Sites de liaison des acides gras (myristates en rouge) ;

B / Comparaison des structures avec (en bleu) et sans acides gras (en gris)

structures d'albumine seule ou de complexes avec des ligands autres que des acides gras ;

2. un groupe de 1BJ5 à 3A73 : ces structures sont tous des complexes comportant des acides gras, avec éventuellement d'autres ligands ;
3. un groupe de 1HK1 à 2VUE : hormis la structure 2VDB, les structures présentes dans ce groupe sont caractérisées par un grand nombre de résidus manquants (de 16 à 32 selon les structures) ;
4. la structure 1UOR : cette structure, publiée en 1992, est la plus ancienne et concerne une forme cristallographique particulière.

Parmi l'ensemble des structures étudiées, l'élément le plus discriminant est nettement la présence (ou l'absence) d'acides gras, quelle que soit leur nature (myristate, oléate ou palmitate). La présence d'acides gras augmente l'ouverture du canal, avec une modification notable du site 1, la fixation d'acides gras conduisant à une augmentation de la taille de ce site et à une diminution de sa polarité (Figure 41). Ces modifications conformationnelles expliqueraient l'affinité accrue de la warfarine pour l'albumine en présence d'acides gras (186). Cependant, cette affinité accrue résulte également de la capacité de déplacer les acides gras de leurs sites de fixation (186). Ce dernier phénomène est délicat à appréhender pour les dérivés TPP. En effet, de nombreux acides gras, saturés (C16 :0) ou insaturés (C18:1, C18:2 et C20:4), peuvent se lier à l'albumine *in vivo*

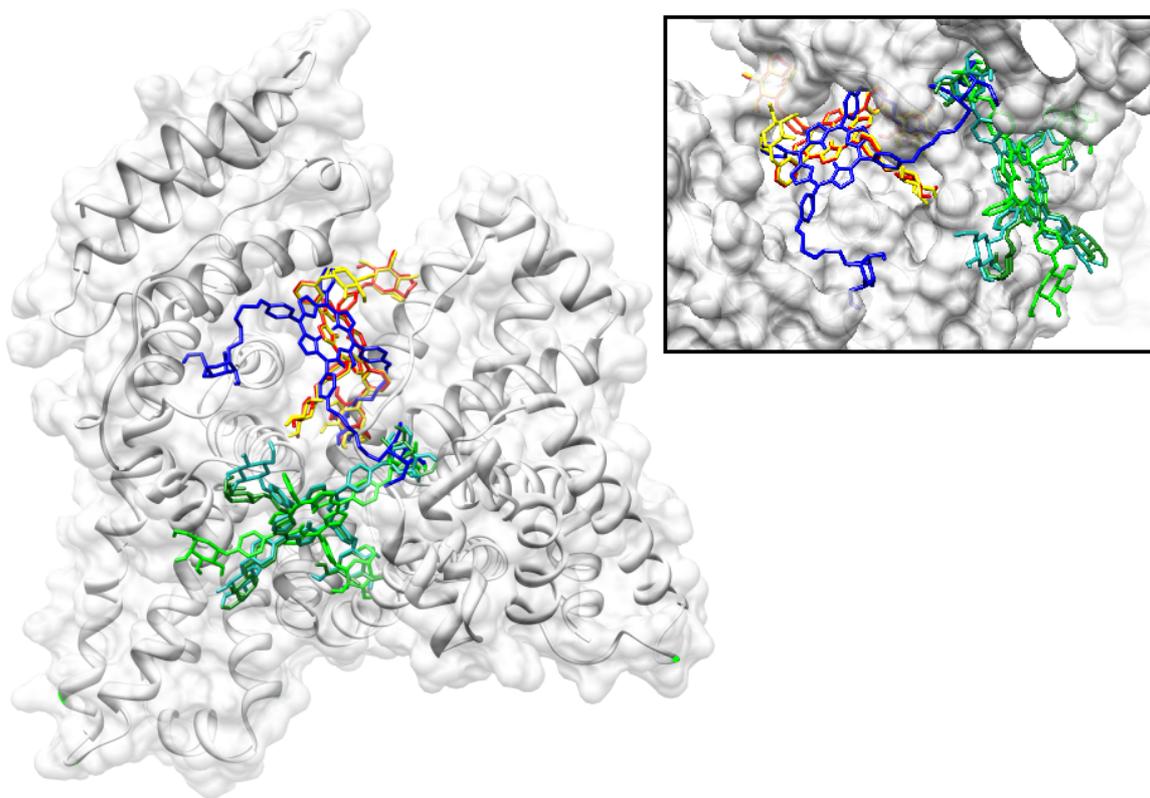


Figure 42 - Sites de liaison des TPP glycoconjugués

TPP(*mO*βGluOH)₃ en rouge ; TPP(*mO*βGluOH)₄ en jaune ; TPP(*pO*βGalOH)₃ en vert ; TPP(*pO*βGalOH)₄ en vert foncé ;
TPP(*pO*βGluOH)₄ en bleu-vert ; TPP(*pO*DEGOαManOH)₃ en bleu

(187; 188). Ainsi, selon l'acide gras et le site de liaison considérés, la constante d'association est susceptible de varier fortement, au moins d'un facteur 50 parmi les acides gras étudiés par Petitpas *et al.* (189). Cependant, un tour d'horizon de la bibliographie montre que les modélisations réalisées avec le logiciel *Autodock* font intervenir indifféremment aussi bien la forme sans acides gras que la forme avec. Une seule référence (à notre connaissance) s'attache plus particulièrement à ce problème en comparant les résultats de modélisation obtenues avec les deux structures (190). Il nous a donc semblé intéressant de reprendre cette approche, en réalisant les modélisations sur deux structures : 1AO6 (structure sans acides gras) et 1H9Z (structure en présence de myristates).

1.2.4.1 > Interactions des porphyrines avec l'albumine en l'absence d'acides gras

Selon la structure considérée, les photosensibilisateurs étudiés interagissent en différentes localisations de la molécule d'albumine. Le résultat le plus frappant est l'impossibilité pour ces structures volumineuses de s'insérer dans les deux poches hydrophobes où se lient

préférentiellement de nombreux xénobiotiques. En ce qui concerne les TPP non-glycoconjuguées, il est assez difficile de privilégier un site de liaison principal. Ainsi, les vingt modes d'interaction calculés pour la TPP non substituée se répartissent entre sept sites différents. Cette faible spécificité concorde avec un rôle essentiel des substituants dans les interactions avec l'albumine. Pour les TPP hydroxylées, les interactions présentent également une faible spécificité. La distribution des sites d'interaction est globalement proche de celle de la TPP, mais varie avec la substitution. A l'inverse, les TPP glycoconjuguées présentent des sites préférentiels d'interaction.

Parmi les TPP glycoconjuguées, la localisation dépend principalement de la position du substituant (Figure 42). A l'inverse, la nature et le nombre des sucres n'ont pas d'effet notable sur l'emplacement des sites de liaison. Les deux dérivés en *méta*, TPP(*mO*βGluOH)₃ et TPP(*mO*βGluOH)₄, se lient au même emplacement dans le sillon tandis que les trois dérivés en *para* sans espaceur, TPP(*pO*βGalOH)₃, TPP(*pO*βGalOH)₄ et TPP(*pO*βGluOH)₄, partagent un même site. Pour les trois derniers composés, le tétrapyrrole est localisé entre les résidus Q104 et K466, avec deux phényles de part et d'autre du résidu K106. La TPP(*mO*βGluOH)₃ se lie entre les sous-domaines Ib et IIIa, avec le noyau TPP localisé sous le résidu R114. Les trois sucres

Composé	Interface			Proportion du dérivé TPP impliquée dans l'interaction	Contribution du substituant dans l'interaction ¹
	Surface polaire	Surface apolaire	Surface totale		
TPP	129,6	315,1	444,7	35,1%	0,0%
TPP(<i>mOH</i>) ₃	121,9	297,1	419,0	34,4%	11,5%
TPP(<i>mOH</i>) ₄	134,7	271,4	406,1	32,9%	23,4%
TPP(<i>mO</i> βGluOH) ₃	296,3	412,4	708,7	37,7%	64,4%
TPP(<i>mO</i> βGluOH) ₄	391,1	530,3	921,4	42,9%	62,6%
TPP(<i>pOH</i>) ₃	97,4	234,2	331,5	27,9%	11,4%
TPP(<i>pOH</i>) ₄	94,7	216,4	311,1	25,9%	11,5%
TPP(<i>pO</i> βGalOH) ₃	200,6	404,7	605,3	29,0%	55,5%
TPP(<i>pO</i> βGalOH) ₄	276,2	305,2	581,4	28,0%	52,7%
TPP(<i>pO</i> βGluOH) ₄	260,3	304,7	564,9	24,5%	54,3%
TPP(<i>pODEGO</i> αManOH) ₃	352,9	464,5	817,4	30,6%	69,5%
TPP[<i>p-dendr</i> (DEGOH) ₃]	272,2	563,6	835,8	44,2%	58,7%
TPP[<i>p-dendr</i> (DEGOαManOH) ₃]	612,7	669,8	1282,4	47,1%	87,1%
TPP[<i>p-dendr</i> (MEGOαManOH) ₃]	441,3	617,6	1058,8	45,3%	72,5%

Tableau 17 - Caractéristiques des surfaces d'interaction

1. Rapport entre la surface du substituant en contact avec la protéine et la surface totale du dérivé TPP en contact avec la protéine

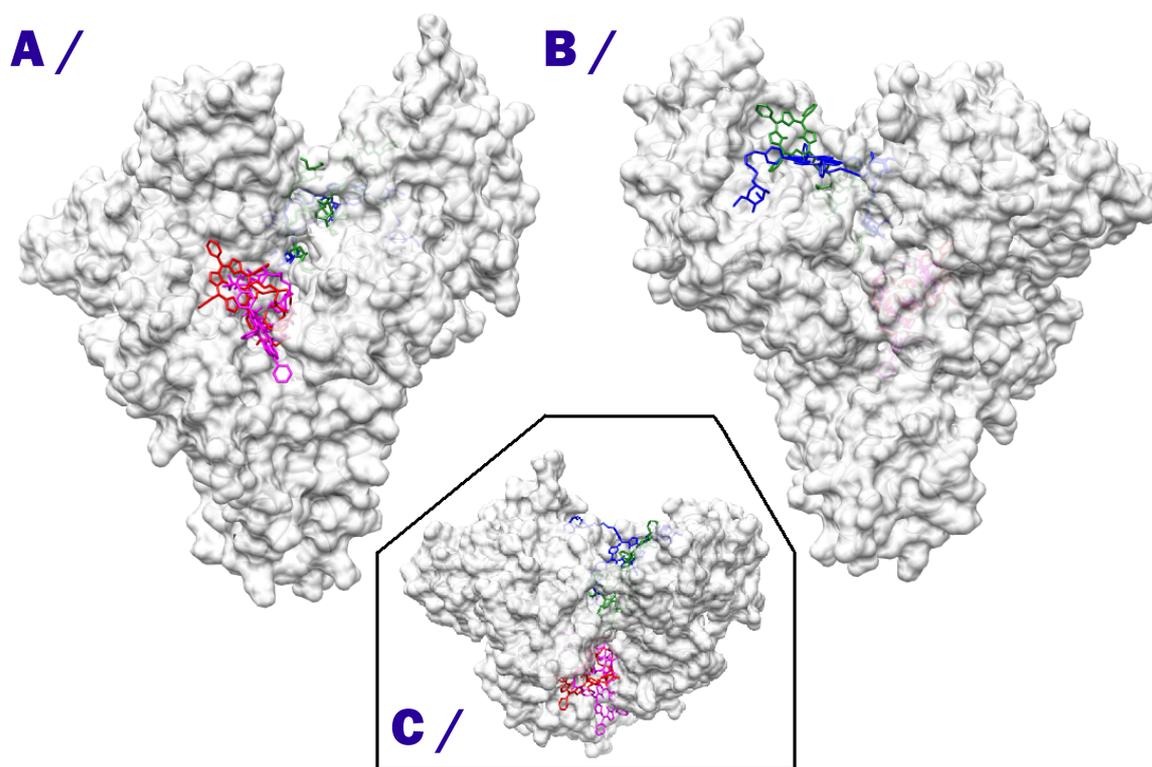


Figure 43 - Sites de liaison des dendrimères

A / Vue avant – B / Vue arrière – C / Vue du dessus

TPP[*p-dendr*(DEGOH)₃] en rouge ; TPP[*p-dendr*(DEGOαManOH)₃] en vert ; TPP[*p-dendr*(MEGOαManOH)₃] en violet ;
TPP(*p*ODEGOαManOH)₃ en bleu

s'insèrent dans trois poches polaires : 1) la première formée par les résidus R114, R117, R186 et K519, 2) la seconde constituée par les résidus N109, S419, T422, K466 et T467, 3) le troisième composé par les acides aminés D108, H146, K190, R197 et Q459. Dans le cas de la TPP(*m*OβGluOH)₄, dérivé tétraglycoconjugué, les trois sucres s'insèrent dans les mêmes poches, le quatrième interagissant avec le résidu K524. Le fait que les résidus sucre des dérivés *méta* puissent s'insérer dans des poches polaires se traduit par une augmentation de la contribution du substituant dans la surface d'interaction pour ces dérivés (Tableau 17). Pour ces structures, une fois liées à l'HSA, le photosensibilisateur est moins accessible au solvant que dans le cas des dérivés *para* sans espaceur. Cette observation est confirmée par le pourcentage du dérivé TPP impliqué dans l'interaction.

La modulation de la localisation due à l'insertion d'un espaceur revêt un intérêt particulier. Si cette spécificité n'empêche pas la TPP(*p*ODEGOαManOH)₃ d'interagir au même emplacement que la TPP(*p*OβGalOH)₃, elle favorise la liaison sur un site voisin de celui de la TPP(*m*OβGluOH)₃, site inaccessible au dérivé triglycoconjugué en *para* sans espaceur

(TPP($pO\beta GalOH$)₃). Dans cette conformation particulière, le tétrapyrrole est proche du résidu P421, un sucre est situé entre les résidus Q33 et E86, un autre entre les résidus K419 et K500. Le dernier résidu mannose s'insère dans la troisième poche polaire décrite précédemment pour la TPP($mO\beta GluOH$)₃. Cette possibilité d'insertion dans des poches favorables conduit à une forte contribution du substituant dans les interactions, à l'image du comportement des dérivés en *méta*. L'espaceur éthylène glycol confère donc une flexibilité particulière au dérivé TPP dans ses interactions avec l'albumine.

Les trois dendrimères présentent des sites d'interaction préférentiels différents (Figure 43). Le site préférentiel de la TPP[*p-dendr*(DEGO α ManOH)₃] est proche de celui de la TPP($pODEGO\alpha$ ManOH)₃, le tétrapyrrole est situé au-dessus du résidu K524, les trois sucres s'insèrent respectivement entre les résidus K519 et R114 pour le premier, entre les résidus K190 et R428 pour le second et entre les résidus N429 et K436 pour le troisième. Les deux dendrimères présentant une chaîne moins volumineuse, les TPP[*p-dendr*(MEGO α ManOH)₃] et TPP[*p-dendr*(DEGOH)₃], interagissent sur des sites voisins. Dans le cas de la TPP[*p-dendr*(MEGO α ManOH)₃], le tétrapyrrole s'insère entre les résidus K444 et E294, la chaîne latérale s'insérant dans une poche formée par les résidus K199 et R218 notamment ; un des sucres interagit avec le résidu D451, un autre avec le résidu K436. Dans le cas de la TPP[*p-dendr*(DEGOH)₃], dendrimère non glycoconjugué, le tétrapyrrole se situe au-dessus du résidu E292, la chaîne latérale s'insérant notamment entre les résidus K195 et K444. La capacité des chaînes latérales des dendrimères à s'insérer dans des poches se traduit dans le tableau 17 par une forte contribution du substituant dans les interactions entre le photosensibilisateur et la protéine.

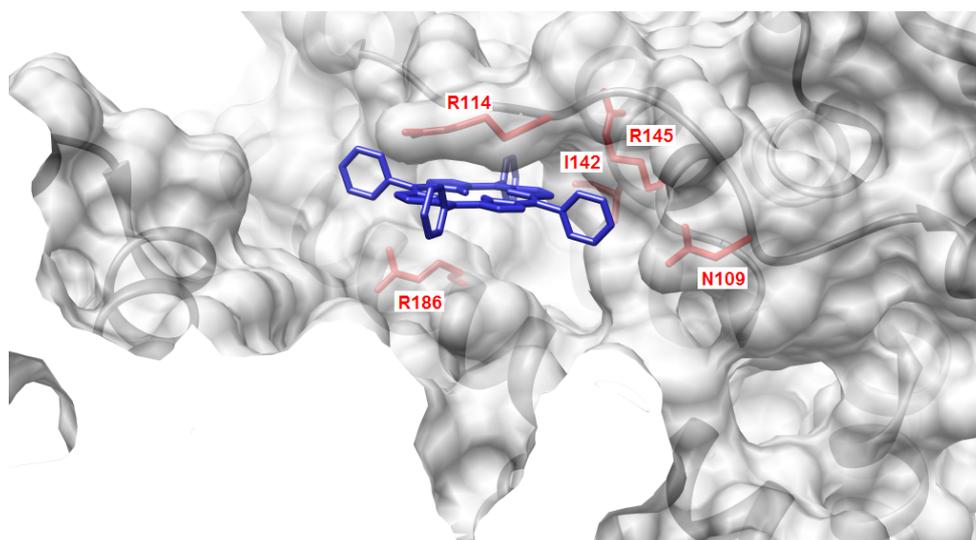


Figure 44 - Sites de liaison de la TPP

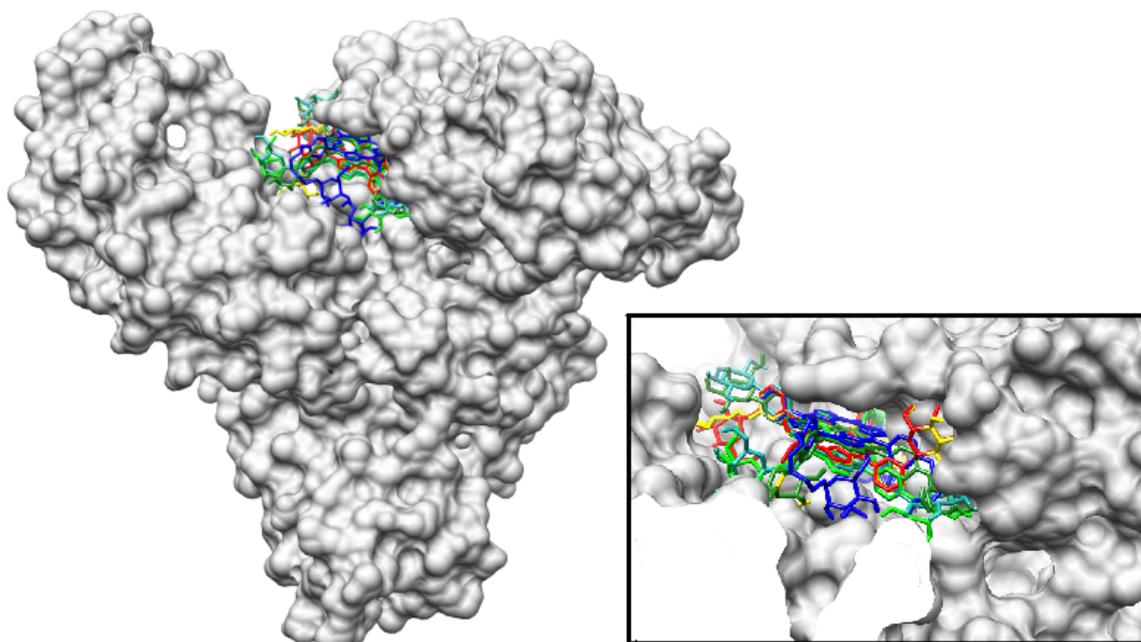


Figure 45 - Sites de liaison des TPP glycoconjugués

TPP(*m*OβGluOH)₃ en rouge ; TPP(*m*OβGluOH)₄ en jaune ; TPP(*p*OβGalOH)₃ en vert ; TPP(*p*OβGalOH)₄ en vert foncé ;
TPP(*p*OβGluOH)₄ en bleu-vert ; TPP(*p*ODEGOαManOH)₃ en bleu

Si l'on considère l'ensemble des composés présentés sur le tableau 17, on remarque que les surfaces d'interaction augmentent avec la surface du dérivé TPP pris isolément. La principale exception à cette règle est constituée par les dérivés tétraglycoconjugués en *para*, leur surface d'interaction étant inférieure à celle de la TPP(*p*OβGalOH)₃. Ce fait résulte probablement de la rigidité de la conformation *para*, qui limite les possibilités d'insertion dans des poches favorables pour les dérivés les plus volumineux. En effet, la flexibilité des isomères *mé*ta leur confère la possibilité de former de plus grandes surfaces d'interaction avec la protéine que les dérivés *para*. Les deux dérivés, TPP[*p*-dendr(MEGOαManOH)₃] et TPP(*p*ODEGOαManOH)₃, présentent des surfaces accessibles au solvant similaires. En revanche, la structure dendrimère permet une beaucoup plus grande surface d'interaction avec la molécule d'albumine. L'analyse des modalités d'interaction montre que les TPP interagissent avec l'albumine principalement par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes, mais aussi par des liaisons hydrogène. Ces dernières, interactions plus fortes que les précédentes, concernent essentiellement les composés glycoconjugués, en raison de leur nombre accru de groupements hydroxyle.

1.2.4.2 > Interactions des porphyrines avec l'albumine en présence d'acides gras

L'intérêt de cette étude repose principalement sur l'existence d'une augmentation de

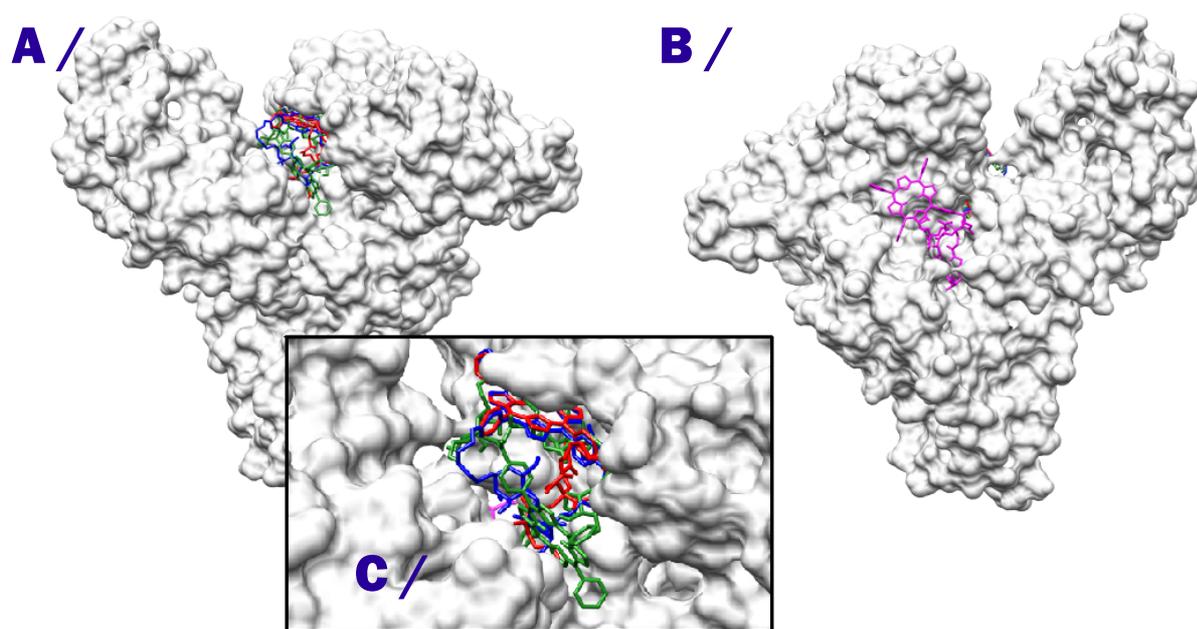


Figure 46 - Sites de liaison des dendrimères

A / Vue avant – B / Vue arrière – C / Vue du dessus

TPP[*p*-dendr(DEGOH)₃] en rouge ; TPP[*p*-dendr(DEGOαManOH)₃] en vert ; TPP[*p*-dendr(MEGOαManOH)₃] en violet ;TPP(*p*ODEGOαManOH)₃ en bleu

l'ouverture du sillon sous l'effet de la complexation des acides gras par l'albumine. Ceci est d'autant plus susceptible d'affecter la fixation des TPP que l'un des sites principaux de liaison des TPP glycoconjuguées se situe au niveau de ce sillon. Dans le cas de la TPP non substituée, de ses dérivés hydroxylés ou de la TPP[*p*-dendr(DEGOH)₃], différentes conformations sont obtenues à l'instar de ce qui a été obtenu pour les dockings avec la conformation 1AO6. Cependant, un site préférentiel commun à l'ensemble des composés se distingue : dans cette conformation, le tétrapyrrole s'insère sous le résidu R114, avec un phényle entre les résidus R186 et I142, et le phényle voisin entre les résidus N109 et R145 (Figure 44). Ce site met en jeu de nombreux acides aminés impliqués dans la liaison de la TPP(*m*OβGluOH)₃ à l'albumine dans sa conformation sans acides gras.

Le site préférentiel de la TPP non substituée et des dérivés hydroxylés est également partagé avec la quasi-totalité des autres dérivés glycoconjugués non dendrimériques. L'orientation du noyau TPP est la même pour les dérivés glycoconjugués que pour le composé parent et que pour les dérivés hydroxylés. Selon le mode de substitution, les sucres sont susceptibles d'interagir de quatre manières différentes : 1) insertion entre les résidus N109 et R197 ; 2) insertion entre les résidus Y138 et Y161 ; 3) interaction avec les résidus L179 ou D183 ; 4) interaction avec le résidu E425 (Figure 45). Les dérivés triglycoconjugués ne présentent que trois de ces interactions. Le

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

dérivé trisubstitué en *mé*ta, la TPP(*m*OβGluOH)₃, met préférentiellement en jeu les trois premiers modes. Les deux dérivés trisubstitués en *para*, TPP(*p*OβGalOH)₃ et TPP(*p*ODEGOαManOH)₃, s'orientent de la même manière en privilégiant les première, seconde et quatrième interactions. Les dendrimères glycoconjugués présentent deux sites d'interactions, un au niveau du sillon (cas de la TPP[*p-dendr*(DEGOαManOH)₃] sur la figure 46) et un à l'entrée du site de fixation n°1 des médicaments (cas de la TPP[*p-dendr*(MEGOαManOH)₃] sur la figure 46). On peut remarquer que le noyau TPP de la TPP[*p-dendr*(DEGOαManOH)₃] est localisé loin de celui de la TPP[*p-dendr*(DEGOH)₃] ou de la TPP(*p*ODEGOαManOH)₃.

1.2.4.3 > Bilan

Les résultats obtenus avec les deux conformations d'albumine montrent de nettes différences sous l'effet de la liaison d'acides gras. Cette différence de comportement résulte d'une profonde modification de l'accessibilité du site sous l'effet de la liaison d'acides gras à l'albumine (Figure 47). En effet, la liaison des acides gras à l'albumine conduit à une réorientation des boucles, notamment celle portant les résidus F134, Y138 et I142. Ces acides aminés hydrophobes, qui obstruent l'espace entre deux boucles dans la conformation 1AO6, sont déplacés dans la conformation 1H9Z, laissant un plus grand volume accessible aux ligands. Ainsi, mêmes les phényles portant des substituants aussi volumineux que des groupes sucre peuvent s'insérer à cet endroit dans la conformation 1H9Z.

Le site principal d'interaction décrit ci-dessus partage de nombreux acides aminés avec

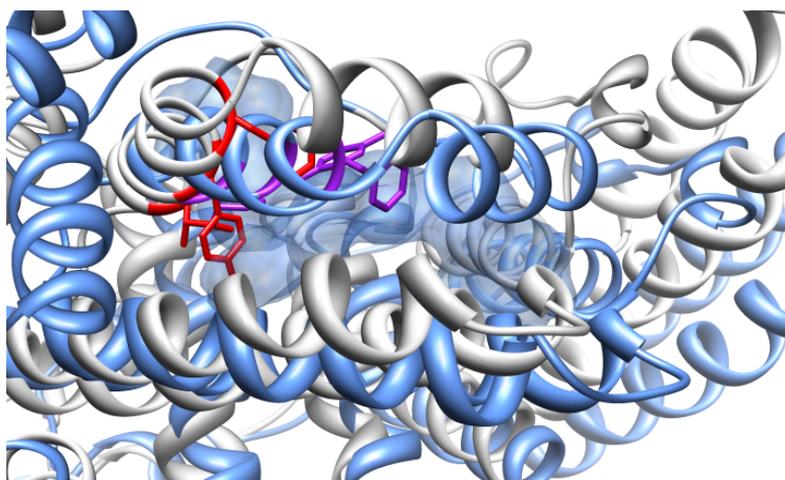


Figure 47 - Ouverture du site de liaison par liaison d'acides gras

Structures sans acides gras en gris (F134, Y138 et I142 en rouge) ; structure avec acides gras en bleu (F134, Y138 et I142 en violet) ; Surface bleue représentant le site d'interactions de la TPP(*m*OβGluOH)₃ en présence d'acides gras

le site de fixation de l'hème, tétrapyrrole présent physiologiquement dans l'organisme (191; 192). Cependant, la présence des phényles dans le noyau TPP ne permet pas au pyrrole des TPP d'occuper la même position que le pyrrole de l'hème. Cette observation montre l'importance des effets stériques, les TPP glycoconjuguées étant des molécules volumineuses. Si les sucres augmentent le volume de la molécule, ils permettent néanmoins la formation de liaisons hydrogène, plus pour les dérivés *méta* que pour les isomères *para*. Ce dernier résultat s'explique par les multiples positions que peut occuper le sucre placé en *méta*, en raison de la libre rotation des phényles. L'insertion de chaînes espaceur (cas de la TPP(ρ O β GalOH)₃ et des dendrimères) lui procure une plus grande flexibilité dans ses interactions avec la protéine. D'une manière générale, on constate donc l'importance du substituant dans la formation des interactions, essentiellement avec des résidus lysine et arginine (résidus donneurs d'hydrogène), ou avec les résidus glutamate et aspartate (accepteurs d'hydrogène).

1.3 > Discussion

1.3.1 > Distribution plasmatique des photosensibilisateurs

Les considérations communes sur la relation entre distribution plasmatique et lipophilie se trouvent globalement vérifiées sur notre série de composés. Ainsi, seuls les composés les plus hydrophiles, TPP(ρ O β GalOH)₄ et TPP(ρ O β GluOH)₄, se lient majoritairement aux protéines plasmatiques. La TPP(ρ O β GalOH)₃ présente à la fois une lipophilie intermédiaire et un comportement intermédiaire entre la liaison aux protéines des TPP les plus hydrophiles et la liaison quasi-exclusive aux lipoprotéines des composés les plus lipophiles. Ces derniers composés se lient majoritairement aux HDL, comportement classique des dérivés amphiphiles. La liaison aux LDL est toujours minoritaire sur la série de composés étudiés. La liaison aux LDL est communément associée avec le caractère hydrophobe des photosensibilisateurs. Cependant, dans nos résultats, il n'y a pas de lien apparent entre le CHI d'un photosensibilisateur et son pourcentage de liaison aux LDL. De plus, l'intérêt de la lipophilie comme prédicteur de la distribution plasmatique trouve une autre limite dans l'existence de composés ayant des CHI proches, mais des distributions plasmatiques très différentes : c'est le cas des TPP(ρ O β GalOH)₃ et TPP(m O β GluOH)₄.

Nos résultats peuvent être rapprochés de ceux obtenus sur une série de TPP sulfonatées. Le composé tétrasubstitué, le plus hydrophile, se lie quasi-exclusivement à la fraction protéique (193). Les dérivés mono-, di- et trisubstitués se lient principalement aux lipoprotéines, majoritairement aux HDL (51). De manière remarquable, les deux isomères disubstitués, TPPS20

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

(substitution de 2 phényles opposés) et TPPS2a (substitution de 2 phényles adjacents), présentent des comportements nettement différents, puisque le premier se lie à 7 % aux LDL, contre 36 % pour le second. Cette valeur est d'ailleurs supérieure à celle obtenue pour la TPPS1 (30 %), même si d'autres études n'ont pas permis de retrouver cette différence (193). L'interprétation de la distribution plasmatique nécessite de bien connaître les interactions des photosensibilisateurs avec chacun des principaux transporteurs pris isolément.

1.3.2 > De la distribution plasmatique aux constantes d'affinité

La conclusion la plus marquante de la comparaison entre distribution plasmatique et constantes d'association est que même les composés majoritairement liés aux protéines dans le plasma ont une affinité plus forte vis-à-vis des lipoprotéines, notamment vis-à-vis des LDL. Elle révèle le rôle des concentrations plasmatiques en protéines et lipoprotéines sur la distribution plasmatique, rôle déjà souligné par Kongshaug *et al* dans le cas de la liaison de l'hématoporphyrine (194). Ce dernier composé présente une affinité pour les LDL supérieure à celle pour les HDL, malgré une liaison majoritaire aux HDL dans le plasma. Ainsi, la liaison des TPP tétraglycoconjuguées en *para* ne saurait s'expliquer par une quelconque affinité particulière pour l'albumine, mais par la forte concentration plasmatique en albumine conjuguée à un faible rapport des affinités pour les lipoprotéines et l'albumine. En effet, l'albumine est la protéine plasmatique présente à la plus forte concentration (de l'ordre de 0,5-0,8 mM) alors que la concentration en lipoprotéines est beaucoup plus faible (de l'ordre de 1 μ M pour les LDL et de 13 μ M pour les HDL) (194).

Malgré la liaison aux protéines des composés les plus hydrophiles, il n'existe pas de lien évident entre l'affinité pour l'HSA et la lipophilie. Les composés hydrophiles, tels que la TPP(*mO* β GluOH)₄, présentent de faibles constantes d'association mais c'est aussi le cas des composés les plus hydrophobes comme la TPP(*mOH*)₃. Les plus fortes constantes d'association caractérisent des composés avec une lipophilie intermédiaire (TPP(*pOH*)₄, TPP(*mOH*)₄ et TPP(*pO* β GalOH)₃). Au contraire, les résultats présentés précédemment ont montré que l'affinité d'un photosensibilisateur pour les LDL et les HDL augmente avec une augmentation de sa lipophilie (Figure 39). L'affinité pour les LDL croît d'ailleurs plus fortement avec la lipophilie que l'affinité pour les HDL. Cette différence de pente peut être rapprochée des résultats de Kader *et al*. (la quantité d'anticancéreux incorporée dans une lipoprotéine (LDL, HDL ou VLDL) est corrélée avec la lipophilie du médicament) (73). Elle est également à relier avec la liaison préférentielle aux LDL présumée des photosensibilisateurs les plus lipophiles (51), tout en notant que cette règle générale connaît des exceptions. Ainsi, sur la série de composés étudiés, des dérivés principalement amphiphiles, il n'existe pas de lien apparent entre le pourcentage de liaison aux

LDL et la lipophilie. L'absence de lien entre proportion liée aux LDL et lipophilie peut surprendre dans la mesure où l'affinité pour ces mêmes LDL l'est. En réalité, elle peut s'expliquer par l'absence de lien entre affinité pour l'albumine et lipophilie. Si la lipophilie est un facteur essentiel dans la prédiction de la liaison à l'albumine des médicaments (195), certains composés fortement lipophiles se lient difficilement à l'albumine, à l'instar de la 5,10,15,20-tétra(4-méthoxyphényl)porphyrine (composé dont le log P est estimé à 20). Ainsi, les agrégats présents en solution aqueuse peuvent être rompus par l'addition de sérum de veau foetal, mais pas par l'addition d'albumine seule (196). Ce composé se lie aux lipoprotéines dans le plasma, avec un taux de liaison aux LDL de l'ordre de 28 à 30 % (197).

L'ensemble des considérations précédentes apporte un nouvel éclairage sur la règle générale, qui attribue une liaison aux LDL pour les composés les plus lipophiles et une liaison aux protéines pour les plus hydrophiles. Augmenter la lipophilie d'un photosensibilisateur en modifiant sa substitution n'augmente pas forcément son affinité pour l'albumine. En revanche, plus un composé est lipophile, plus son affinité pour les LDL et les HDL augmente, la première plus fortement que la seconde. Les ratios d'affinités K_a (LDL) / K_a (HDL) et K_a (LDL) / K_a (HSA) auront tendance à augmenter, orientant les composés vers les lipoprotéines de type LDL. A l'inverse, un composé plus hydrophile verra ses ratios d'affinités K_a (LDL) / K_a (HDL) et K_a (LDL) / K_a (HSA) plutôt diminuer, ce qui conduira à une interaction principalement avec les protéines. Les exceptions connues à cette règle seraient alors à attribuer à des variations de l'affinité vis-à-vis de l'albumine, dues à des interactions plus spécifiques. Ainsi, il est connu que la protoporphyrine et l'hématoporphyrine se lient dans les mêmes proportions aux protéines plasmatiques, malgré la lipophilie nettement supérieure du premier des deux dérivés. Cette exception à la corrélation générale entre distribution plasmatique et lipophilie s'explique alors simplement par la très forte affinité pour l'albumine de la protoporphyrine ($280 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) comparativement à celle de l'hématoporphyrine ($1,4 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$) (198).

1.3.3 > Interactions avec l'albumine

Contrairement aux affinités à l'égard des LDL et HDL, une augmentation de lipophilie ne résulte pas en une affinité accrue vis-à-vis de l'albumine. Confrontés à des observations similaires, certains auteurs ont souligné l'importance de l'amphiphilie du photosensibilisateur dans ces interactions, c'est-à-dire la nécessité que celui-ci possède à la fois un pôle hydrophobe (le tétrapyrrole substitué ou non par des phényles selon le photosensibilisateur considéré) et un pôle hydrophile (formé par les substituants fixés sur le noyau) (198; 199). Ces conclusions renforcent l'intérêt de l'approche par modélisation pour mieux comprendre les phénomènes régissant les interactions entre les TPP et l'albumine. Les résultats de modélisation ont montré que la

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

substitution affecte la localisation du dérivé à la surface de la protéine. De plus, ils ont conduit à exclure les interactions au niveau des sites I et II, sites usuels de fixation des médicaments, contrairement à ce qui a été décrit pour d'autres photosensibilisateurs, tels que la chlorine p6, la purpurine 18 (200) ou des dérivés de bactérochlorines (201). Cette différence résulte probablement de la différence de taille entre ces structures ne portant pas de phényle en *méso* et le volumineux noyau TPP. Les résultats obtenus avec des composés tétrasubstitués en *para* (TPPP et TMAP) conduisent à l'hypothèse d'une liaison en surface (62; 202), résultat cohérent avec notre étude. Des études de durées de vie de fluorescence réalisées sur des phtalocyanines sulfonées ont montré que le degré de substitution influence l'insertion dans des poches hydrophobes. Le dérivé tétrasubstitué se lie sur la surface de la protéine tandis qu'un degré de substitution inférieur autorise l'insertion dans des poches hydrophobes (203). Cependant, l'effet du substituant n'est pas seulement d'ordre stérique. Il joue aussi un rôle dans le mode d'interactions entre le photosensibilisateur et l'albumine. Ainsi, les groupements sulfonate seraient impliqués dans la formation d'interactions ioniques avec des acides aminés basiques (histidine et lysine) de la protéine dans le cas des photosensibilisateurs sulfonés de structure porphyrine (204-206) ou phtalocyanine (207). L'hypothèse de la nature électrostatique de ces interactions est confirmée expérimentalement par leur forte sensibilité à la force ionique du milieu (208).

Ce double effet du substituant, susceptible de former des interactions directes avec l'albumine mais aussi d'induire des restrictions stériques, s'applique également à notre série de TPP hydroxylées et glycoconjuguées. Les dérivés glycoconjugués forment plus de liaisons hydrogène que les hydroxylés, et les dérivés *méto* plus que les *para*. Cependant, même en cas de glycoconjugaison, les dérivés TPP interagissent avec la protéine principalement par l'intermédiaire d'interactions hydrophobes. L'implication directe du substituant dans la liaison distingue les interactions des TPP avec les protéines de celles avec la surface de la colonne C18 lors de la détermination du CHI. En effet, les valeurs de CHI reflètent plus l'exposition du noyau TPP hydrophobe. La rigidité des dérivés *para* ne leur permet pas de former facilement des interactions spécifiques avec l'albumine, ce qui pourrait expliquer l'absence de différence dans le profil de distribution entre la TPP(ρ O β GalOH)₄ et la TPP(ρ O β GluOH)₄ malgré le changement du sucre. Ce même commentaire s'applique aux affinités respectives de ces deux composés vis-à-vis de l'albumine.

Contrastant avec la distribution plus ciblée des dérivés *méto*, les composés de la série *para* semblent présenter une répartition moins spécifique dans le cas de l'albumine sans acide gras. Ce résultat, en contradiction apparente avec les constantes d'affinité (plus fortes dans la série *para*), doit peut-être être considéré différemment : la conformation globulaire des dérivés de la série *méto* restreint leurs possibilités d'interactions en surface de la protéine, limitant ainsi leurs

sites d'interactions. Dans cette perspective, les constantes d'affinité plus élevées des dérivés *para* pourrait résulter d'un plus grand nombre de sites d'affinités presque équivalentes. Un raisonnement analogue pourrait permettre d'expliquer l'affinité plus faible des dendrimères et de la TPP(p ODEGO α ManOH)₃ : l'encombrement stérique de ces composés limiterait le nombre de sites d'action possibles.

1.3.4 > Explications possibles de l'affinité préférentielle pour les LDL

Les photosensibilisateurs sont susceptibles d'interagir avec les lipoprotéines selon deux modes, soit avec la portion protéique, soit avec la portion lipidique. L'existence de sites de haute affinité au niveau de l'apoprotéine couplée à une solubilisation secondaire dans la portion lipidique a été supposée pour la liaison aux LDL de la chlorine e6 (209). Si la constante globale ($5,7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$) est du même ordre de grandeur que celles obtenues pour les TPP glycoconjuguées, une interaction préférentielle avec l'apoprotéine semble peu probable pour ces dernières. Le lien étroit entre lipophilie et affinité pour les lipoprotéines tend à privilégier l'idée d'une interaction du photosensibilisateur avec la fraction lipidique. En effet, il est probable que les interactions des TPP avec la phase stationnaire hydrophobe soient similaires aux interactions avec la portion lipidique des lipoprotéines. De plus, le fait que les TPP glycoconjuguées, susceptibles d'interagir plus fortement avec les protéines par la formation de liaisons hydrogène, se lient moins fortement que les hydroxylées renforce cette hypothèse. Enfin, l'hypothèse des interactions entre les TPP et la fraction lipidique se trouve confortée par la comparaison des affinités pour les lipoprotéines et pour les liposomes (210). L'ordre des constantes d'association vis-à-vis de ces vésicules phospholipidiques est proche de celui obtenu avec les HDL.

La forte affinité des photosensibilisateurs pour les lipoprotéines s'explique facilement par la nature particulièrement lipophile de ces transporteurs. Mais comment expliquer l'affinité supérieure des TPP pour les LDL relativement aux HDL ? Le fait que cette constatation s'applique à toutes les molécules, de structures pourtant très variées, conduit à s'interroger sur les différences entre LDL et HDL, différences de compositions et différences de propriétés de surface. Les études réalisées sur les complexes hypéricine – LDL ont montré que ce composé s'insère entre le cœur hydrophobe et l'enveloppe phospholipidique (211), localisation qui pourrait résulter d'une interaction privilégiée avec le cholestérol comme cela serait le cas au niveau des membranes (212). Un tel rôle du cholestérol est peu probable pour nos composés, plus amphiphiles que l'hypéricine, et donc plus susceptibles de rester en surface de la lipoprotéine (210). De plus, des études de pénétration des dendrimères dans les membranes ont montré une absence d'impact du cholestérol (213), contrairement à ce qui a été décrit avec des photosensibilisateurs tels que la deutéroporphyrine (214).

1 > Liaison aux lipoprotéines et protéines plasmatiques

L'affinité préférentielle pour les LDL par rapport aux HDL pourrait s'expliquer en revanche par des différences de propriétés de surface : les LDL présentent une surface moins hydrophobe et une couche externe plus fluide que les HDL. La relative hydrophobie de la surface des HDL résulte de la présence de triglycérides et d'esters de cholestérol à ce niveau (171). La combinaison de ces deux caractéristiques favoriserait la liaison des photosensibilisateurs aux LDL, puisque leur pôle hydrophobe pourrait pénétrer plus facilement dans la couche externe, tandis que le pôle hydrophile à l'extérieur pourrait interagir plus facilement avec la surface de la lipoprotéine (215).

Si les mécanismes d'interaction entre les photosensibilisateurs et les lipoprotéines restent encore à élucider, notre étude souligne l'importance de distinguer études d'affinité et identification du transporteur dans le plasma. Ainsi, il est désormais possible d'avoir un regard critique sur l'apparente contradiction rapportée dans la synthèse bibliographique : le Photofrin® est réputé bien cibler la tumeur alors que son affinité pour les LDL est intermédiaire entre celles de deux composés (hématoporphyrine et protoporphyrine) peu sélectifs (51). En réalité, une forte affinité pour les LDL doit être dissociée de la notion d'un transport majoritaire par ces lipoprotéines dans le plasma ; tout dépend de l'affinité pour les autres transporteurs. La complexité de ces phénomènes renforce la difficulté de faire le lien entre distribution plasmatique et ciblage tumoral. En effet, en plus de la nature du transporteur, la force des interactions mises en jeu risque également d'affecter la capacité du photosensibilisateur à passer de son transporteur à la cible cellulaire.

2 > Internalisation & localisation subcellulaire

La liaison du photosensibilisateur aux lipoprotéines et protéines plasmatiques orienterait sa biodistribution dans l'organisme. Elle est également susceptible d'influer sur la suite de son devenir : une internalisation par l'intermédiaire des récepteurs aux LDL a été décrite dans le cas d'une association aux LDL du photosensibilisateur. Si ce mode d'internalisation est susceptible d'affecter la localisation subcellulaire, les principaux déterminants de la localisation subcellulaire couramment évoqués dans la littérature sont des propriétés du photosensibilisateur : charge, lipophilie, asymétrie,... Cependant, les exceptions sont nombreuses et la localisation subcellulaire des photosensibilisateurs reste un phénomène complexe à appréhender. L'objectif du travail présenté ici est d'évaluer une éventuelle contribution des équilibres physico-chimiques (ionisation, association aux lipides, diffusion transmembranaire) dans la localisation subcellulaire d'un dérivé TPP. Ce travail consiste en une modélisation de ces équilibres, complétée d'une approche

expérimentale (microscopie confocale & cytométrie en flux) restreinte à la TPP(p ODEGO α ManOH)₃, composé de référence actuellement testé *in vivo*.

2.1 > Matériels & Méthodes

Les expériences de localisation subcellulaire et de cytométrie ont été réalisées au sein de l'unité INSERM U759 et de l'UMR CNRS 146 de l'Institut Curie, grâce à l'aide de Florent Poyer, Danièle Carrez et Fabrice Cordelières.

2.1.1 > Localisation subcellulaire

La lignée cellulaire A549 (ATCC, Royaume-Uni), cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain présentant un grand cytoplasme, sont utilisées pour l'étude de la localisation subcellulaire du photosensibilisateur. Les cellules sont cultivées dans du *DMEM high glucose* (Life Technologies SAS, Etats-Unis) en présence de 10 % de sérum de veau fœtal (SVF, Eurobio, France) et d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine). 100 000 cellules sontensemencées sur une lamelle de verre de 22 mm de diamètre et de 0,17 mm d'épaisseur (VWR, Allemagne). Pour l'incubation, les solutions-mères de TPP(p ODEGO α ManOH)₃ (10^{-2} M) dans le DMSO sont diluées dans le milieu de culture à une concentration finale de 4 μ M. Les incubations durent trois ou seize heures selon le cas, en l'absence ou en présence de 5 % de SVF (37°C, 5 % de CO₂, sous atmosphère humide, à l'obscurité). La localisation subcellulaire est étudiée à l'aide du microscope confocal Leica® SP 5 (Allemagne). Pendant l'enregistrement, les cellules sur la lamelle sont immergées dans du milieu de culture en l'absence de SVF (37°C, 5 % de CO₂). Une sonde spécifique du réticulum endoplasmique, la *ER-Tracker Red* (Invitrogen Corporation, Etats-Unis), a été utilisée. Dans le cas d'enregistrement de spectres, les images ont été traitées par MCR-ALS (216), à l'aide de la fonction *als* du logiciel R (87). Le logiciel *ImageJ* (NIH Image, Etats-Unis) a été utilisé pour visualiser les fichiers image.

Pour les expériences de vidéomicroscopie, les cellules A549 sont cultivées sur une lamelle qui est placée sur le microscope confocal et immergée dans du milieu de culture en l'absence de SVF. Après un premier enregistrement, ce milieu est dilué avec un volume équivalent de milieu de culture contenant la TPP(p ODEGO α ManOH)₃ pour obtenir une concentration finale de 4 μ M (une expérience contrôle est réalisée en l'absence de photosensibilisateur). Des enregistrements sont alors réalisés toutes les trente secondes, pendant une période de quarante minutes. Ces enregistrements consistent en l'acquisition d'images en mode champ clair et en fluorescence (excitation à 514 nm, enregistrement de l'émission de fluorescence de 640 à 750 nm). Le microscope est utilisé en mode résonant, avec une ouverture du *pinhole* de 1,5 Airy.

2 > Internalisation & localisation subcellulaire

La résolution des images est de 512 x 512. Le logiciel *ImageJ* (NIH Image, Etats-Unis) a été utilisé pour visualiser les fichiers image.

2.1.2 > Internalisation

100 000 cellules A549 sont ensemencées par puits en présence de 10 % de SVF. Trois jours après cet ensemencement, les cellules sont incubées avec la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃ à la concentration finale de 4 μ M pendant 4 heures en l'absence ou en présence de constituants plasmatiques humains (37°C, 5 % de CO₂, sous atmosphère humide). Après lavage, les cellules sont remises en suspension. L'internalisation est mesurée par cytométrie en flux à l'aide du FACScalibur (BD Biosciences, Etats-Unis), les résultats sont analysés à l'aide du programme *CellQuest*[®] (BD Biosciences, Etats-Unis). La longueur d'onde d'excitation est de 488 nm, l'émission de fluorescence étant enregistrée à l'aide d'un filtre 670LP. Les mesures sont réalisées sur 10 000 cellules. Six conditions expérimentales ont été testées, chacune en double : l'une sans porphyrine (témoin sans sérum), les cinq autres avec la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃ (sans sérum, 10 % de sérum ou une quantité d'un transporteur plasmatique (HDL, LDL ou albumine) correspondant à celle contenue dans 10 % de sérum). L'albumine (Sigma-Aldrich[®], Allemagne) utilisée contient des acides gras (pureté électrophorétique supérieure à 99 %).

2.1.3 > Modélisation

L'internalisation résulte à la fois de phénomènes spécifiques (interactions des photosensibilisateurs avec des récepteurs aux lectines,...) et non-spécifiques (diffusion à travers la membrane,...). Trapp a proposé un modèle impliquant ce second type d'équilibres pour représenter l'internalisation d'antipaludéens dans le cytosol, puis leur distribution vers les lysosomes et les mitochondries (217). Ce modèle repose sur différents paramètres décrivant les propriétés des organites mis en jeu et celles des xénobiotiques. Ces dernières sont peu nombreuses, log P et pK, les autres facteurs (diffusion, association aux lipides) étant estimés à partir de ces valeurs. Il est possible d'utiliser ce modèle avec les propriétés des TPP étudiées précédemment. L'objectif est surtout d'évaluer si les variations de lipophilie et de pK mises en évidence précédemment sont susceptibles d'avoir un impact au niveau d'une cellule tumorale.

Dans le modèle de Trapp, la variation de la masse du composé étudié dans un organite est donnée par une équation ayant la forme générale suivante :

$$\frac{dm_{organite}}{dt} = A_{organite} \times J_{ext \rightarrow int} - A_{organite} \times J_{int \rightarrow ext} \quad \text{(Equation 34)}$$

où $A_{organite}$ est la surface de l'organite considéré et $J_{ext \rightarrow int}$ et $J_{int \rightarrow ext}$ sont respectivement les flux du

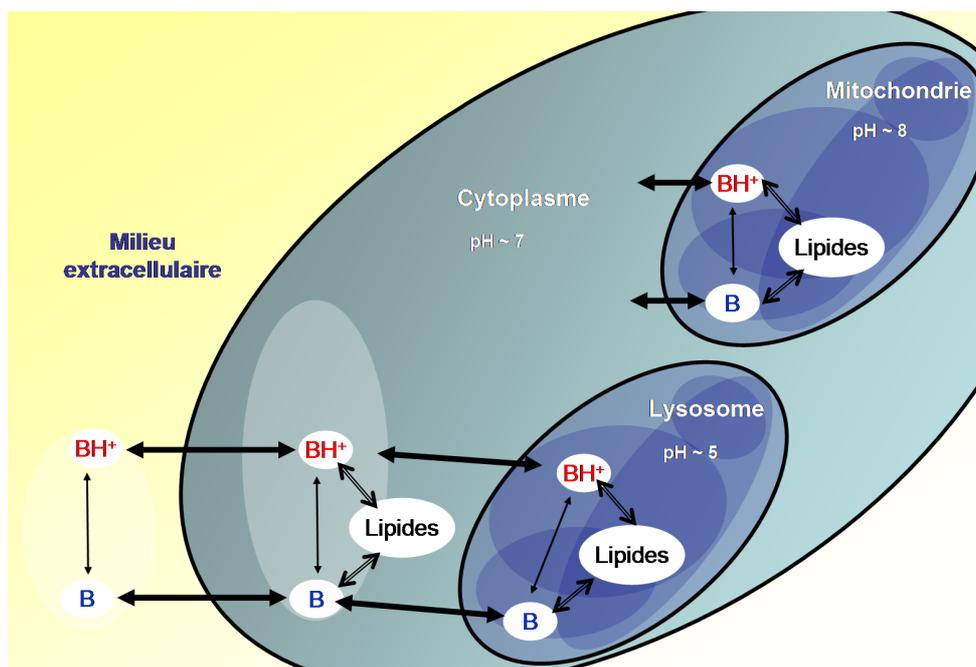


Figure 48 - Principe du modèle de Trapp (cas d'un composé base)

Par souci de clarté, cette figure présente le cas d'un composé avec un seul équilibre d'ionisation

composé entrant et sortant de l'organe. Ces flux dépendent à la fois de l'état d'ionisation du photosensibilisateur, des coefficients de diffusion et des constantes d'association aux lipides des trois espèces mises en jeu (Figure 48). Les équations ont été résolues à l'aide du *package deSolve*, développé pour le logiciel R (87).

2.2 > Résultats de modélisation

Le modèle proposé par Trapp a été utilisé pour évaluer la distribution du photosensibilisateur depuis l'extérieur de la cellule vers le cytosol, les mitochondries et les lysosomes. L'intérêt, en termes de PDT, est de pouvoir évaluer la part de phénomènes passifs dans l'orientation des photosensibilisateurs vers deux des principales cibles cellulaires de la PDT : les lysosomes (induisant une mort cellulaire générée par la production photoinduite de céramides) et les mitochondries (provoquant une sortie de cytochrome c interrompant la chaîne respiratoire mitochondriale et/ou initiant l'apoptose cellulaire) (218). Lysosomes et mitochondries se caractérisent par des pH nettement différent du cytosol (~5 pour les lysosomes et ~8 pour les mitochondries contre 7 pour le cytosol). Pour le milieu extracellulaire, deux valeurs ont été étudiées : 7,4 (valeur caractéristique des tissus sains) et un pH de 6 (valeur plus acide, caractéristiques de certaines tumeurs (57; 58)).

2 > Internalisation & localisation subcellulaire

Une variante de ce modèle global a également été envisagée. Dans le cas précédent, le photosensibilisateur se situe dans le milieu extracellulaire au temps initial, ce qui reflète bien une internalisation par diffusion à travers les membranes. Dans la variante proposée ensuite, les échanges sont étudiés entre une vésicule cytoplasmique et le cytoplasme, le photosensibilisateur étant initialement contenu dans la vésicule. L'objectif est de décrire le devenir du photosensibilisateur suite à une internalisation par un mécanisme de type endocytose. Les vésicules mises en jeu dans cette voie impliquant endosomes et lysosomes sont légèrement acides, avec des pH variant entre 5 et 7. Des modélisations ont donc été réalisées pour des vésicules présentant cet intervalle de pH.

Pour le calcul, l'intervalle de pK_1 testé est de 4 à 6, la valeur de pK_2 étant inférieure de 0,3 unité pH à la valeur de pK_1 (cet écart correspond à celui obtenu lors de la détermination de pK par MCR-ALS). L'intervalle de $\log P$ testés pour les différentes espèces (H_2TPP , H_3TPP^+ , H_4TPP^{2+}) est de -2 à 6. Il est difficile d'utiliser les CHI déterminés chromatographiquement pour proposer des valeurs de $\log P$ fiables pour les différentes espèces. Le tableau 9 (page 92) montre que l'intervalle de CHI des standards (de 15,8 à 97,7) correspond à un intervalle de $\log P$ relativement restreint (de -0,05 à 3,26). Les résultats présentés ici se concentrent sur l'hypothèse d'un écart relativement faible entre les $\log P$ des formes H_2TPP et H_4TPP^{2+} (1 ou 2 unités), cas le plus probable au vu des résultats de détermination de CHI en fonction du pH. Pour la forme H_3TPP^+ , les résultats chromatographiques n'avaient pas permis d'exclure la possibilité d'une lipophilie légèrement supérieure à la forme H_2TPP . C'est pourquoi, pour la modélisation, une attention particulière a été apportée à la valeur de lipophilie de cette forme. Selon les cas, le $\log P$ de la forme H_3TPP^+ est égal à celui de la forme H_2TPP , à celui de la forme H_4TPP^{2+} ou intermédiaire entre les deux.

2.2.1 > Hypothèse n°1 : internalisation de type « diffusion »

Dans l'ensemble des combinaisons de paramètres testées, les concentrations cytoplasmique et mitochondriale sont proches. D'après ces résultats, les dérivés TPP ne présentent donc pas de localisation préférentielle au niveau des mitochondries. En revanche, la concentration dans les lysosomes est toujours supérieure à la concentration cytoplasmique, l'écart entre les deux valeurs variant selon les propriétés du dérivé TPP. En effet, les TPP sont susceptibles de présenter une protonation au niveau des lysosomes (dont le pH est de 5), protonation dont l'ampleur dépend, entre autres facteurs, de la lipophilie des différentes espèces. La figure 49A présente l'évolution du rapport des concentrations lysosomale et cytoplasmique en fonction de la valeur de pK_1 , chaque courbe correspondant à une combinaison différente de lipophilie des différentes espèces. Le ciblage lysosomal est d'autant meilleur que la TPP est plus basique et plus hydrophile. Par exemple, un rapport de 2 est atteint dès la valeur de pK_1 voisine de

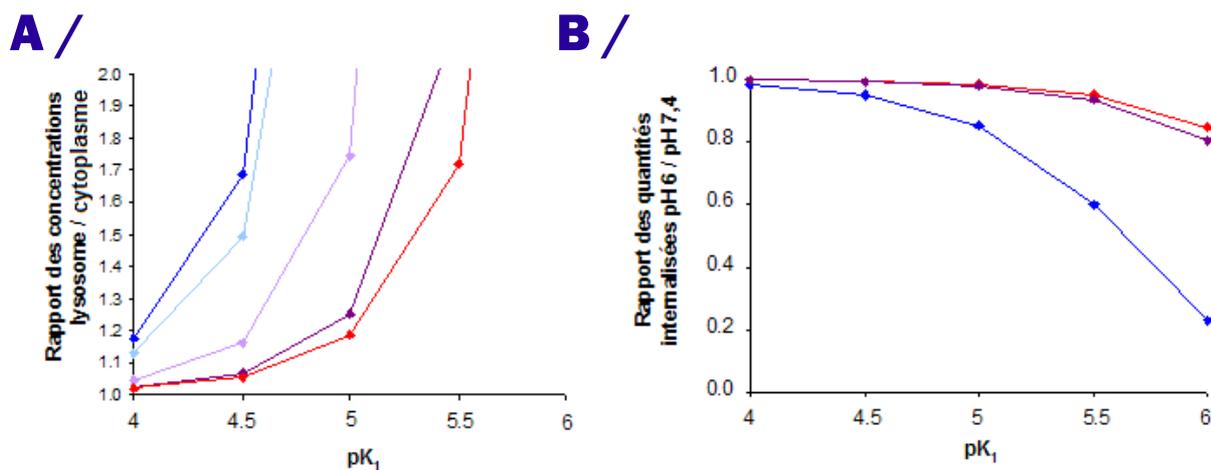


Figure 49 - Résultats de modélisation de type « diffusion »

Ratio des concentrations dans la vésicule et dans le cytoplasme

A / Rapport des concentrations lysosome / milieu extracellulaire en fonction du pK_1 de la TPP ;**B /** Rapport des quantités internalisées à pH 6 et à pH 7,4 en fonction du pK_1 de la TPP ;

$pK_2 = pK_1 - 0,3$; log P des formes H_2TPP , H_3TPP^+ et H_4TPP^{2+} respectivement égaux à 6, 5 et 4 (en rouge), à 3, 2 et 1 (en violet), à 2, 1 et 0 (en violet clair), à 1, 0 et -1 (en bleu clair) et à 0, -1 et -2 (en bleu) ;

4,5 pour un composé hydrophile (en bleu) alors que pour un composé hydrophobe (en rouge), une valeur de pK_1 minimale de 5,5 est nécessaire. Cette différence résulte notamment du déplacement des équilibres de protonation selon l'association aux lipides des différentes espèces, déplacement qui dépend donc de la lipophilie de la TPP. Les courbes rouge et violet foncé sont proches, signes que la variation de lipophilie de 3 à 6 ne modifie pas fortement l'accumulation au niveau du lysosome. Une observation analogue s'applique aux deux courbes correspondant aux composés les plus hydrophiles (bleu et bleu clair). L'effet de la variation de lipophilie est le plus net pour des lipophilies comprises entre ces deux extrêmes (c'est-à-dire pour des valeurs de log P entre 1 et 3).

Dans le cas d'une internalisation par diffusion, le modèle de Trapp permet d'évaluer l'effet du pH du milieu extracellulaire sur la quantité intracellulaire de TPP (Figure 49A). En diminuant le pH du milieu extracellulaire de 7,4 (valeur classique du tissu sain) à 6 (valeur relevée au niveau de certaines tumeurs), on observe une diminution de l'internalisation. Cette diminution s'accroît avec l'augmentation de l'hydrophilie et de la basicité de la TPP. La diminution reste cependant faible pour des composés relativement hydrophobes (log P supérieur à 3 pour la forme H_2TPP) et pour un pK_1 inférieur à 5,5. Les mêmes propriétés qui permettent un ciblage lysosomal exposent donc au risque d'une diminution d'internalisation dans un tissu tumoral plus acide.

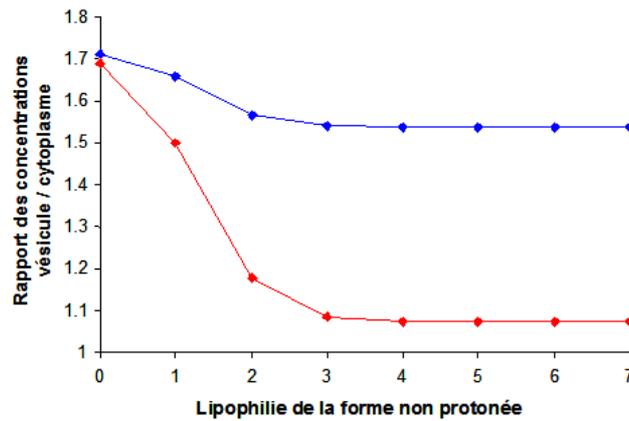


Figure 50 - Résultats de modélisation de type « endocytose »

$\log P (H_3TPP^+) = \log P (H_2TPP)$ (en bleu) ; $\log P (H_3TPP^+) = \log P (H_4TPP^{2+})$ (en rouge) ;

$\log P (H_4TPP^{2+}) = \log P (H_2TPP) - 1$; pH de la vésicule égal à 5 ; $pK_1 = 4,5$

2.2.2 > Hypothèse n°2 : internalisation de type « endocytose »

Dans cette seconde hypothèse, le photosensibilisateur se situe initialement au niveau d'une vésicule cytoplasmique. Le paramètre étudié est le rapport des concentrations du photosensibilisateur entre la vésicule et le cytoplasme. Dans le cas où l'on considère une vésicule de pH 5 (cas des lysosomes), il existe une nette variation du rapport des concentrations en TPP entre la vésicule et le cytoplasme, en fonction de la lipophilie de la forme H₂TPP (Figure 50). Si une même valeur de log P est attribuée aux deux formes protonnées, on peut observer une nette diminution du rapport des concentrations vésicule / cytoplasme lorsque le log P augmente de 0 à 3 (courbe rouge de la figure 50). Pour des log P supérieurs à cette valeur, ce rapport ne varie plus, la quasi-totalité de la TPP présente dans la vésicule étant déjà liée aux lipides pour un log P de 3 (plus de 97 % de liaison aux lipides). A titre de comparaison, un quart de la TPP est liée aux lipides pour un log P de 1, les trois-quarts pour un log P de 2 (Tableau 18).

Dans le cas où la forme monoprotinée aurait une lipophilie égale, non pas à la forme diprotinée, mais à celle de la forme neutre, la diminution du rapport entre les log P de 0 et 3 est

log P de H ₂ TPP	1	2	3
Vésicule de pH 5	24,6 %	76,5 %	97,0 %
Vésicule de pH 6	33,4 %	83,4 %	98,0 %

Tableau 18 - Pourcentage d'association aux lipides dans les vésicules d'endocytose

$\log P (H_3TPP^+) = \log P (H_4TPP^{2+}) = \log P (H_2TPP) - 1$; $pK_1 = 4,5$

beaucoup plus faible (courbe bleue de la figure 50). Dans ce cas, la forme monoprotonée devient plus susceptible d'interagir avec les lipides, le déplacement d'équilibre de protonation est moindre, la quantité de forme protonée dans la vésicule augmente et le rapport des concentrations vésicule / cytoplasme également. Ainsi, l'augmentation de 1 unité du log P de la forme monoprotonée fait passer la valeur du plateau observé pour des log P supérieurs à 3 de 1,07 à 1,54. En d'autres termes, plus la forme H_3TPP^+ est lipophile, plus le rapport des concentrations est élevé. En effet, l'accumulation des TPP dans des vésicules acides, telles que les lysosomes, résulte de la possibilité de protonation, équilibre susceptible d'être déplacé par les interactions avec les lipides des différentes espèces.

Comme le montre l'analyse précédente, le rapport des concentrations vésicule / cytoplasme dépend principalement des possibilités de protonation à l'intérieur de la vésicule. Cependant, les endosomes, premiers stades de l'endocytose, présentent des pH supérieurs aux lysosomes, entre 6 et 6,5 pour les premiers contre 5 pour les seconds. Etant données les valeurs de pK des dérivés TPP (entre 4 et 5,5 pour la première protonation), l'ionisation à l'intérieur de la vésicule est très faible et le rapport des concentrations se rapproche de 1 à partir d'un pH intra-vésiculaire de 6. Les équilibres de protonation ne peuvent donc *a priori* pas être évoqués pour expliquer une séquestration du photosensibilisateur au niveau de vésicules de pH supérieur à 6, valeurs classiques pour des vésicules d'endocytose. Si le modèle de Trapp ne permet pas d'expliquer une localisation préférentielle dans des vésicules de pH 6, il permet toutefois d'estimer le pourcentage de liaison aux lipides en fonction des valeurs de log P des différentes formes. Ces pourcentages d'association sont supérieurs dans le cas d'une vésicule de

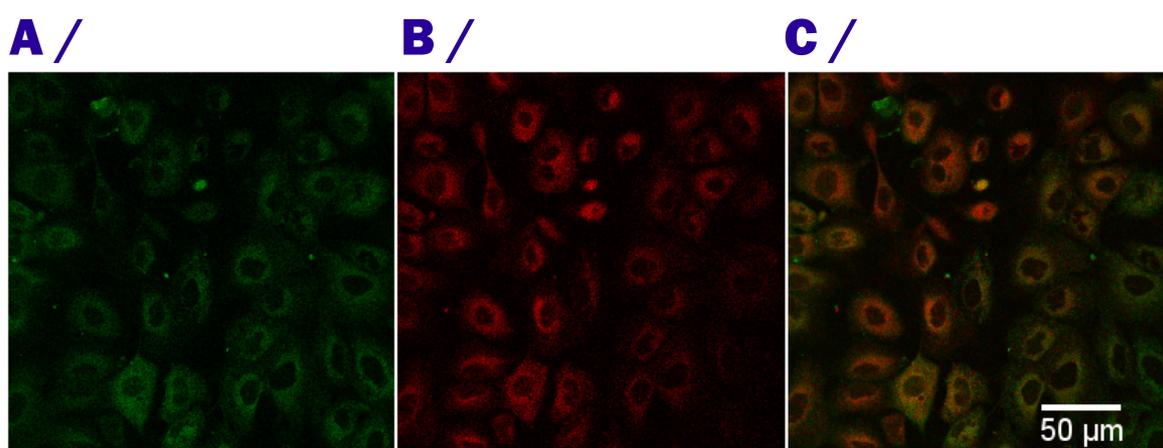


Figure 51 - Résolution par MCR-ALS de la colocalisation subcellulaire

A / Sonde ER-Tracker Red (en vert) ; **B /** TPP(ρ ODEGO α ManOH) $_3$ (en rouge) ; **C /** Superposition des deux images

Incubation pendant 3 heures en présence de sérum ; excitation à 561 nm

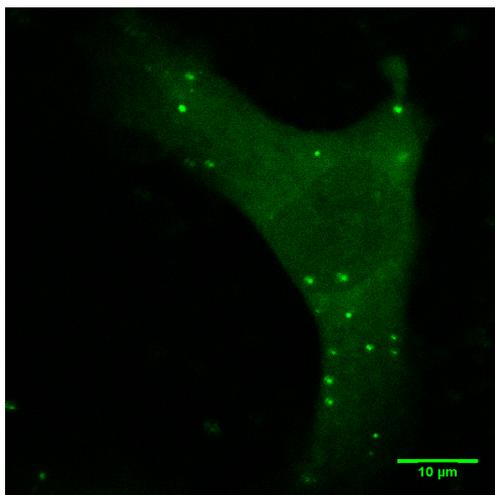


Figure 52 - Localisation dans des vésicules

Excitation à 405 nm ; incubation pendant 16 heures en présence de sérum

pH 6 que dans celui d'une vésicule de pH 5 (Tableau 18).

2.3 > Résultats de microscopie et cytométrie

La microscopie confocale et la cytométrie en flux ont été combinées pour étudier la TPP(p ODEGO α ManOH)₃. La localisation subcellulaire a été déterminée par l'enregistrement d'images en microscopie confocale à l'aide d'une sonde spécifique du réticulum (*ER-Tracker Red*). Cette étude vise également à suivre l'internalisation de la TPP(p ODEGO α ManOH)₃ notamment par vidéomicroscopie et cytométrie en flux. Pour cette dernière technique, l'objectif est surtout d'évaluer l'effet des transporteurs plasmatiques sur la quantité de photosensibilisateur internalisée.

2.3.1 > Localisation subcellulaire de la TPP(p ODEGO α ManOH)₃

La superposition des spectres d'excitation de la TPP(p ODEGO α ManOH)₃ et de la sonde *ER-Tracker Red* est telle qu'il n'est pas possible d'exciter indépendamment l'une et l'autre. La bande d'émission large de la sonde est également un problème auquel la MCR-ALS doit pouvoir apporter une solution, afin de distinguer le signal de la TPP(p ODEGO α ManOH)₃ de celui de la sonde. La résolution de ce mélange permet de mieux définir la localisation de la porphyrine de celle de la sonde (Figure 51). La bonne superposition des deux signaux appuie l'hypothèse d'une localisation de la TPP(p ODEGO α ManOH)₃ au niveau du réticulum endoplasmique. Cependant, cette localisation de la porphyrine s'accompagne d'une autre localisation à des temps d'incubation plus longs, dans des petites vésicules cytoplasmiques, vésicules d'un diamètre légèrement inférieur à 1 μ m (Figure 52).

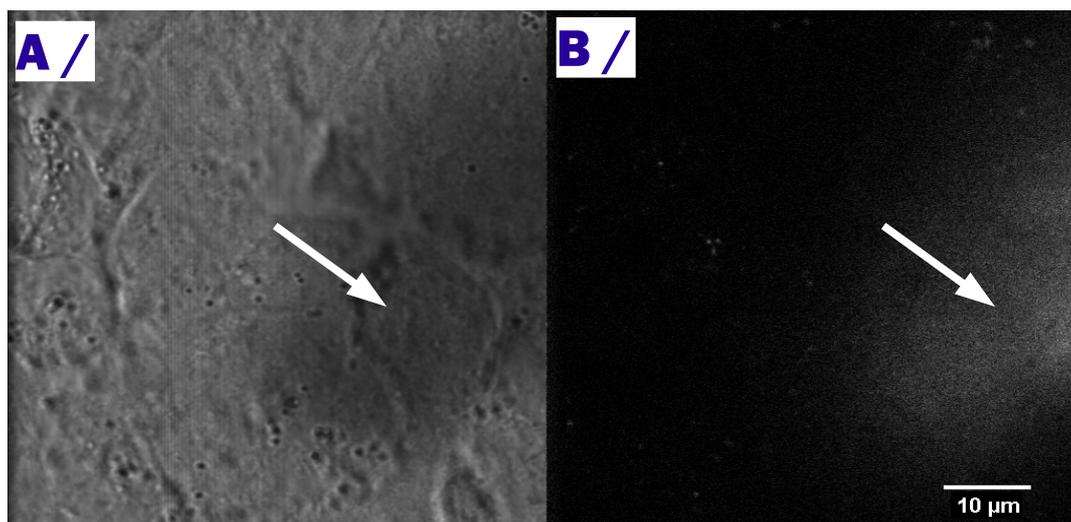


Figure 53 - Mise en évidence des agrégats de TPP(pODEGOαManOH)₃ en vidéomicroscopie

Images enregistrées 3 minutes 30 après l'addition de porphyrine : **A** / En transmission ; **B** / En fluorescence

2.3.2 > Internalisation de la TPP(pODEGOαManOH)₃

2.3.2.1 > *Suivi par vidéomicroscopie*

L'objectif initial était d'essayer de visualiser l'internalisation du photosensibilisateur, par exemple la formation d'invaginations contenant la TPP(pODEGOαManOH)₃ au niveau de la membrane plasmique. Pour y parvenir, des images en mode champ clair et en fluorescence (excitation à 514 nm) ont été enregistrées simultanément toutes les trente secondes, pendant quarante minutes après ajout de TPP(pODEGOαManOH)₃ sur la lamelle sur laquelle se trouvent les cellules A549. Le suivi par fluorescence permet de constater que le signal de fluorescence enregistré pendant les premières minutes n'est pas homogène et qu'il ne se superpose pas avec une structure cellulaire précise (Figure 53). Ce signal doit donc être attribué à un agrégat de porphyrine, présent au-dessus des cellules. En effet, pour augmenter la sensibilité lors de l'enregistrement de la fluorescence, le microscope n'est pas utilisé en mode confocal, ce qui permet une acquisition sur une plus grande épaisseur. L'hypothèse d'attribuer ce signal à un agrégat est renforcée par l'observation sur l'image mode champ clair d'une ombre ayant une même forme que ces agrégats.

L'enregistrement sur une durée plus longue permet de mettre en évidence une fluorescence au niveau du cytoplasme des cellules A579, signe d'une internalisation de la TPP(pODEGOαManOH)₃. Cette internalisation est accompagnée d'une déstructuration du tapis cellulaire, visible au bout d'environ sept minutes. Cette dernière résulte de l'initiation d'un effet

2 > Internalisation & localisation subcellulaire

photodynamique, puisqu'un enregistrement en l'absence de porphyrine, toutes conditions identiques par ailleurs, n'induit pas de désorganisation du tapis cellulaire. Les cellules se rétractent ensuite jusqu'à la perte de la confluence. Enfin, au bout d'une trentaine de minutes, des bulles se forment au niveau des membranes plasmiques, ce qui suggère l'entrée en nécrose des cellules (Figure 54). Si la vidéomicroscopie a permis de suivre l'effet PDT, dans les conditions testées, elle ne permet pas d'obtenir de plus amples informations sur le mode d'internalisation du photosensibilisateur par la cellule tumorale.

2.3.2.2 > Etude de l'agrégation extracellulaire par imagerie spectrale

La vidéomicroscopie a permis de mettre en évidence des structures évoquant des agrégats de TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃ dans le milieu extracellulaire. L'enregistrement d'une image spectrale de ces structures de 5-7 μ m de diamètre permet d'observer un spectre avec une bande relativement large à 650 nm (excitation à 405 nm). Ce spectre moyen, typique d'un agrégat de porphyrine, n'est pas homogène au niveau de la structure observée, la bande à 650 nm étant plus large au cœur de l'agrégat qu'en périphérie. Cette différence de largeur de bande de fluorescence peut être exploitée en MCR-ALS, en faisant l'hypothèse de la coexistence de deux espèces : une espèce agrégée et une espèce en cours de solubilisation. La position des agrégats est susceptible de varier au cours du temps nécessaire à l'acquisition des spectres. Pour limiter ce problème, l'analyse est réalisée sur une portion de spectre limitée (de 636 à 676 nm), ce qui correspond à un nombre plus limité d'images, c'est-à-dire à un temps d'analyse plus court.

L'image résolue permet de distinguer la porphyrine agrégée présentant une bande plus

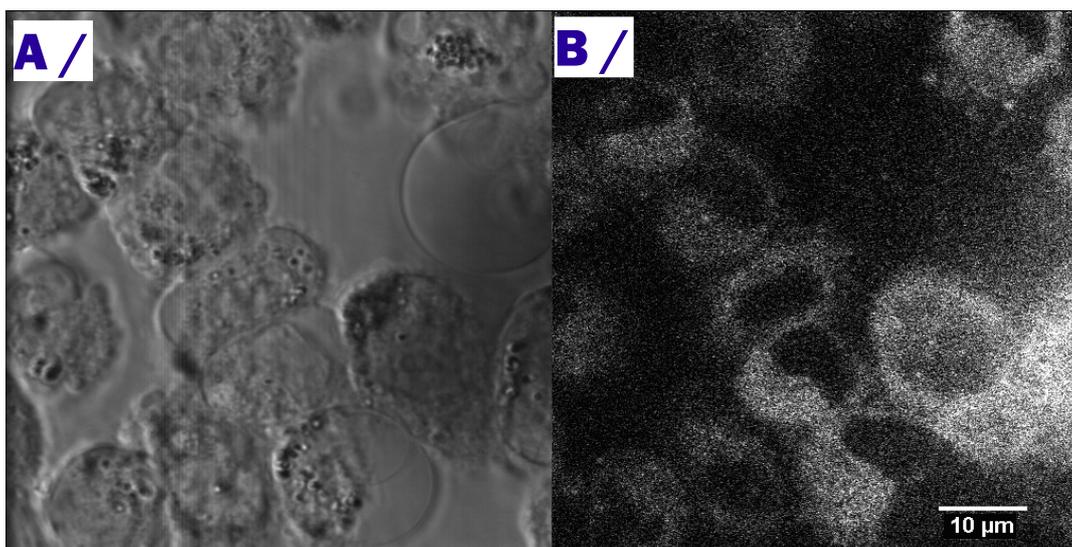


Figure 54 - Internalisation mise en évidence en vidéomicroscopie

Images enregistrées 32 minutes après l'addition de porphyrine : A / En transmission ; B / En fluorescence

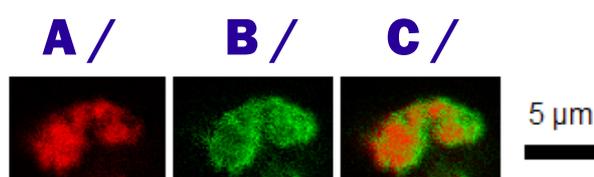


Figure 55 - Résolution spectrale sur les agrégats de TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃

A / Porphyrine agrégée (en rouge) ; B / Porphyrine en cours de solubilisation (en vert) ; C / Superposition des deux images
Excitation à 405 nm

large (en rouge) et la porphyrine en cours de solubilisation présentant une bande plus étroite (en vert) (Figure 55). La superposition des deux images permet de situer la porphyrine fortement agrégée au cœur de la structure et la porphyrine en cours de solubilisation en périphérie de l'agrégat. Cette analyse renforce l'hypothèse selon laquelle les structures observées en fluorescence dans les premières minutes des expériences de vidéomicroscopie sont des agrégats. Le fait que la porphyrine en cours de solubilisation contribue significativement à ce signal montre que cette agrégation est réversible, ce qui permet de comprendre la rapidité d'internalisation des porphyrines par les cellules tumorales lors des expériences de vidéomicroscopie.

2.3.2.3 > Effet du sérum sur l'internalisation

La mise en évidence d'une agrégation extracellulaire de la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃ conduit à s'interroger sur l'effet de la présence de transporteurs plasmatiques (LDL, HDL, albumine) sur l'internalisation. En plus de favoriser la désagrégation du photosensibilisateur, ces

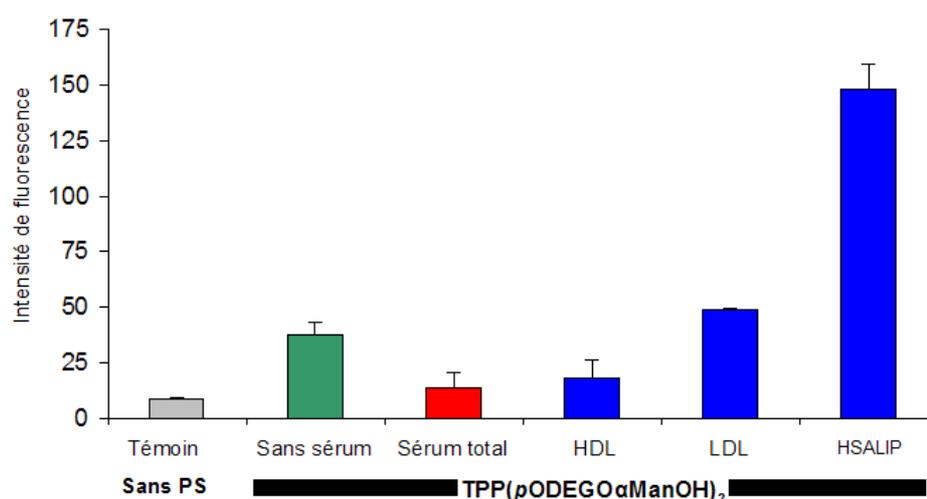


Figure 56 - Effet du sérum sur l'internalisation du photosensibilisateur

Intensité de fluorescence mesurée par cytométrie en flux

2 > Internalisation & localisation subcellulaire

transporteurs pourraient favoriser des mécanismes d'internalisation spécifiques (par exemple, une internalisation par les récepteurs membranaires aux LDL). La cytométrie en flux permet, par mesure de l'intensité de fluorescence de la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃, d'évaluer sa quantité internalisée par les cellules A549 (Figure 56). Dans le cas d'une incubation sans photosensibilisateur, le signal mesuré, $8,7 \pm 0,7$, correspond à l'autofluorescence des cellules. Les intensités obtenues dans les autres conditions sont supérieures à celles de ce témoin. En présence de sérum humain, l'intensité mesurée reste faible ($14,0 \pm 6,6$) alors qu'en l'absence de sérum, l'internalisation du photosensibilisateur est nettement augmentée, comme le montre l'intensité de fluorescence enregistrée ($37,7 \pm 5,4$).

La diminution d'internalisation en présence de sérum peut s'expliquer à l'aide des expériences réalisées avec les principaux constituants plasmatiques, HDL, LDL et HSA, pris séparément. Les expériences de distribution plasmatiques (voir § 1.2.2) ont montré que les HDL sont les principaux transporteurs plasmatiques de la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃. Le fait que la présence de ces lipoprotéines diminue l'internalisation du photosensibilisateur ($17,8 \pm 8,3$) permet de comprendre l'effet du sérum total. Par rapport au signal enregistré en l'absence de sérum, les deux autres constituants testés contribuent à accroître l'internalisation de la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃, augmentation légère dans le cas des LDL (intensité de $48,5 \pm 1,2$), augmentation très nette dans le cas de l'albumine (intensité de $148,0 \pm 11,3$). La présence de lipoprotéines et protéines plasmatiques humaines modifie donc profondément la quantité internalisée, ce qui pourrait suggérer des modifications de modes d'internalisation. En revanche, la localisation subcellulaire ne semble pas être affectée par la présence de sérum dans le milieu de culture, l'enregistrement d'images en présence et en absence de SVF n'ayant pas montré de nette différence.

2.4 > Discussion

2.4.1 > Internalisation et localisation subcellulaire de la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃

Les expériences de vidéomicroscopie ont permis de mettre en évidence un effet PDT, objectivé par une désorganisation du tapis cellulaire. La rapidité de l'effet PDT (visible dès 30 minutes) n'est pas incompatible avec les mesures de cinétique d'internalisation par cytométrie réalisées précédemment sur ce composé. Ces expériences avaient conclu à une internalisation maximale au bout de quatre heures. La différence doit être probablement attribuée à la forte concentration en porphyrine dans ces expériences de microscopie. En effet, pour détecter un signal de fluorescence, il faut une concentration en porphyrine ($4 \mu\text{M}$ dans ces expériences) très

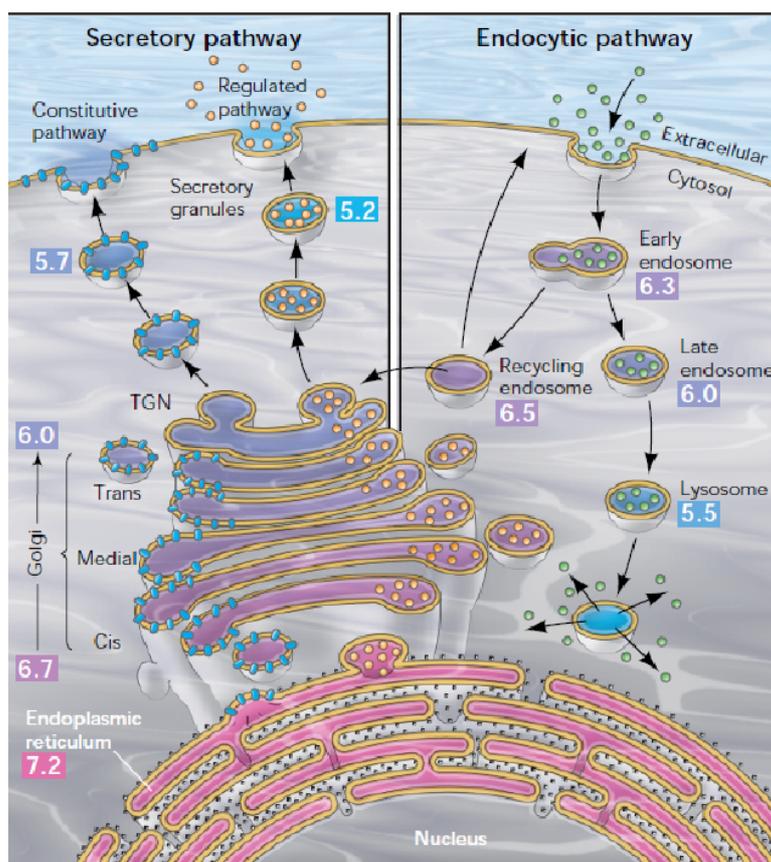


Figure 57 - Valeurs de pH des organites impliqués dans la voie sécrétoire et l'endocytose

Repris de Paroutis (doi : 10.1152/physiol.00005.2004)

élevée. A titre de comparaison, cette concentration est très nettement supérieure à la dose létale 50 sur les cellules Y79 (0,35 μM pour cette porphyrine). Si l'on mesure l'intensité de fluorescence au niveau d'une cellule au cours du temps, on peut remarquer une augmentation continue, signe que l'internalisation continue à augmenter même après 30 minutes d'incubation. De même, le mode de mort cellulaire évoqué, une nécrose, ne saurait être généralisé sur la base de ces expériences : il résulte non seulement de la forte concentration en photosensibilisateur, mais aussi de la forte puissance du laser du microscope. En revanche, la vidéomicroscopie n'a pas permis de fournir de réponse quant au mode d'internalisation de la TPP($p\text{ODEGO}\alpha\text{ManOH}$)₃. Il convient donc de confronter les résultats expérimentaux avec les deux modes d'internalisation envisagés pour la modélisation : diffusion depuis le milieu extracellulaire, ou internalisation de type « endocytose ».

2.4.1.1 > Hypothèse d'une diffusion depuis le milieu extracellulaire

L'application du modèle de Trapp aux TPP montre que, dans certaines conditions de lipophilie, les équilibres de protonation pourraient expliquer une accumulation du

2 > Internalisation & localisation subcellulaire

photosensibilisateur dans des organites aussi acides que les lysosomes. En revanche, les équilibres physico-chimiques ne permettent pas de comprendre une localisation au niveau du réticulum, telle qu'elle a été observée expérimentalement pour la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃. En effet, le pH neutre de cet organite ne permet pas d'envisager un rôle des équilibres de protonation (219). Cette localisation particulière pourrait être attribuée à d'autres spécificités de cet organite. Par exemple, le réticulum contient des lectines spécifiques, telles que la calnexine et la calréticuline, ces deux protéines intervenant physiologiquement dans le repliement des glycoprotéines (220). En plus de son rôle dans la synthèse des protéines, le réticulum intervient dans la synthèse des lipides (221). La composition lipidique de ses membranes est très particulière puisque c'est l'un des rares organites à posséder des phosphatidylcholines à sa surface cytosolique (222). Cependant, l'implication de spécificités du réticulum pour expliquer la localisation de la TPP ne permettrait pas de comprendre la relocalisation ultérieure décrite par Laville *et al.* sur les cellules Y79 (31). Dans ces cellules Y79, la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃, localisée dans un premier temps au niveau du réticulum endoplasmique, se redistribue ensuite vers l'ensemble des membranes de la cellule (31). L'hypothèse d'une diffusion depuis le milieu extracellulaire ne permet pas de comprendre *a priori* la localisation du photosensibilisateur dans le réticulum. Il convient donc d'évaluer la seconde hypothèse.

2.4.1.2 > Hypothèse d'une internalisation de type « endocytose »

Le second mode d'internalisation envisagé est une endocytose (Figure 57). Les résultats de cytométrie en flux ont montré que l'internalisation en présence d'albumine ou de LDL était plus élevée qu'en l'absence de tout constituant plasmatique. Ces éléments pourraient suggérer la coexistence de trois voies d'internalisation différentes : l'une en l'absence de sérum, l'une par association aux LDL et une par association à l'albumine. L'existence de récepteurs aux LDL est classique sur les cellules tumorales tandis que la présence de récepteurs à l'albumine a été décrite sur les cellules pulmonaires (27). Ces internalisations médiées par des récepteurs sont susceptibles de conduire à une endocytose (223). De plus, la même voie pourrait être mise en jeu en l'absence de SVF, par exemple par l'intermédiaire d'autres récepteurs (par exemple, de type lectine) (36; 224; 225) ou suite à l'association du photosensibilisateur avec la membrane cellulaire. Pour les cellules Y79, Laville *et al.* ont proposé l'hypothèse d'une internalisation médiée par les lectines. Cette hypothèse s'appuie notamment sur deux résultats expérimentaux : l'internalisation par les cellules Y79 est glucose-dépendante et est inhibée par la présence d'albumine mannosylée (31).

Dans le cas d'une endocytose, pour expliquer la localisation de la TPP(ρ ODEGO α ManOH)₃ au niveau du réticulum endoplasmique, une possibilité serait qu'après

endocytose, cette TPP passe par les endosomes de recyclage soit pour retourner vers la membrane, soit pour atteindre l'appareil de Golgi, puis le réticulum. Cette voie a été évoquée pour d'autres photosensibilisateurs couplés à des toxines (226). Les vésicules visibles en microscopie, d'un diamètre inférieur à 1 μm (Figure 52), présentent une taille compatible avec les endosomes, les vésicules de pinocytose étant plus petites (227). De plus, cette hypothèse permettrait de comprendre que comme l'ont observé Laville *et al.*, à des temps d'incubation plus longs, le photosensibilisateur ne soit plus localisé uniquement dans le réticulum, mais au niveau de toutes les membranes plasmiques. En effet, cette redistribution pourrait être la conséquence du trafic de ces vésicules de recyclage entre le réticulum et les différentes membranes cellulaires (228). La cinétique de ce phénomène n'est pas incompatible avec la vitesse de recyclage des membranes cellulaires (2 à 3 % de la membrane plasmique par minute), qui permet un renouvellement complet en moins d'une heure (229).

Si le chemin d'accès proposé ci-dessus permet de comprendre les résultats de localisation observés, il faut s'interroger sur le fait que le photosensibilisateur suive le trajet de ces vésicules sans en sortir. Les endosomes présentent un pH de l'ordre de 6 – 6,5, une valeur qui ne permet pas d'expliquer une séquestration du photosensibilisateur par protonation, comme l'a montré la modélisation. De plus, les expériences de microscopie n'ont pas permis de mettre en évidence les spectres caractéristiques des formes protonées, même s'il reste difficile d'exclure définitivement leur présence minoritaire (les lasers disponibles ne permettent pas d'exciter une hypothétique forme protonée à une longueur d'onde où son absorbance est supérieure à la forme non protonée). Si l'ionisation ne peut être invoquée, le fait que la TPP($p\text{ODEGO}\alpha\text{ManOH}$)₃ ne quitte pas les endosomes est probablement le résultat de la rapidité du transit (de l'ordre de 2 – 3 minutes pour les endosomes précoces (227)) couplée à la lipophilie relativement élevée de la TPP($p\text{ODEGO}\alpha\text{ManOH}$)₃. Cette lipophilie favorise une forte association aux structures lipidiques, telles que les membranes phospholipidiques. La modélisation a montré que, pour un composé présentant des pK proches de la TPP($p\text{ODEGO}\alpha\text{ManOH}$)₃, la quasi-totalité du photosensibilisateur pourrait être associée aux structures lipidiques. De plus, le caractère amphiphile et la taille de ce dérivé doivent limiter sa diffusion à travers les membranes.

2.4.2 > Orientation de la TPP($p\text{ODEGO}\alpha\text{ManOH}$)₃ vers les endosomes de recyclage

Au-delà de la présence de la TPP($p\text{ODEGO}\alpha\text{ManOH}$)₃ dans les endosomes précoces, le principal problème est de comprendre l'orientation vers les endosomes de recyclage plutôt que vers les lysosomes. En effet, en évoquant une endocytose, les différents mécanismes d'internalisation conduisent à envisager l'implication de la voie conduisant, par l'intermédiaire des endosomes, aux lysosomes. Pour expliquer le recyclage des récepteurs, Mellman *et al.* ont

2 > Internalisation & localisation subcellulaire

évoqué un effet géométrique : les récepteurs et protéines membranaires s'accumuleraient dans les extensions tubulaires des endosomes précoces, ces structures présentant une surface relative plus grande, tandis que les composés solubles s'accumuleraient dans les vésicules, ces structures possédant un volume relatif supérieur. Les extensions tubulaires des endosomes précoces sont recyclés tandis que les structures vésiculaires seraient à l'origine des endosomes tardifs et des lysosomes (227). Le même phénomène appliqué à la TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃ permettrait de comprendre que cette structure, fortement liée aux membranes (comme le suggèrent les résultats de modélisation) et donc potentiellement plus présente dans les extensions tubulaires, rejoigne ensuite les endosomes de recyclage puis l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique.

En combinant approche expérimentale et modélisation, il a été possible de formuler des hypothèses expliquant la localisation subcellulaire de la TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃. L'orientation vers le réticulum ou le lysosome dépendrait notamment de la localisation de la TPP dans l'endosome précoce, soit dans la lumière, soit associée aux membranes. Cependant ces mêmes hypothèses peuvent-elles s'appliquer aux autres photosensibilisateurs de structure apparentée décrits dans la littérature ? Selon ces hypothèses, la forte lipophilie des TPP monosubstituées doit favoriser leur association aux membranes des endosomes, et donc orienter leur localisation vers le réticulum endoplasmique, par l'intermédiaire des endosomes de recyclage. C'est le cas de la TPPS1, dérivé monosulfonaté, qui se localise effectivement au niveau du réticulum endoplasmique (230). A l'inverse, des composés plus hydrophiles doivent se localiser au niveau de la lumière des endosomes précoces, et donc être orientés vers les lysosomes. Cela devrait concerner des dérivés tels que la TPPS4 et la TMPP (Tétraméthylpyridylporphyrine), deux composés tétrasubstitués en *para*. La conformation relativement rigide de ces composés, couplée à la charge non-nulle de leur substituants, défavorise *a priori* leurs interactions avec les membranes. Les études réalisées pour ces deux composés ont conclu à une localisation lysosomale (230; 231). Deux éléments supplémentaires sont à signaler : une internalisation par endocytose a été confirmée pour la TMPP par Richelli *et al.* (231) tandis qu'une protonation de la TPPS4 a été suspectée par Wessels *et al.* (232). Ce dernier point est intéressant puisque la modélisation avait montré le rôle éventuel de la protonation dans les lysosomes pour les composés les plus solubles.

Le rôle évoqué de l'association aux membranes des endosomes précoces dans la localisation ultérieure du photosensibilisateur trouve tout son intérêt avec le cas particulier des TPP disubstituées. En effet, pour ces dérivés, le cas est plus complexe que pour les monosubstituées, en raison de deux conformations différentes possibles : substituants adjacents (positions 5 et 10) ou substituants opposés (positions 5 et 15). Ces deux conformations possibles sont à l'origine d'une des observations les plus couramment citées pour illustrer la complexité des phénomènes régissant la localisation subcellulaire des photosensibilisateurs : une tétraphénylporphyrine portant

deux résidus triméthylammonium sur des phényles voisins s'accumule dans les mitochondries alors que l'isomère dont les substituants sont situés sur des phényles opposés se situe au niveau des lysosomes (233). Deux isomères pour deux localisations et, *in fine*, deux mécanismes d'action différents : d'un côté, une initiation de l'apoptose par attaque des mitochondries, de l'autre, une destruction de la cellule accélérée par le relargage du contenu des lysosomes. Le dérivé présentant des substituants polaires opposés (positions 5-15) est moins lipophile que le dérivé avec des substituants polaires voisins, comme l'avait montré la comparaison des deux analogues glycoconjugués (TPP(ρ O β GluOH)₂ 5-10 et TPP(ρ O β GluOH)₂ 5-15) que nous avons étudiés. Moins associé aux lipides que son isomère 5-10, le composé avec deux résidus triméthylammonium sur des phényles opposés serait alors plutôt localisé au niveau de la lumière des endosomes précoces, ce qui favoriserait son orientation vers les lysosomes. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les dérivés plus polaires portant trois ou quatre résidus triméthylammonium partagent cette localisation lysosomale (233).

Si nos résultats peuvent fournir une hypothèse à l'absence de séquestration lysosomale du dérivé de type 5-10, ils ne peuvent rendre compte de sa localisation mitochondriale. Le potentiel membranaire des mitochondries pourrait être évoqué mais son rôle reste largement discuté (231; 234). De même, nos résultats ne peuvent pas expliquer les localisations décrites pour la TPP(m OH)₄ et la chlorine correspondante, la *m*THPC, un des photosensibilisateurs de référence (réticulum endoplasmique, appareil de Golgi, mais aussi mitochondries ou lysosomes) (21; 46; 68; 218). La modélisation a permis d'évaluer l'importance des équilibres physico-chimiques, attribuant un rôle central à la lipophilie au détriment de l'ionisation dans le cas d'une internalisation de type « endocytose ». Cependant, les hypothèses proposées sur la base de ces résultats restent à être validées pour un plus grand nombre de composés de lipophilies variées.

>>>

Conclusion

Conclusion

>>>

L'objectif initial de la glycoconjugaison était de répondre à une double problématique, solubilité en milieu biologique d'une part et ciblage des cellules tumorales d'autre part. A l'issue de ce travail, il

apparaît que l'impact de cette stratégie sur les propriétés du photosensibilisateur est étroitement lié au mode de greffage des sucres sur le noyau TPP. Si des modifications spectrales ont pu être reliées à des variations de substitution, les différences mises en évidence semblent trop minimes pour être un critère discriminant dans le développement de nouveaux photosensibilisateurs. En revanche, de profondes différences ont pu être soulignées pour les autres propriétés physico-chimiques étudiées, que ce soit pour les possibilités d'ionisation ou pour la lipophilie. Position, nombre ou nature du substituant se sont révélés susceptibles d'affecter ces deux paramètres.

Tout au long de cette approche physico-chimique, l'effet de la position du substituant se distingue comme l'un des effets de substitution les plus marquants. Ainsi, un dérivé TPP substitué en position *para* sera nettement plus basique et plus polaire que le dérivé portant des substituants équivalents en position *méta*. Les conséquences des autres effets de substitution étudiés apparaissent plus prévisibles, notamment en ce qui concerne l'impact sur la lipophilie : les TPP glycoconjuguées sont moins hydrophobes que les dérivés hydroxylés, tandis que la lipophilie diminue avec l'augmentation du nombre de substituants. Dans la série *méta*, le nombre et la nature des substituants n'influent que peu sur la basicité ; dans la série *para*, la basicité augmente avec le degré de substitution et le caractère électrodonneur des substituants. L'effet de l'insertion d'un espaceur éthylène glycol entre le phényle et le sucre retient également l'attention. Si cette insertion n'augmente que peu la basicité, elle accroît nettement la lipophilie du dérivé obtenu, faisant d'un dérivé triglycoconjugué en *para* un composé plus lipophile que le dérivé triglycoconjugué en *méta*.

Les études dans le plasma ont montré que ces différents effets de substitution affectent également la distribution plasmatique. Même glycoconjuguées, les TPP conservent une

relativement forte affinité pour les lipoprotéines et protéines plasmatiques. Celle-ci permet d'éviter une agrégation qui serait préjudiciable à l'initiation des processus photophysiques, cœur du mécanisme d'action en PDT. A l'exception des deux dérivés tétraglycoconjugués en position *para* (majoritairement liés à la fraction protéique), les HDL constituent les principaux transporteurs des TPP glycoconjuguées dans le plasma. La TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃ présente une distribution plasmatique plus proche de la TPP(*m*O β GluOH)₃ que de la TPP(*p*O β GalOH)₃. Une conclusion analogue s'applique à la modélisation des interactions avec l'albumine, la flexibilité de l'espaceur permettant à la TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃ d'interagir à un site en partie commun avec celui des dérivés *méta*. Cet effet de l'espaceur sur la distribution plasmatique comme l'effet de position font écho à l'influence de ces deux paramètres sur la lipophilie. En effet, la lipophilie est classiquement considérée comme un facteur déterminant de la distribution plasmatique. Si nos études ont permis de mettre en évidence un lien étroit entre les affinités pour les HDL et les LDL et la lipophilie, elles ont également montré que l'affinité pour l'albumine semblait répondre à des lois plus complexes. La glycoconjugaison est donc susceptible de modifier non seulement la nature du transporteur plasmatique principal de la TPP, mais également la force des interactions mises en jeu, cette dernière pouvant affecter la capacité du photosensibilisateur à se dissocier de son transporteur pour atteindre la cible du traitement. L'impact de chacun de ces deux éléments différents sur le devenir *in vivo* du photosensibilisateur reste cependant à préciser.

Les études réalisées pour la TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃ sur les cellules A549 ont permis de mettre en évidence une localisation de cette TPP au niveau du réticulum endoplasmique. LDL et albumine se sont montrés capables de favoriser l'internalisation, contrairement aux HDL, résultat suggérant l'existence de multiples mécanismes d'internalisation différents. En complétant cette approche expérimentale d'une modélisation des équilibres, il a été possible de proposer des hypothèses sur les phénomènes régissant la localisation subcellulaire des dérivés TPP. Dans le cas d'une internalisation par endocytose, cette localisation pourrait notamment être attribuée à une forte association du photosensibilisateur avec les membranes des endosomes précoces.

Au moment de conclure ce travail, de nombreuses questions restent en suspens et ne demandent qu'à être explorées plus en détail : quelle est la lipophilie des TPP protonées ? Quelles sont les possibilités de déplacement d'équilibre d'ionisation *in vivo*, par exemple suite à des interactions avec les structures lipidiques ? Quelles voies sont mises en jeu pour l'internalisation des photosensibilisateurs, seuls et associés à des transporteurs plasmatiques ? Ces questions ne doivent cependant pas occulter la problématique cruciale, qui est de mieux appréhender l'effet de la distribution plasmatique et de la localisation subcellulaire sur l'efficacité. Une meilleure compréhension des phénomènes impliqués constitue un préalable indispensable avant d'envisager, à plus long terme, l'établissement de relations structure – efficacité *in vivo*.

>>>

Publications

Publications

>>>

Publications

Plasma distribution of tetraphenylporphyrin derivatives relevant for Photodynamic Therapy: importance and limits of hydrophobicity

B. Chauvin, B. Iorga, P. Chaminade, J.-L. Paul, P. Maillard, P. Prognon, A. Kasselouri, A. soumettre

Diprotonation process of meso-tetraphenylporphyrin derivatives designed for photodynamic therapy of cancers: from Multivariate Curve Resolution to predictive QSPR modeling

B. Chauvin, A. Kasselouri, P. Chaminade, R. Quiameso, I. Nicolis, P. Maillard, P. Prognon, *Analytica Chimica Acta*, **2011**, accepté, doi : 10.1016/j.aca.2011.07.001

Communications affichées

A chemometric solution to the challenging diprotonation process of meso-tetraphenylporphyrin derivatives

B. Chauvin, A. Kasselouri, P. Prognon, P. Maillard, P. Chaminade, *12th International Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry*, Anvers (Belgique), octobre **2010**

Affinité de photosensibilisateurs tétraphénylporphyrine pour l'albumine : Effet de la glycoconjugaison

B. Chauvin, A. Kasselouri, P. Maillard, P. Prognon, *GDR Photomed*, Paris, septembre **2010**

Chimiometric approach of electronic spectroscopy of tetraphenylporphyrin derivatives with potential photodynamic activity

B. Chauvin, H. Ibrahim, A. Kasselouri, P. Maillard, P. Prognon, *XIII International Symposium on Luminescence Spectrometry*, Bologne (Italie), septembre **2008**

Communication orale

Ionisation coopérative : l'exemple d'une série de tétraphénylporphyrines

B. Chauvin, A. Kasselouri, P. Prognon, P. Chaminade, *Journées de l'AFECAB*, Rennes, septembre **2008**

> > >

Références bibliographiques

Références bibliographiques

> > >

- (1) E. Ledo, A. Ledo *Clin. Dermatol.* **2000**, *18*, 77-86.
- (2) R.M. Bohmer, G. Morstyn *Cancer Res.* **1985**, *45*, 5328-5334.
- (3) F. Doz *Arch. Pediatr.* **2006**, *13*, 1329-1337.
- (4) S. Stylli, A. Kaye *J. Clin. Neurosci.* **2006**, *13*, 615-625.
- (5) P. Prognon, A. Kasselouri, M. Desroches, J. Blais, P. Maillard *Ann. Pharm. Fr.* **2008**, *66*, 71-76.
- (6) P. Maillard, B. Looock, D. Grierson, I. Laville, J. Blais, F. Doz, L. Desjardins, D. Carrez, J.-L. Guerquin-Kern, A. Croisy *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **2007**, *4*, 261-268.
- (7) R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 656-669.
- (8) E. Sternberg *Tetrahedron* **1998**, *54*, 4151-4202.
- (9) K.R. Weishaupt, C.J. Gomer, T.J. Dougherty *Cancer Res.* **1976**, *36*, 2326-2329.
- (10) E.S. Nyman, P.H. Hynninen *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2004**, *73*, 1-28.
- (11) R. Allison *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **2004**, *1*, 27-42.
- (12) H.C. Wolfsen *J. Clin. Gastroenterol.* **2005**, *39*, 653-664.
- (13) M.A.M. Capella, L.S. Capella *J. Biomed. Sci.* **2003**, *10*, 361-366.
- (14) J.J. Schuitmaker, P. Baas, H.L. van Leengoed, F.W. van der Meulen, W.M. Star, N. van Zandwijk *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **1996**, *34*, 3-12.
- (15) V.A. Schwarz, R. Hornung, A. Fedier, M.K. Fehr, H. Walt, U. Haller, D. Fink *Br. J. Cancer* **2002**, *86*, 1130-1135.
- (16) K. O'Riordan, O.E. Akilov, T. Hasan *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **2005**, *2*, 247-262.
- (17) E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1776*, 86-107.
- (18) G. Jori, L. Schindl, A. Schindl, L. Polo *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **1996**, *102*, 101-107.
- (19) A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **2004**, *1*, 279-293.
- (20) M. Alexiades-Armenakas *Clin. Dermatol.* **2006**, *24*, 16-25.

- (21) P. Agostinis, K. Berg, K.A. Cengel, T.H. Foster, A.W. Girotti, S.O. Gollnick, S.M. Hahn, M.R. Hamblin, A. Juzeniene, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, P. Mroz, D. Nowis, J. Piette, B.C. Wilson, J. Golab *CA - Cancer J. Clin.* **2011**, *61*, 250-281.
- (22) A.S. Sobolev, D.A. Jans, A.A. Rosenkranz *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000**, *73*, 51-90.
- (23) M.K. Kuimova, G. Yahioglu, P.R. Ogilby *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 332-340.
- (24) M. Ochsner *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **1997**, *39*, 1-18.
- (25) D. Kessel *Medical Laser Application* **2006**, *21*, 219-224.
- (26) I.J. MacDonald, T.J. Dougherty *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, *5*, 105-129.
- (27) A.A. Rosenkranz, D.A. Jans, A.S. Sobolev *Immunol. Cell Biol.* **2000**, *78*, 452-464.
- (28) S. Griegel, M.F. Rajewsky, T. Ciesiolka, H.J. Gabius *Anticancer Res.* **1989**, *9*, 723-730.
- (29) X. Zheng, R.K. Pandey *Anticancer Agents Med. Chem.* **2008**, *8*, 241-268.
- (30) S. Hirohara, M. Obata, S. Ogata, K. Kajiwara, C. Ohtsuki, M. Tanihara, S. Yano *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2006**, *84*, 56-63.
- (31) I. Laville, S. Pigaglio, J.-C. Blais, F. Doz, B. Loock, P. Maillard, D.S. Grierson, J. Blais *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 2558-2567.
- (32) A. Makky, J.P. Michel, P. Maillard, V. Rosilio *BBA - Biomembranes* **2011**, *1808*, 656-666.
- (33) I. Laville, T. Figueiredo, B. Loock, S. Pigaglio, P. Maillard, D.S. Grierson, D. Carrez, A. Croisy, J. Blais *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 1643-1652.
- (34) S. Hirohara, M. Obata, A. Saito, S. Ogata, C. Ohtsuki, S. Higashida, S. Ogura, I. Okura, Y. Sugai, Y. Mikata, M. Tanihara, S. Yano *Photochem. Photobiol.* **2004**, *80*, 301-308.
- (35) S. Hirohara, M. Obata, S. Ogata, C. Ohtsuki, S. Higashida, S. Ogura, I. Okura, M. Takenaka, H. Ono, Y. Sugai, Y. Mikata, M. Tanihara, S. Yano *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2005**, *78*, 7-15.
- (36) A.C. Roche, P. Midoux, V. Pimpaneau, E. Nègre, R. Mayer, M. Monsigny *Res. Virol.* **1990**, *141*, 243-249.
- (37) A. Segalla, F. Fedeli, E. Reddi, G. Jori, A. Cross *Int. J. Cancer* **1997**, *72*, 329-336.
- (38) G. Zheng, W.R. Potter, S.H. Camacho, J.R. Missert, G. Wang, D.A. Bellnier, B.W. Henderson, M.A. Rodgers, T.J. Dougherty, R.K. Pandey *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 1540-1559.
- (39) A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **2005**, *2*, 91-106.
- (40) M.-C. Desroches, A. Bautista-Sanchez, C. Lamotte, B. Labeque, D. Auchère, R. Farinotti, P. Maillard, D.S. Grierson, P. Prognon, A. Kasselouri *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2006**, *85*, 56-64.
- (41) I. Laville, S. Pigaglio, J.-C. Blais, B. Loock, P. Maillard, D.S. Grierson, J. Blais *Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12*, 3673-3682.
- (42) M. Lupu, C.D. Thomas, P. Maillard, B. Loock, B. Chauvin, I. Aerts, A. Croisy, E. Belloir, A. Volk, J. Mispelter *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **2009**, *6*, 214-220.

Références bibliographiques

- (43) C.A. Robertson, D.H. Evans, H. Abrahamse *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2009**, *96*, 1-8.
- (44) J. Dahle, O. Kaalhus, J. Moan, H.B. Steen *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 1773-1778.
- (45) J. Dahle, H.B. Steen, J. Moan *Photochem. Photobiol.* **1999**, *70*, 363-367.
- (46) J. Dahle, S. Bagdonas, O. Kaalhus, G. Olsen, H.B. Steen, J. Moan *BBA - Gen. Subjects* **2000**, *1475*, 273-280.
- (47) A.P. Castano, T.N. Demidova, M.R. Hamblin *Photodiagn. Photodynamic Ther.* **2005**, *2*, 1-23.
- (48) B.W. Henderson, S.M. Waldow, T.S. Mang, W.R. Potter, P.B. Malone, T.J. Dougherty *Cancer Res.* **1985**, *45*, 572-576.
- (49) W.M. Star, H.P. Marijnissen, A.E. van den Berg-Blok, J.A. Versteeg, K.A. Franken, H.S. Reinhold *Cancer Res.* **1986**, *46*, 2532-2540.
- (50) B.W. Henderson, T.J. Dougherty *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 145-157.
- (51) T. Hasan, B. Ortel, A.C. Moor, B.W. Pogue Dans *Cancer medicine* 6; BC Decker, 2003.
- (52) R. Veenhuizen, H. Oppelaar, M. Ruevekamp, J. Schellens, O. Dalesio, F. Stewart *Int. J. Cancer* **1997**, *73*, 236-239.
- (53) Q. Peng, J. Moan, L.W. Ma, J.M. Nesland *Cancer Res.* **1995**, *55*, 2620-2626.
- (54) B. Chen, B.W. Pogue, P.J. Hoopes, T. Hasan *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **2005**, *61*, 1216-1226.
- (55) S. Gupta, B.S. Dwarakanath, K. Muralidhar, V. Jain *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **2003**, *69*, 107-120.
- (56) P. Agostinis, A. Vantieghem, W. Merlevede, P.A.M. de Witte *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 221-241.
- (57) F. Danhier, O. Feron, V. Préat *J. Control. Release* **2010**, *148*, 135-146.
- (58) M. Stubbs, P.M. McSheehy, J.R. Griffiths, C.L. Bashford *Mol. Med. Today* **2000**, *6*, 15-19.
- (59) B. Cunderliková, O. Kaalhus, R. Cunderlík, A. Mateásik, J. Moan, M. Kongshaug *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*, 242-247.
- (60) J. Moan, Q. Peng, J.F. Evensen, K. Berg, A. Western, C. Rimington *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 713-721.
- (61) B. Cunderlíková, M. Kongshaug, L. Gangeskar, J. Moan *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2000**, *32*, 759-768.
- (62) P. Kubát, K. Lang, P. Anzenbacher *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1670*, 40-48.
- (63) E. Friberg, B. Cunderliková, E.O. Pettersen, J. Moan *Cancer Lett.* **2003**, *195*, 73-80.
- (64) B. Cunderlíková, L. Gangeskar, J. Moan *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **1999**, *53*, 81-90.
- (65) G.A. Wagnières, W.M. Star, B.C. Wilson *Photochem. Photobiol.* **1998**, *68*, 603-632.
- (66) H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, K. Hori *J. Control. Release* **2000**, *65*, 271-284.
- (67) W.G. Roberts, T. Hasan *Cancer Res.* **1992**, *52*, 924-930.

- (68) A. Preuß, K. Chen, S. Hackbarth, M. Wacker, K. Langer, B. Röder *Int. J. Pharm.* **2011**, *404*, 308-316.
- (69) D.F. Baban, L.W. Seymour *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *34*, 109-119.
- (70) H. Maeda *Adv. Enzyme Regul.* **2001**, *41*, 189-207.
- (71) J.T.C. Wojtyk, R. Goyan, E. Gudgin-Dickson, R. Pottier *Medical Laser Application* **2006**, *21*, 225-238.
- (72) R.A. Firestone *Bioconjug. Chem.* **1994**, *5*, 105-113.
- (73) A. Kader, A. Pater *J. Control. Release* **2002**, *80*, 29-44.
- (74) N. Chung *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 1315-1334.
- (75) L. Polo, G. Valduga, G. Jori, E. Reddi *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2002**, *34*, 10-23.
- (76) B.A. Allison, P.H. Pritchard, A.M. Richter, J.G. Levy *Photochem. Photobiol.* **1990**, *52*, 501-507.
- (77) U. Schmidt-Erfurth, H. Diddens, R. Birngruber, T. Hasan *Br. J. Cancer* **1997**, *75*, 54-61.
- (78) W. Rodriguez *Adv. Drug Deliv. Rev.* **1998**, *32*, 31-43.
- (79) S. Kascakova, M. Refregiers, D. Jancura, F. Sureau, J.-C. Maurizot, P. Miskovsky *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 1395-1403.
- (80) U. Schmidt-Erfurth, T. Hasan *Surv. Ophthalmol.* **2000**, *45*, 195-214.
- (81) A.S.L. Derycke, A. Kamuhabwa, A. Gijssens, T. Roskams, D. De Vos, A. Kasran, J. Huwyler, L. Missiaen, P.A.M. de Witte *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 1620-1630.
- (82) M. Korbelik, G. Krosi *Br. J. Cancer* **1996**, *73*, 506-513.
- (83) H.N. Fonda, J.V. Gilbert, R.A. Cormier, J.R. Sprague, K. Kamioka, J.S. Connolly *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 7024-7033.
- (84) D. Oulmi, P. Maillard, J.-L. Guerquin-Kern, C. Huel, M. Momenteau *J. Org. Chem.* **1995**, *60*, 1554-1564.
- (85) A.T.R. Williams, S.A. Winfield, J.N. Miller *Analyst* **1983**, *108*, 1067.
- (86) F. Husson, J. Josse, S. Le, J. Mazet *FactoMineR: Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining with R. R package version 1.14*; 2010.
- (87) *R Development Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2009.
- (88) N.C. Maiti, S. Mazumdar, N. Periasamy *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 1528-1538.
- (89) P. Kubát, K. Lang, K. Procházková, P. Anzenbacher *Langmuir* **2003**, *19*, 422-428.
- (90) M. Gouterman *J. Chem. Phys.* **1959**, *30*, 1139.
- (91) L. Petit, A. Quartarolo, C. Adamo, N. Russo *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 2398-2404.
- (92) L. Serrano-Andres, M. Merchan, M. Rubio, B.O. Roos *Chem. Phys. Lett.* **1998**, *295*, 195-203.
- (93) B.G. Anex, R.S. Umans *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 5026-5027.
- (94) M. Meot-Ner, A.D. Adler *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 5107-5111.

Références bibliographiques

- (95) E.B. Fleischer *Acc. Chem. Res.* **1970**, *3*, 105-112.
- (96) A.H. Corwin, A.B. Chivvis, R.W. Poor, D.G. Whitten, E.W. Baker *J. Am. Chem. Soc.* **1968**, *90*, 6577-6583.
- (97) M. Vitasovic, M. Gouterman, H. Linschitz *J. Porphyrins Phthalocyanines* **2001**, *5*, 191-197.
- (98) J.A. Shelnut, X.-Z. Song, J.-G. Ma, S.-L. Jia, W. Jentzen, C. J. Medforth, C. J. Medforth *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 31.
- (99) W. Jentzen, M.C. Simpson, J.D. Hobbs, X. Song, T. Ema, N.Y. Nelson, C.J. Medforth, K.M. Smith, M. Veyrat *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11085-11097.
- (100) V.N. Knyukshto, K.N. Solovyov, G.D. Egorova *Biospectroscopy* **1998**, *4*, 121-133.
- (101) V.S. Chirvony, A. van Hoek, V.A. Galievsky, I.V. Sazanovich, T.J. Schaafsma, D. Holten *J. Phys. Chem. B* **2000**, *104*, 9909-9917.
- (102) G. De Luca, A. Romeo, L.M. Scolaro, G. Ricciardi, A. Rosa *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 5979-5988.
- (103) S. Aronoff *J. Phys. Chem.* **1958**, *62*, 428-431.
- (104) G. Garrido, C. Rafols, E. Bosch *Eur. J. Pharm. Sci.* **2006**, *28*, 118-127.
- (105) A. Avdeef, J.E.A. Comer, S.J. Thomson *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 42-49.
- (106) F. Rived *Anal. Chim. Acta* **2001**, *439*, 315-333.
- (107) J. Diewok, A. de Juan, M. Maeder, R. Tauler, B. Lendl *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 641-647.
- (108) I.H. van Stokkum, K.M. Mullen, V.V. Mihaleva *Chemometr. Intell. Lab.* **2009**, *95*, 150-163.
- (109) *Marvin 5.2.6*; ChemAxon, <http://www.chemaxon.com>, 2009.
- (110) G.T. Balogh, B. Gyarmati, B. Nagy, L. Molnár, G.M. Keseru *QSAR Comb. Sci.* **2009**, *28*, 1148-1155.
- (111) I.V. Tetko, J. Gasteiger, R. Todeschini, A. Mauri, D. Livingstone, P. Ertl, V.A. Palyulin, E.V. Radchenko, N.S. Zefirov, A.S. Makarenko, V.Y. Tanchuk, V.V. Prokopenko *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2005**, *19*, 453-463.
- (112) *VCCLAB, Virtual Computational Chemistry Laboratory*, <http://www.vcclab.org>; 2005.
- (113) *ChemDraw 6.0.1*; CambridgeSoft Corporation, 875 Massachusetts Ave., Cambridge, MA 02139, USA, 2000.
- (114) J. Fox *Applied Regression Analysis and Generalized Linear Models*; Second Edition. Sage, 2008.
- (115) T.S. Breusch, A.R. Pagan *Econometrica* **1979**, *47*, 1287-1294.
- (116) R.D. Cook, S. Weisberg *Biometrika* **1983**, *70*, 1-10.
- (117) J. Fox *Applied Regression, Linear Models, and Related Methods*; Sage, 1997.
- (118) P. Gramatica *QSAR Comb. Sci.* **2007**, *26*, 694-701.
- (119) M. Stone *J. Roy. Stat. Soc. B* **1974**, *36*, 111-147.
- (120) B. Efron, R. Tibshirani *An Introduction to the Bootstrap*; Chapman and Hall: New York, London,

1993.

- (121) A. Tropsha, P. Gramatica, V.K. Gombar *QSAR Comb. Sci.* **2003**, *22*, 69-77.
- (122) T.P.G. Sutter, P. Hambright *Inorg. Chem.* **1992**, *31*, 5089-5093.
- (123) E.B. Fleischer, L.E. Webb *J. Phys. Chem.* **1963**, *67*, 1131-1133.
- (124) T. Gensch, C. Viappiani, S.E. Braslavsky *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 10573-10582.
- (125) A. De Juan, R. Tauler *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 195-210.
- (126) D.W. Lachenmeier, W. Kessler *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 5463-5468.
- (127) J. Mendieta, M.S. Díaz-Cruz, M. Esteban, R. Tauler *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2876-2888.
- (128) J. Chen, X.Z. Wang *J. Chem. Inf. Model.* **2001**, *41*, 992-1001.
- (129) J. Jaumot *Nucleic Acids Res.* **2002**, *30*, 92e-92.
- (130) A. Checa, V. Soto, S. Hernandez-Cassou, J. Saurina *Anal. Chim. Acta* **2005**, *554*, 177-183.
- (131) J. Saurina *Anal. Chim. Acta* **2000**, *408*, 135-143.
- (132) M. Vosough, C. Mason, R. Tauler, M. Jalali-Heravi, M. Maeder *J. Chemometrics* **2006**, *20*, 302-310.
- (133) R. Rajkó *Anal. Chim. Acta* **2009**, *645*, 18-24.
- (134) M. Boronat, E. Orti, P. Viruela, F. Tomas *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1997**, *390*, 149-156.
- (135) J.T. Edsall, R.B. Martin, B.R. Hollingworth *P. Natl. Acad. Sci. USA* **1958**, *44*, 505-518.
- (136) J. Jaumot, R. Gargallo, A. Dejuan, R. Tauler *Chemometr. Intell. Lab.* **2005**, *76*, 101-110.
- (137) R.F. Pasternack, N. Sutin, D.H. Turner *J. Am. Chem. Soc.* **1976**, *98*, 1908-1913.
- (138) A. Neuberger, J.J. Scott *P. Roy. Soc. Lond. A Mat.* **1952**, *213*, 307-326.
- (139) S. Thyagarajan, T. Leiding, S.P. Arsköld, A.V. Cheprakov, S.A. Vinogradov *Inorg. Chem.* **2010**, *49*, 9909-9920.
- (140) T. Honda, T. Kojima, S. Fukuzumi *Chem. Commun.* **2009**, 4994.
- (141) K.M. Barkigia, M.D. Berber, J. Fajer, C.J. Medforth, M.W. Renner, K.M. Smith *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 8851-8857.
- (142) T.P.G. Sutter, R. Rahimi, P. Hambright, J.C. Bommer, M. Kumar, P. Neta *Faraday Trans.* **1993**, *89*, 495.
- (143) K. Kohata, H. Higashio, Y. Yamaguchi, M. Koketsu, T. Odashima *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 668-679.
- (144) B.A. Conroy, K.A. Freeman, F. Hibbert, K.P.P. Hunte, H.J. Robbins, K.D. Somasundaram *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2* **1977**, 2076.
- (145) A. Ghosh *J. Mol. Struct. (Theochem)* **1996**, *388*, 359-363.
- (146) J.R. Weinkauff, S.W. Cooper, A. Schweiger, C.C. Wamser *J. Phys. Chem. A* **2003**, *107*, 3486-3496.
- (147) R.A. Ransdell, C.C. Wamser *J. Phys. Chem.* **1992**, *96*, 10572-10575.

Références bibliographiques

- (148) P. Worthington *J. Inorg. Biochem.* **1980**, *12*, 281-291.
- (149) L.H. Hall, B. Mohny, L.B. Kier *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1991**, *10*, 43-51.
- (150) L.H. Hall, B. Mohny, L.B. Kier *J. Chem. Inf. Model.* **1991**, *31*, 76-82.
- (151) L.H. Hall, B.K. Mohny, L.B. Kier *Quant. Struct.-Act. Relat.* **1993**, *12*, 44-48.
- (152) L.H. Hall, L.B. Kier *J. Chem. Inf. Model.* **1995**, *35*, 1039-1045.
- (153) Hall, Kier *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2000**, *40*, 784-791.
- (154) L.B. Kier, L.H. Hall, J.W. Frazer *J. Math. Chem.* **1991**, *7*, 229-241.
- (155) L.B. Kier, L.H. Hall *Pharm. Res.* **1990**, *7*, 801-807.
- (156) J. Yu, B.S. Yu, K. Cheong, H. Choi, S.-C. Yu *Bull. Kor. Chem. Soc.* **1998**, *19*, 439-444.
- (157) H. Guo, J. Jiang, Y. Shi, Y. Wang, J. Liu, S. Dong *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 10185-10191.
- (158) H. Kubinyi *Quant. Struct.-Act. Relat.* **2002**, *21*, 348-356.
- (159) K. Valko, C. Bevan, D. Reynolds *Anal. Chem.* **1997**, *69*, 2022-2029.
- (160) L.G. Gagliardi, C.B. Castells, C. Ràfols, M. Rosés, E. Bosch *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 3180-3187.
- (161) R. Mannhold, G.I. Poda, C. Ostermann, I.V. Tetko *J. Pharm. Sci.* **2009**, *98*, 861-893.
- (162) H. Zhu, A. Sedykh, S.K. Chakravarti, G. Klopman *Current Computer - Aided Drug Design* **2005**, *1*, 3-9.
- (163) T. Cheng, Y. Zhao, X. Li, F. Lin, Y. Xu, X. Zhang, Y. Li, R. Wang, L. Lai *J. Chem. Inf. Model.* **2007**, *47*, 2140-2148.
- (164) *molinspiration*, <http://www.molinspiration.com>.
- (165) I.V. Tetko, V.Y. Tanchuk *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **2002**, *42*, 1136-1145.
- (166) V.N. Viswanadhan, A.K. Ghose, G.R. Revankar, R.K. Robins *J. Chem. Inf. Model.* **1989**, *29*, 163-172.
- (167) P. Ferrara, J. Apostolakis, A. Caflisch *Proteins* **2002**, *46*, 24-33.
- (168) E. Fuguet, C. Ràfols, E. Bosch, M. Rosés *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216*, 7798-7805.
- (169) S. Sugio, A. Kashima, S. Mochizuki, M. Noda, K. Kobayashi *Protein Eng.* **1999**, *12*, 439-446.
- (170) J. Ghuman, P.A. Zunszain, I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, M. Otagiri, S. Curry *J. Mol. Biol.* **2005**, *353*, 38-52.
- (171) L.S. Kumpula, J.M. Kumpula, M.-R. Taskinen, M. Jauhiainen, K. Kaski, M. Ala-Korpela *Chem. Phys. Lipids* **2008**, *155*, 57-62.
- (172) T. Teerlink, P.G. Scheffer, S.J.L. Bakker, R.J. Heine *J. Lipid Res.* **2004**, *45*, 954-966.
- (173) P.O. Kwiterovich *Am. J. Cardiol.* **2000**, *86*, 5L-10L.
- (174) T. Hevonoja, M.O. Pentikäinen, M.T. Hyvönen, P.T. Kovanen, M. Ala-Korpela *Biochim. Biophys. Acta* **2000**, *1488*, 189-210.
- (175) H.J. Hopkinson, D.I. Vernon, S.B. Brown *Photochem. Photobiol.* **1999**, *69*, 482-488.
- (176) T. Ohnishi, N.A.L. Mohamed, A. Shibukawa, Y. Kuroda, T. Nakagawa, S. El Gizawy, H.F. Askal,

- M.E. El Kommos *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2002**, *27*, 607-614.
- (177) E.F. Pettersen, T.D. Goddard, C.C. Huang, G.S. Couch, D.M. Greenblatt, E.C. Meng, T.E. Ferrin *J. Comput. Chem.* **2004**, *25*, 1605-1612.
- (178) *Cambridge Structural Database*, <http://www.ccdc.cam.ac.uk>.
- (179) O. Trott, A.J. Olson *J. Comput. Chem.* **2010**, *31*, 455-461.
- (180) J. Oravcová, B. Böhs, W. Lindner *J. Chromatogr. B* **1996**, *677*, 1-28.
- (181) D. Hage, S. Tweed *J. Chromatogr. B* **1997**, *699*, 499-525.
- (182) E.F. Healy *J. Chem. Educ.* **2007**, *84*, 1304.
- (183) A. Cornish-Bowden *Methods* **2001**, *24*, 181-190.
- (184) I. Borissevitch *J. Lumin.* **1996**, *69*, 65-76.
- (185) A. de Juan, R. Tauler *Cr. Rev. Anal. Chem.* **2006**, *36*, 163 - 176.
- (186) I. Petitpas, A.A. Bhattacharya, S. Twine, M. East, S. Curry *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22804-22809.
- (187) A. Saifer, L. Goldman *J. Lipid Res.* **1961**, *2*, 268-270.
- (188) A.A. Bhattacharya, T. Grüne, S. Curry *J. Mol. Biol.* **2000**, *303*, 721-732.
- (189) I. Petitpas, T. Grüne, A.A. Bhattacharya, S. Curry *J. Mol. Biol.* **2001**, *314*, 955-960.
- (190) K. Paal, A. Shkarupin *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7568-7575.
- (191) M. Wardell, Z. Wang, J.X. Ho, J. Robert, F. Ruker, J. Ruble, D.C. Carter *Biochem. Bioph. Res. Co.* **2002**, *291*, 813-819.
- (192) P.A. Zunszain, J. Ghuman, T. Komatsu, E. Tsushida, S. Curry *BMC Struct. Biol.* **2003**, *3*.
- (193) P. Chris De Smidt, A. Jenny Versluis, T.J. Van Berkel *Biochemistry* **1993**, *32*, 2916-2922.
- (194) M. Kongshaug, J. Moan *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **1995**, *21*, 371-384.
- (195) K. Valko, S. Nunhuck, C. Bevan, M.H. Abraham, D.P. Reynolds *J. Pharm. Sci.* **2003**, *92*, 2236-2248.
- (196) M.E. Milanesio, M.G. Alvarez, E.I. Yslas, C.D. Borsarelli, J.J. Silber, V. Rivarola, E.N. Durantini *Photochem. Photobiol.* **2001**, *74*, 14-21.
- (197) E.I. Yslas, M.G. Alvarez, N.B. Rumie Vittar, M. Bertuzzi, E.N. Durantini, V. Rivarola *Biomed. Pharmacother.* **2002**, *56*, 498-502.
- (198) S. Cohen, R. Margalit *Biochem. J.* **1990**, *270*, 325-330.
- (199) O. Rinco, J. Brenton, A. Douglas, A. Maxwell, M. Henderson, K. Indrelie, J. Wessels, J. Widin *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2009**, *208*, 91-96.
- (200) S. Patel, A. Datta *J. Phys. Chem. B* **2007**, *111*, 10557-10562.
- (201) Y. Chen, R. Miclea, T. Srikrishnan, S. Balasubramanian, T.J. Dougherty, R.K. Pandey *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2005**, *15*, 3189-3192.
- (202) H.-M. Ma, X. Chen, N. Zhang, Y.-Y. Han, D. Wu, B. Du, Q. Wei *Spectrochim. Acta A* **2009**, *72*,

Références bibliographiques

465-469.

- (203) K. Lang, J. Mosinger, D.M. Wagnerova *Coordin. Chem. Rev.* **2004**, *248*, 321-350.
- (204) S.M. Andrade, S.M.B. Costa *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1607-1619.
- (205) Q. Li, S. Seeger *Sensor Actuator* **2008**, *139*, 118-124.
- (206) F. Tian, E.M. Johnson, M. Zamarripa, S. Sansone, L. Brancaleon *Biomacromolecules* **2007**, *8*, 3767-3778.
- (207) T.G. Gantchev, R. Ouellet, J.E. van Lier *Arch. Biochem. Biophys.* **1999**, *366*, 21-30.
- (208) A. Filyasova, I. Kudelina, A. Feofanov *J. Mol. Struct.* **2001**, *565-566*, 173-176.
- (209) H. Mojzisoava, S. Bonneau, C. Vever-Bizet, D. Brault *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1768*, 366-374.
- (210) H. Ibrahim, A. Kasselouri, C. You, P. Maillard, V. Rosilio, R. Pansu, P. Prognon *J. Photochem. Photobiol. A, Chem.* **2011**, *217*, 10-21.
- (211) G. Lajos, D. Jancura, P. Miskovsky, J. Garcia-Ramos, S. Sanchez-Cortes *J. Phys. Chem. C* **2009**, *113*, 7147-7154.
- (212) Y.-F. Ho, M.-H. Wu, B.-H. Cheng, Y.-W. Chen, M.-C. Shih *BBA - Biomembranes* **2009**, *1788*, 1287-1295.
- (213) A. Makky, J.P. Michel, S. Ballut, A. Kasselouri, P. Maillard, V. Rosilio *Langmuir* **2010**, *26*, 11145-11156.
- (214) K. Kuzelova, D. Brault *Biochemistry* **1995**, *34*, 11245-11255.
- (215) J.B. Massey, H.J. Pownall *Biophys. J.* **1998**, *74*, 869-878.
- (216) A. de Juan, R. Tauler, R. Dyson, C. Marcolli, M. Rault, M. Maeder *TRAC - Trend. Anal. Chem.* **2004**, *23*, 70-79.
- (217) S. Trapp, G.R. Rosania, R.W. Horobin, J. Kornhuber *Eur. Biophys. J.* **2008**, *37*, 1317-1328.
- (218) M.-H. Teiten, L. Bezdetrnaya, P. Morlière, R. Santus, F. Guillemin *Br. J. Cancer* **2003**, *88*, 146-152.
- (219) P. Paroutis *Physiology* **2004**, *19*, 207-215.
- (220) D.B. Williams *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 615-623.
- (221) G. van Meer, D.R. Voelker, G.W. Feigenson *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9*, 112-124.
- (222) P.F. Devaux, R. Morris *Traffic* **2004**, *5*, 241-246.
- (223) M.P. Holzer, K.D. Solomon, D.T. Vroman, H.P. Sandoval, P. Margaron, T.J. Kasper, C.E. Crosson *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44*, 2954-2958.
- (224) C. Bies, C.-M. Lehr, J.F. Woodley *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004**, *56*, 425-435.
- (225) N. Yamazaki, S. Kojima, N.V. Bovin, S. André, S. Gabius, H.J. Gabius *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2000**, *43*, 225-244.
- (226) M. Amessou, D. Carrez, D. Patin, M. Sarr, D.S. Grierson, A. Croisy, A.C. Tedesco, P. Maillard, L.

- Johannes *Bioconjug. Chem* **2008**, *19*, 532-538.
- (227) I. Mellman *Annu. Rev. Cell Dev. Biol* **1996**, *12*, 575-625.
- (228) M. Lebedzinska, G. Szabadkai, A.W.E. Jones, J. Duszynski, M.R. Wieckowski *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2009**, *41*, 1805-1816.
- (229) M. Tarrago-Trani, B. Storrie *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2007**, *59*, 782-797.
- (230) Z. Malik, I. Amit, C. Rothmann *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 389-396.
- (231) F. Ricchelli, L. Franchi, G. Miotto, L. Borsetto, S. Gobbo, P. Nikolov, J.C. Bommer, E. Reddi *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2005**, *37*, 306-319.
- (232) J.M. Wessels, W. Strauss, H.K. Seidlitz, A. Rück, H. Schneckenburger *J. Photochem. Photobiol. B, Biol.* **1992**, *12*, 275-284.
- (233) D. Kessel, R. Luguay, M.G.H. Vicente *Photochem. Photobiol.* **2003**, *78*, 431-435.
- (234) J. Morgan, A.R. Oseroff *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *49*, 71-86.

Physico-chimie de méso-tétraphénylporphyrines glycoconjuguées pour la Photothérapie Dynamique : Vers une meilleure compréhension de la distribution plasmatique et de la localisation subcellulaire ?

La photothérapie dynamique (PDT) consiste en la destruction d'une tumeur par l'association de l'administration d'un photosensibilisateur et de l'exposition à la lumière visible. Ce travail comporte : i) une étude de l'ionisation et de la lipophilie d'une série de photosensibilisateurs, des *méso*-tétraphénylporphyrines (TPP) glycoconjuguées, ii) une évaluation de l'impact de ces deux propriétés sur la distribution plasmatique et la localisation subcellulaire du photosensibilisateur.

La protonation des azotes tétrapyrroliques a été étudiée par spectroscopie électronique, combinée à une analyse chimométrique, tandis que la lipophilie a été évaluée par chromatographie liquide haute performance. L'impact de différents effets de substitution (position, nombre ou nature du substituant) sur ces deux propriétés physico-chimiques a été mis en évidence.

Dans le plasma, les TPP glycoconjuguées se lient principalement aux lipoprotéines de haute densité. La lipophilie de ces dérivés permet d'expliquer leur affinité pour les lipoprotéines, mais pas pour l'albumine. L'étude de localisation subcellulaire, combinant approche expérimentale et modélisation, a conduit à proposer une hypothèse expliquant la localisation de la TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃ au niveau du réticulum endoplasmique, hypothèse accordant un rôle central à la lipophilie de la TPP.

A l'issue de ce travail, avant d'appliquer nos hypothèses à la synthèse de nouvelles molécules, il apparaît nécessaire de mieux explorer l'impact de la distribution plasmatique et de la localisation subcellulaire sur l'efficacité PDT.

Photothérapie Dynamique ; méso-tétraphénylporphyrine ; ionisation ; lipophilie ; distribution plasmatique ; localisation subcellulaire ; chimométrie ; modélisation

Physicochemistry of glycoconjugated *meso*-tetraphenylporphyrins in Photodynamic Therapy: towards a better understanding of plasma distribution and of subcellular localization ?

Photodynamic Therapy (PDT) is based on the destruction of a tumor tissue through a combination of administration of a photosensitizer and exposure to visible light. This work includes : i) a study of ionization and hydrophobicity of a series of candidate sensitizers, glycoconjugated *meso*-tetraphenylporphyrins (TPP), ii) an evaluation of the impact of those two physico-chemical properties on sensitizer's plasma distribution and subcellular localization.

Protonation of tetrapyrrolic nitrogens has been studied by electronic spectroscopy combined with chemometric analysis whereas hydrophobicity has been evaluated by high-performance liquid chromatography. The effect of substitution modalities (position, number and nature of pendant groups) on both physico-chemical properties has been evidenced.

In human plasma, glycoconjugated TPPs mainly bind to high density lipoproteins. Hydrophobicity accounts for differences in affinities towards lipoproteins, but not towards albumin. Subcellular localization studies, combining computational and experimental approaches, led to formulate some assumptions explaining localization of TPP(*p*ODEGO α ManOH)₃ in endoplasmic reticulum, assumptions centered on a major role of sensitizer's hydrophobicity.

At the end of this work, before trying to use our conclusions for the design of new sensitizers, it remains necessary to better explore the effect of plasma distribution and subcellular localization on sensitizer's photo-efficiency.

Photodynamic therapy; *meso*-tetraphenylporphyrin; ionization; hydrophobicity; plasma distribution; subcellular localization; chemometrics; modelling

Groupe de Chimie Analytique de PARIS-SUD EA 4041
Faculté de Pharmacie de Châtenay-Malabry, Université Paris-Sud XI
5, rue Jean-Baptiste Clément, 92296 Châtenay-Malabry
