

N° d'ordre : 678

50376  
1986  
121

50376  
1986  
121

# THÈSE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE FLANDRES ARTOIS

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES**

par

Jean MARKO

Maître-Assistant

## **ETUDE PAR POLARISATION NUCLEAIRE INDUITE PHOTOCHIMIQUEMENT (PHOTO-CIDNP) DE COMPOSES PHOTSENSIBILISANTS A ACTIVITE THERAPEUTIQUE : PHENOTHIAZINES ET FUROCUMARINES.**



Soutenu le 15 Mai 1986 devant la Commission d'Examen

Mme	N.	FEBVAY-GAROT	Président
MM.	R.V.	BENSASSON	Rapporteur
	A.	LABLACHE-COMBIER	Rapporteur
	J.	PIETTE	Rapporteur
	G.	VERMEERSCH	Rapporteur
	B.	ANCIAN	Examineur
	E.	BISAGNI	Examineur

*A Dominique et Amélie,*

*A ma Mère,  
A la mémoire de mon Père.*

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Physique de la Faculté de Pharmacie de Lille sous la direction de **Madame le Professeur N. FEBVAY-GAROT**.

Je tiens à lui exprimer toute ma gratitude pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'y avoir confié des fonctions d'enseignement. Qu'elle soit remerciée de son extrême bienveillance et de l'intérêt constant et de la confiance qu'elle a manifestés tout au long de ce travail.

**Monsieur le Professeur A. LABLACHE-COMBIER** est à l'origine de ma formation de chercheur. Je voudrais lui témoigner ma profonde reconnaissance pour sa disponibilité scientifique et ses précieux conseils ainsi que pour les encouragements qu'il n'a cessé de me prodiguer tout au long de ce travail.

**Monsieur G. VERMEERSCH**, Maître de Conférences, a développé la photo-CIDNP dans le laboratoire. Son dynamisme et son expérience ont contribué à la réalisation de ce travail. Je le remercie très sincèrement pour son aide précieuse tant par les discussions scientifiques que nous avons eues ensemble que pour l'ambiance amicale qu'il a toujours su créer.

J'adresse également mes plus vifs remerciements à ceux qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir juger ce travail :

- **Monsieur R.V. BENSASSON**, Directeur de Recherche au Muséum National d'Histoire Naturelle, qui a toujours manifesté son intérêt pour les résultats concernant les furocoumarines.

- **Monsieur E. BISAGNI**, Directeur de Recherche à l'Institut Curie d'Orsay, sans lequel l'étude sur les

furocoumarines n'aurait pu être aussi large. Qu'il soit remercié pour la générosité avec laquelle il m'a fourni des échantillons de dérivés synthétisés dans son laboratoire.

- **Monsieur J. PIETTE**, Docteur ès Sciences, Chercheur Qualifié C.N.R.S. à l'Université de Liège.

- **Monsieur B. ANCIAN**, Professeur à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Lille.

J'associerai à ces remerciements **Monsieur R. ROYER**, Directeur de Recherche à l'Institut Curie de Paris, qui a mis gracieusement à ma disposition ses composés afin de les tester par notre méthode et pour lesquels les résultats ont été reportés dans l'appendice.

Je tiens également à remercier mes camarades des Laboratoires de Physique Pharmaceutique (Université de Lille II) et de Chimie Organique Physique (Université de Lille I) grâce auxquels j'ai toujours pu travailler dans une ambiance agréable.

Je remercie enfin **Mademoiselle V. DESENCLOS** pour son aimable collaboration technique et la mise en forme des tableaux et figures, **Madame M. SENA** pour avoir dactylographié ce mémoire avec beaucoup de gentillesse et **Madame L. SAINLEGER** qui en a assuré l'impression.

--0000000--

**SOMMAIRE**

--0000000--

Introduction

**Chapitre I : LA POLARISATION MAGNETIQUE INDUITE CHIMIQUEMENT**  
**(CIDNP)**

	1
I - Introduction	1
II - Le mécanisme par paire radicalaire	3
1. Le spectre de CIDNP	3
2. Le mécanisme par paire radicalaire (RPM)	3
3. Les règles de Kaptein	8
4. Mélange de l'effet net et de l'effet de multiplet	10
5. Réarrangement des radicaux : effet de mémoire et effet coopératif.	11
6. Phénomènes de relaxation	11
7. Le cas des biradicaux	12
8. Limitation des règles de Kaptein	13
9. Techniques par impulsions appliquées à la CIDNP	15
III - La CIDNP à champ faible	17
IV - Le mécanisme triplet Overhauser (TM)	17
V - Conclusion	18
<i>Références bibliographiques</i>	20

**Chapitre II : LA PHOTSENSIBILISATION**

Introduction	21
A - LE PHENOMENE DE PHOTSENSIBILISATION	22
I - Les radiations solaires	22
II - La photosensibilisation	23
III - Les mécanismes de photosensibilisation	23

1. Le mécanisme de type I	25
2. Le mécanisme de type II	25
IV - Les sensibilisateurs photodynamiques	26
V - Photoallergie et phototoxicité	26
VI - Conclusion et perspectives	28
B - UTILISATION DE LA CIDNP DANS LE DOMAINE DES MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE ET DE LA PHOTOSENSIBILISATION.	29
I - Photo-CIDNP des amino-acides et des protéines	30
1. Attribution des signaux RMN de résidus aromatiques des protéines.	32
2. Etude de la conformation des protéines en solution.	32
3. Etude de l'interaction protéines-ligands	33
4. Conclusion	35
II - Photo-CIDNP des nucléobases.	36
III - Aspect expérimental	37
1. Matériel et technique	37
2. Photo-CIDNP résolue dans le temps	38
IV - Conclusion	39
<i>Références bibliographiques</i>	41
<b><u>Chapitre III</u> : LES PHENOTHIAZINES</b>	45
A - PRINCIPAUX RESULTATS EN PHOTOCHEMIE	46
I - La chlorpromazine	46
1. Solutions aqueuses	46
2. Solutions non aqueuses	47
II - Implications biologiques	48
B - PHOTO-CIDNP $^1\text{H}$ ET $^{13}\text{C}$ DE QUELQUES PHENOTHIAZINES	49
I - La chlorpromazine	50

1. Résultats	50
2. Attribution des signaux	52
II - Les autres phénothiazines	55
III - Interprétation des résultats obtenus	57
1. Formation du dérivé de substitution (I)	57
2. Formation du dérivé aldéhydique (III)	59
3. Les autres phénothiazines	61
IV - Conclusion	61
 C - ETUDE PAR PHOTO-CIDNP DE L'INTERACTION ENTRE DIF- FERENTES PHENOTHIAZINES ET LES NUCLEOBASES	 62
I - Résultats	63
1. Réaction de CPZ en présence de purines et pyrimidines	63
2. Les autres phénothiazines	64
II - Discussion	64
III - Etude comparée de différentes phénothiazines : corrélation entre effets de CIDNP et phototoxicité.	69
1. Analyse des résultats.	69
2. Corrélation avec les indices de phototoxicité.	70
IV - Conclusion	71
 <i>Références bibliographiques</i>	 73
 <b><u>Chapitre IV</u> : LES FUROCOUMARINES</b>	 77
I - Introduction	77
II - La photochimie des furocoumarines	78
1. Différents types de furocoumarines	79
2. Les états excités des furocoumarines	79
3. Les photoréactions des furocoumarines	80
a) Les photoproduits	80
b) L'oxygène singulet	81
c) Les bases des acides nucléiques et l'ADN -	81
d) Les amino-acides et les protéines	82

4. Conclusion	82
III - Etude comparée de l'activité photochimique de différentes furocoumarines par CIDNP	84
1. Le choix du solvant	84
2. Les conditions expérimentales	84
3. Résultats	86
a) Psoralènes seuls	86
b) Psoralènes en présence d'acides aminés.	89
4. Discussion	91
a) Psoralènes seuls	92
b) Psoralènes en présence d'acides aminés.	97
c) Comparaison entre les différentes furocoumarines	103
<i>Références bibliographiques</i>	108
<b>Chapitre V : PARTIE EXPERIMENTALE</b>	112
I - Enregistrement des spectres de photo-CIDNP	112
1. Le dispositif d'irradiation lumineuse	112
2. L'enregistrement des spectres.	113
a) $^1\text{H}$	113
b) $^{13}\text{C}$	113
II - Les phénothiazines	114
1. Origine	114
2. Solvants	115
3. Bases des acides nucléiques et nucléotides	115
4. Préparation des bases libres des dérivés phénothiaziniques	115
5. Utilisation d'une solution de citrate disodique (SSC)	116
6. Comparaison des intensités des polarisations sur GpC	116
III - Les furocoumarines	117
1. Origine	117
2. Solvants	117
3. Les acides aminés.	117

4. Filtre optique	117
5. Comparaison des intensités des polarisations de la N-acétyrosiné	118

<i>Références bibliographiques</i>	119
------------------------------------	-----

Appendice

**CONCLUSION GENERALE**

--oooOooo--

--0000000--

## INTRODUCTION

--0000000--

Cette thèse est le résultat d'une collaboration entre les laboratoires de Physique de la faculté de Pharmacie de LILLE (Université de Lille II - Professeur N. FEBVAY-GAROT) et de Chimie Organique Physique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Lille I - Professeur A. LABLACHE-COMBIER). Elle illustre l'application de la technique de polarisation nucléaire dynamique induite chimiquement (C.I.D.N.P.) à l'étude du comportement photochimique de médicaments photosensibilisants et de leurs mécanismes de réaction. La CIDNP et les réactions photochimiques d'hétérocycles sont les principaux axes de recherche respectifs de ces deux laboratoires.

Elle a été essentiellement réalisée au laboratoire de Physique de la faculté de Pharmacie. Ceci explique que le choix des dérivés étudiés se soit orienté vers des molécules à activité thérapeutique possédant également des propriétés photosensibilisantes.

La photo-CIDNP permet :

- o la mise en évidence du caractère radicalaire de certaines réactions,
- o l'identification de nouveaux photoproduits,
- o l'étude du comportement du médicament seul et en présence de modèles des substrats biologiques qui constituent en général des cibles d'attaque privilégiées dans l'organisme, i.e. les amino-acides (protéines) et/ou les bases des acides nucléiques, (ARN, ADN),
- o l'établissement d'un mécanisme réactionnel.

L'intérêt de la photochimie des molécules médicamenteuses étudiées, réside dans leurs propriétés photosensibilisantes. Ces dernières peuvent se révéler néfastes (phototoxicité, photoallergie,

cancérogénèse, ...) et/ou bénéfiques (photochimiothérapie, où le traitement associe le médicament et la lumière UV-A). Les modes d'action de ces substances restent mal connus et les différents résultats publiés sont souvent controversés. Ceci est lié à la complexité de cette étude, reposant entre autre sur l'utilisation de modèles choisis *in vitro* constituant l'approche de phénomènes intervenant *in vivo*.

Notre travail est une contribution à la connaissance des processus primaires des photoréactions de deux séries de composés : les tranquillisants à structure phénothiazinique d'une part (dont la chlorpromazine en particulier) et les dérivés furocoumariniques d'autre part (psoralènes et analogues). C'est l'apport "classique" de la photo-CIDNP dont on peut extraire les différents renseignements présentés ci-dessus.

Mais il révèle également un second aspect plus original de cette technique. Nous avons ainsi constaté une bonne corrélation entre la photoactivité et/ou la phototoxicité des médicaments dans une série, et les intensités des effets de CIDNP qu'ils induisaient sur des substrats biologiques. Nous suggérons ainsi que la photo-CIDNP peut constituer un test simple et rapide d'évaluation de l'indice de phototoxicité d'une substance, tout-à-fait comparable à d'autres méthodes généralement utilisées *in vitro* et souvent plus délicates à mettre en oeuvre.

Cette thèse débute par un rappel des bases théoriques du phénomène de CIDNP qui développe les aspects essentiels de la théorie de la paire radicalaire (RPM), nécessaires à la compréhension des résultats exposés (chapitre I). Elle aborde ensuite les différents mécanismes et conséquences du phénomène de photosensibilisation (chapitre II, 1ère partie). Suit une revue des applications de la photo-CIDNP à l'étude des molécules d'intérêt biologique et les développements récents de la technique, telle que la CIDNP résolue dans le temps par exemple (chapitre II, 2ème partie). Elle expose alors l'ensemble des résultats que nous avons obtenus avec les phénothiazines (chapitre III) puis les furocoumarines (chapitre IV). Ces deux chapitres font d'abord brièvement le point sur les connaissances actuelles dans le domaine photochimique

pour chaque famille de dérivés. Nos résultats sont ensuite présentés en abordant successivement les différents points mentionnés au début de cette présentation.

--0000000--

## CHAPITRE I

--0000000--

# LA POLARISATION MAGNETIQUE INDUITE CHIMIQUEMENT

(C.I.M.P.)\*

--=00000000--

## I - INTRODUCTION

L'intérêt croissant manifesté ces dernières années dans le domaine de la chimie des radicaux libres peut être attribué en partie au développement des techniques de résonance magnétique (RPE, résonance paramagnétique électronique et RMN, résonance magnétique nucléaire) et aux phénomènes correspondants de polarisation magnétique induite chimiquement (CIDEP et CIDNP\*). Ceux-ci permettent d'obtenir des renseignements sur les espèces radicalaires formées transitoirement au cours des réactions. La CIDEP identifie ainsi les propriétés magnétiques de radicaux qui ne participent pas forcément à la formation des produits, alors que la CIDNP permet d'observer les spectres RMN "polarisés" des produits ou même des réactifs qui sont formés par voie radicalaire. Il est ainsi, en particulier, possible de mettre en évidence la réaction au cours de laquelle les réactifs sont régénérés à partir des radicaux auxquels ils ont pu donner naissance. La CIDNP est souvent la seule méthode permettant de le faire. De même, elle s'avère être un outil précieux pour suivre la différence de réactivité d'une paire radicalaire suivant son état de spin nucléaire (singulet ou triplet).

\* Nous n'utiliserons dans ce mémoire que les abbréviations correspondant à la signification anglaise des termes utilisés, à cause de leur usage plus répandu dans la littérature ; i.e. CIMP (Chemically Induced Magnetic Polarisation) CIDEP (Chem. Ind. Dynamic Electronic Pol.) CIDNP (Chem. Ind. Dyn. Nuclear Pol.) RPM (Radical Pair Mechanism) TM (Triplet Mechanism) NOE (Nuclear Overhauser Effect).

Pratiquement, les phénomènes de CIMP se manifestent par des polarisations inhabituelles par rapport aux spectres classiques de RPE ou de RMN. Certaines raies peuvent être inversées, d'autres exaltées. FESSENDEN et SCHULER<sup>1</sup> découvrirent ainsi le phénomène de CIDEP en 1963 en irradiant une solution de méthane liquide et en obtenant un spectre RPE "anormal" des atomes d'hydrogène formés. L'effet de CIDNP, quant à lui, ne fut observé que quatre ans plus tard, indépendamment par BARGON, FISCHER et JOHNSON<sup>2</sup>, d'une part, et par WARD et LAWLER<sup>3</sup>, d'autre part. L'utilisation plus répandue de la spectrométrie RMN en chimie, explique que très rapidement l'effet de CIDNP fit l'objet de davantage de considérations théoriques et expérimentales que l'effet de CIDEP, dont le mécanisme resta pourtant très longtemps controversé. Il fallut quand même attendre 1969 pour qu'une théorie, basée sur le modèle de la paire radicalaire (RPM) fut élaborée d'une part par CLOSS<sup>4</sup> et d'autre part par KAPTEIN et OOSTERHOFF<sup>5</sup>. Elle permet à présent d'expliquer la plupart des phénomènes de CIDNP. Cependant, il est apparu que pour certaines polarisations de forte intensité, le RPM s'avérait ne pas être le mécanisme exclusif<sup>6</sup>. C'est alors que fut développé le mécanisme triplet (TM). Paradoxalement, ce modèle avait été le premier invoqué à la découverte de la CIMP<sup>7</sup> et sa similitude avec la polarisation dynamique (effet OVERHAUSER) est à l'origine des noms de CIDEP et CIDNP. Ne pouvant tout expliquer (existence de l'effet de multiplet par exemple) il avait été abandonné dans un premier temps. Il est maintenant établi que RPM et TM coexistent dans les réactions de CIMP, mais il se trouve qu'ordinairement le TM est moins efficace, et, qu'en dehors de conditions particulières, ses effets sont le plus souvent cachés.

Ces aspects théoriques ayant été déjà clairement exposés dans le cadre de thèses soutenues dans notre laboratoire<sup>8</sup>, nous nous contenterons ici de donner un résumé du modèle de la paire radicalaire (RPM) essentiel à la compréhension du phénomène de CIDNP et des résultats que nous exposerons aux chapitres III et IV. Nous évoquerons également des aspects tout-à-fait récents du problème. Le lecteur qui désirerait une approche fondamentale plus détaillée pourra par exemple consulter la référence 9.

## II - LE MECANISME PAR PAIRE RADICALAIRE (RPM)

### 1 - Le spectre de CIDNP

L'enregistrement de spectres RMN au cours de réactions radicalaires (thermiques ou photochimiques) fait souvent apparaître des signaux présentant des intensités inhabituelles et provenant de produits nouvellement formés et des produits de départ. De plus, ces intensités varient au cours du temps, traduisant le retour du système vers l'état d'équilibre thermodynamique. C'est ce qu'on appelle le phénomène de CIDNP.

La figure 1 représente les différents effets que l'on peut observer dans le cas d'un quadruplet du premier ordre :

- l'effet net : toutes les raies du multiplet sont soit en absorption exaltée (A), soit en émission (E),
- l'effet de multiplet : certaines raies du multiplet sont en absorption exaltée, tandis que d'autres sont en émission. L'effet est noté A/E ou E/A suivant que les raies du multiplet en absorption sont respectivement situées à champ faible ou à champ fort.
- différents mélanges de ces deux effets (Ex : E+E/A ou A+A/E).

### 2 - Le mécanisme par paire radicalaire (RPM)

La figure 2 représente le mécanisme des réactions radicalaires pouvant conduire à l'observation d'effets de CIDNP.

Le RPM est basé sur les faibles interactions existant dans une paire de radicaux entre les deux électrons non appariés. La formation de cette paire peut soit provenir d'un précurseur commun (1 ou 2 molécules) soit résulter de la rencontre aléatoire de 2 radicaux libres diffusant. Dans les réactions thermiques, le précurseur est habituellement une molécule diamagnétique (état singulet : S) tandis que dans les réactions photochimiques, le précurseur peut se trouver soit dans un état singulet, soit dans un état triplet (T). Ce précurseur peut se dissocier ou réagir avec un substrat, ce qui conduit dans les deux cas à la formation d'une paire radicalaire dite géminée (radicaux corrélés où les spins sont

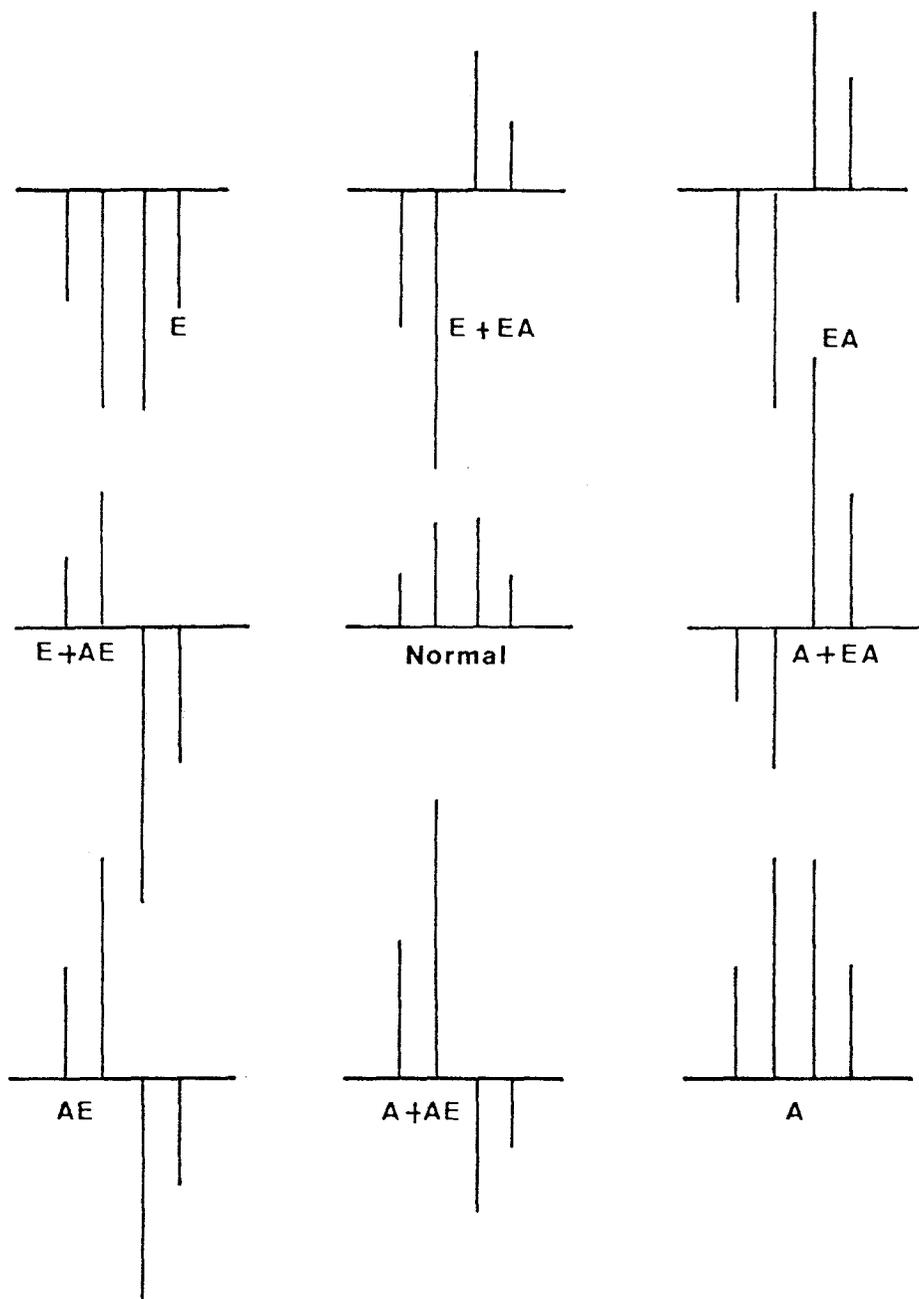


Figure 1

Exemples d'effets de CIDNP apparaissant sur un quartet du premier ordre : effet net (A ou E), effet de multiplet (EA ou AE) et mélange des deux.

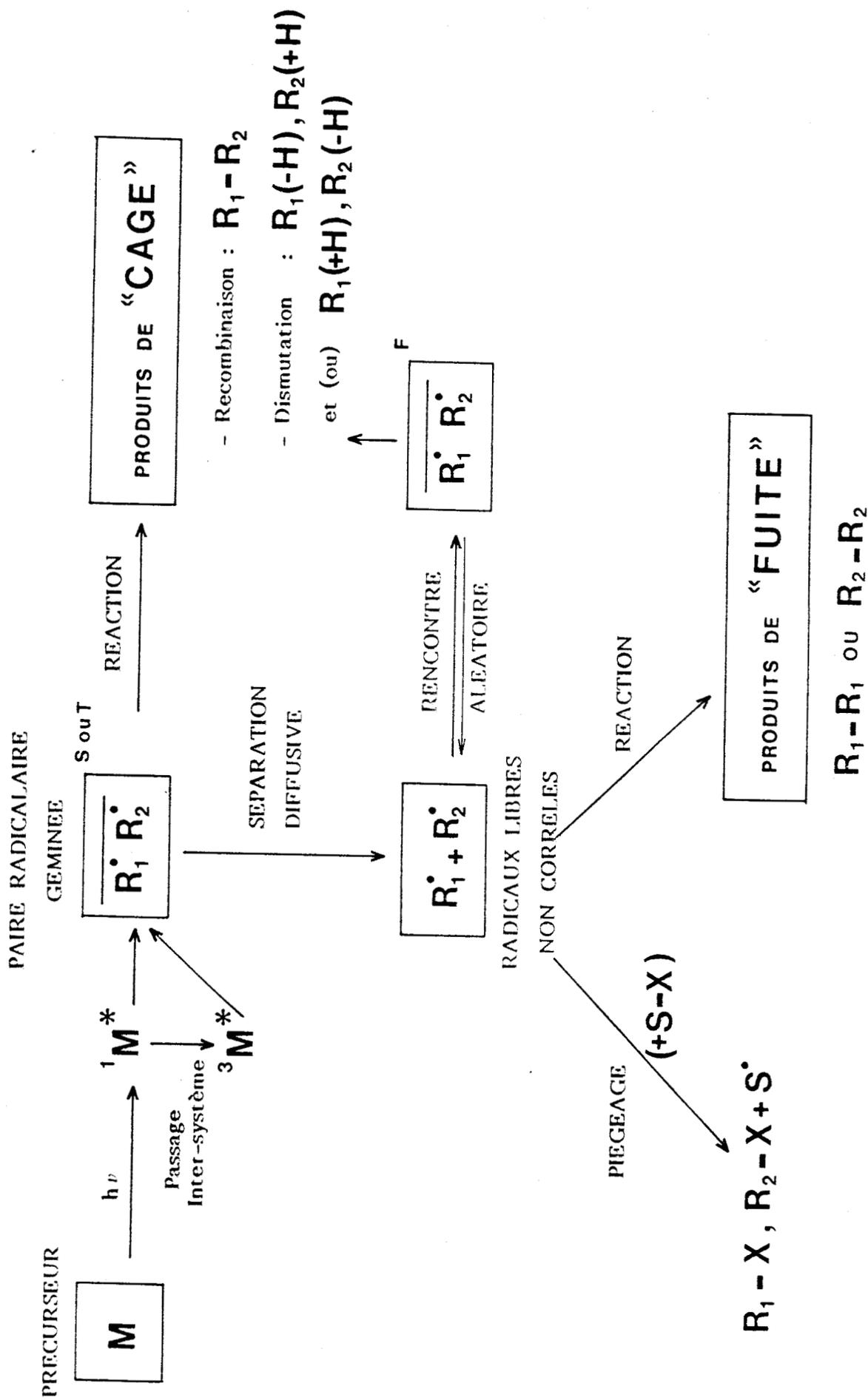


Figure 2

Le mécanisme des réactions radicalaires.



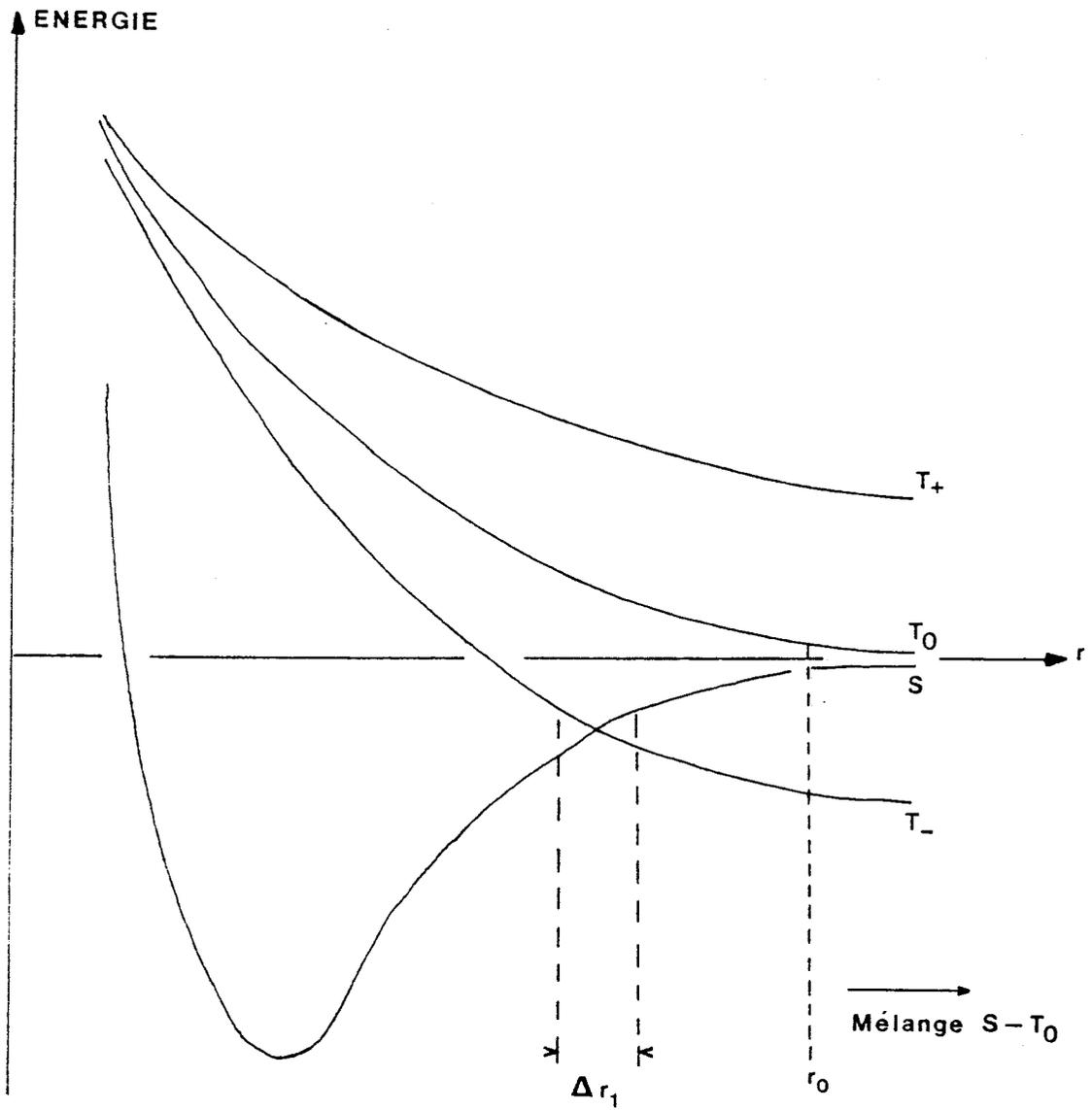
conservés). Cette paire sera ainsi soit dans un état singulet, soit dans un état triplet. Elle peut être le siège de différentes réactions dites "de cage" : retour aux produits de départ, formation de nouveaux produits par recombinaison ou dismutation. Les produits formés après que les radicaux aient diffusé hors de la cage, sont appelés produits "de fuite", et une paire radicalaire formée par la rencontre aléatoire de deux radicaux est appelée paire "au hasard" ou paire F.

Le RPM repose sur les interactions des électrons non appariés des radicaux avec, d'une part le champ magnétique externe (effet ZEEMAN) et d'autre part les noyaux magnétiques (interactions de structure hyperfine)(équation 4). Ces interactions dépendent également de l'intégrale d'échange entre les radicaux. Au sein de la paire radicalaire, les transitions entre les états singulet et triplet se font avec les probabilités des transitions dépendantes des spins nucléaires. Elles conduisent à l'observation de polarisations sur les produits obtenus à partir de la paire. Il est logique de penser que ces produits ne peuvent être formés qu'à partir d'une paire dans un état singulet (état liant) et si l'orientation relative des radicaux est favorable à la formation de liaisons. La figure 3 représente les énergies des états S et T d'une paire placée dans un champ magnétique en fonction de la distance de séparation des radicaux. La dégénérescence de l'état triplet est levée par l'effet ZEEMAN (éq. 1). L'écart énergétique entre les états T et S est donné par l'intégrale d'échange J, ordinairement négative (éq. 2).

$$E_{T_+} - E_{T_0} = E_{T_0} - E_{T_-} = \frac{1}{2} (g_1 + g_2) H_0 \quad (1)$$

$$E_S - E_T = 2J \quad (2)$$

Dans la région  $\Delta r_1$  (fig. 3) les courbes S et  $T_-$  se coupent. Mais aux champs magnétiques élevés (supérieurs à quelques milliers de Gauss) cette zone est traversée trop rapidement pour que le mélange (transition)  $ST_-$  puisse avoir lieu. Néanmoins, il peut se produire dans des cas bien particuliers : pour les biradicaux ou aux champs magnétiques faibles (voir plus loin). Il n'y a pas non plus de transitions  $ST_+$  à cause de la grande différence d'énergie entre ces 2 états ainsi que de la durée de vie insuffisante de la paire radicalaire. A champ fort, seul intervient donc le mélange S- $T_0$  à partir d'une distance de séparation égale à  $r_0$ , région



**Figure 3**  
 Energies des états S et T d'une paire radicalaire  
 placée dans un champ magnétique  
 en fonction de la distance de séparation  $r$  des radicaux.

dans laquelle les deux états sont pratiquement dégénérés.

Afin d'expliquer les effets de CIDNP observés sur certains produits de cage, les premières théories du RPM<sup>4,5</sup> supposaient que la paire radicalaire devait avoir une durée de vie supérieure à  $10^{-10}$  s au sein de la cage de solvant. Ce temps dépasse les temps de corrélation des mouvements browniens dans les liquides ( $10^{-12}$  à  $10^{-11}$  s). En conséquence, un modèle plus réaliste fut élaboré par ADRIAN<sup>10</sup> et KAPTEIN<sup>11</sup>. Ce modèle, dit "de diffusion", suppose que les radicaux diffusent librement hors de la paire dans la solution et que leur probabilité de se rencontrer à nouveau est élevée. Le temps moyen entre la séparation et le retour est bien supérieur à  $10^{-11}$  s, ce qui permet cette fois au mélange S-To d'avoir lieu pendant cette phase diffusive. Le concept de réaction "de cage" dans ce modèle se trouve donc élargi et a été clairement défini dans les travaux de NOYES<sup>12</sup>. NOYES fait en effet la distinction entre les recombinaisons primaires (où les deux radicaux voisins réagissent avant de sortir de la cage du solvant) et les recombinaisons secondaires (où ces deux mêmes radicaux réagissent au cours d'une nouvelle rencontre après diffusion)(fig. 4). Ces deux processus sont souvent confondus sous le terme de réaction "de cage"<sup>13</sup>. Cependant, en CIDNP la distinction est fondamentale. En effet, la recombinaison primaire se fait sur une échelle de temps trop petite ( $10^{-11}$  s) qui ne permet pas le mélange S-To. Ainsi, dans le cas d'un précurseur S, la majorité du produit "de cage" se forme lors de la recombinaison primaire et seule une petite fraction, lors de la recombinaison secondaire. Or cette dernière dispose d'un temps suffisant pour permettre le mélange S-To et conduire ainsi à des espèces polarisées. Donc, la polarisation observée dans le cas de la formation d'un produit de cage à partir d'un précurseur singulet ne reflète qu'une faible fraction de ce processus. Ce problème est moindre si le précurseur est dans un état triplet, car dans ce cas, il n'existe pas (ou très peu) de recombinaison primaire.

Le modèle de diffusion peut être décrit par une équation de SCHRÖDINGER dépendante du temps, pour une paire radicalaire dissociée au temps  $t=0$ .

$$[- J(2S_1 \cdot S_2 + 1/2) + H^M] \psi(t) = i \frac{\delta \psi(t)}{\delta t} \quad (3)$$

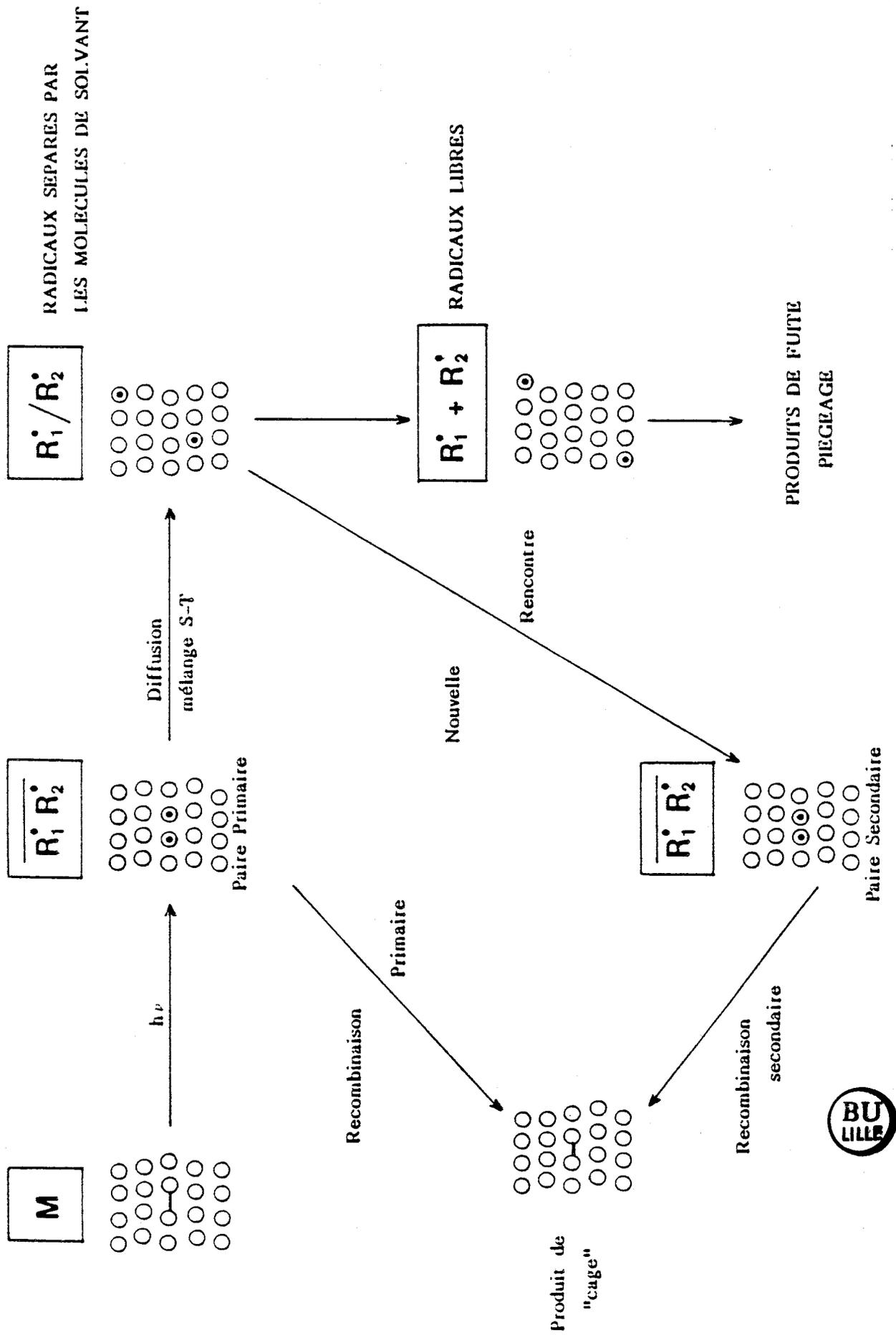


Figure 4

Repr\u00e9sentation sch\u00e9matique de l'effet de "cage" dans une solution homog\u00e8ne. L'effet total est la somme des recombinaisons primaires et secondaires (et tertiaires, etc ...)

où  $S_1$  et  $S_2$  sont les spins électroniques et  $J$  l'intégrale d'échange précédemment définie (éq. 2). L'hamiltonien magnétique total  $H^M$  est donné par :

$$H^M = \mu_B (g_1 \overline{S_1} + g_2 \overline{S_2}) B_0 + \sum_n A_{1n} I_{1n} \overline{S_1} + \sum_m A_{2m} I_{2m} \overline{S_2} \quad (4)$$

où  $\mu_B$  est le magnéton de Bohr et  $g_1$  et  $g_2$  les facteurs de Landé des radicaux, mesurables par R.P.E. Dans l'équation 4, le premier terme traduit l'effet ZEEMAN dans un champ magnétique  $B_0$  et les termes suivants sont les sommes des interactions électroniques (S) et nucléaires (I) dans les radicaux 1 et 2 respectivement.  $A_n$  et  $I_n$  sont les constantes de couplage hyperfin (A) et les spins nucléaires (I) du  $n^{\text{ième}}$  noyau. On néglige les interactions anisotropiques et on ne tient compte que des composantes selon l'axe Oz de S et I dans le cas d'un champ fort.

Si on admet que  $J$  est indépendante du temps, une solution simple de l'équation 3 est donnée par :

$$\Psi(t) = [C_{S,ab}(t) |S\rangle + C_{T,ab}(t) |T_0\rangle] \Phi_{ab}^N \quad (5)$$

où  $|S\rangle = 2^{-\frac{1}{2}}(\alpha\beta - \beta\alpha)$  est la fonction d'onde électronique singulet et  $|T\rangle = 2^{-\frac{1}{2}}(\alpha\beta + \beta\alpha)$  est la fonction d'onde électronique triplet.

$\Phi_{ab}^N$  est une fonction de spin nucléaire indépendante du temps qui caractérise les états de spin nucléaire des radicaux 1 et 2 respectivement en tant que a et b.  $\alpha$  et  $\beta$  sont les deux états de spin électronique. Pour une paire radicalaire créée dans un état T :  $C_T(0) = 1$  et la probabilité pour la paire de se trouver dans un état S, au temps t (via un mélange S- $T_0$ ), pour un état de spin nucléaire ab, peut être obtenue en substituant l'équation 5 dans 3 :

$$P_S(t) = \left| C_{T,ab}^S(t) \right|^2 = \left( \frac{\omega_{ab}}{\omega} \right)^2 \sin^2 \omega t \quad (6)$$

De la même façon, pour une paire créée dans l'état S :

$${}^1P_S(t) = \left| c_{S,ab}^S(t) \right|^2 = 1 - \left( \frac{\omega_{ab}}{\omega} \right)^2 \sin^2 \omega t \quad (7)$$

$$\text{où } \omega = (\omega_{ab}^2 + J^2)^{1/2} \quad (8)$$

et où l'élément extra-diagonal  ${}_{ab}$  de la matrice du mélange S-To représente :

$$\omega_{ab} = \frac{1}{2}(\mu_B \cdot B_0 \cdot \Delta g) + \frac{1}{2} \left( \sum_n A_{1n} M_{1n}^a \right) - \frac{1}{2} \left( \sum_m A_{2m} M_{2m}^b \right) \quad (9)$$

avec  $\Delta g = g_1 - g_2$ ,  $\omega_{ab} = \omega_a - \omega_b$  (différence des vitesses de précession).  $M_{1n}^a$  est le nombre quantique magnétique du  $n^{\text{ième}}$  noyau du radical 1 dans l'état de spin nucléaire  $a$  et  $M_{2m}^b$  est le terme correspondant pour le radical 2. Aux distances où le mélange S-To a lieu, on a  $J \ll \omega_{ab}$  et par conséquent les équations 6 et 7 deviennent :

$${}^3P_S(t) = \sin^2 \omega t \text{ et } {}^1P_S(t) = 1 - \sin^2 \omega t \quad (10)$$

La figure 5 illustre la représentation vectorielle des états de spin singulet et triplet d'une paire radicalaire placée dans un champ magnétique, alors que la figure 6 donne un modèle vectoriel du mélange S-To.

La seconde partie du calcul concerne la probabilité pour deux radicaux issus d'une paire de se rencontrer à nouveau après diffusion au hasard dans la solution, ainsi que celle d'être dans un état de spin leur permettant de réagir chimiquement. Ce problème a été abordé à partir des différentes théories des déplacements dans les liquides<sup>10c,12a,c,-14,15,16</sup>. Elles donnent toutes des résultats sensiblement identiques et, en particulier, prédisent que la probabilité de réaction dépend de  $\omega_{ab}^{1/2}$ , i.e. de la racine carrée de la valeur du champ appliqué et de celle de la différence entre les facteurs  $g$  des radicaux. Les systèmes pour lesquels ces valeurs sont élevées conduiront donc aux effets les plus importants.

Les résultats théoriques montrent que l'effet observé dépend également de la racine carrée du temps moyen des déplacements survenant lors de la phase diffusive. Si on limite cette diffusion, l'effet

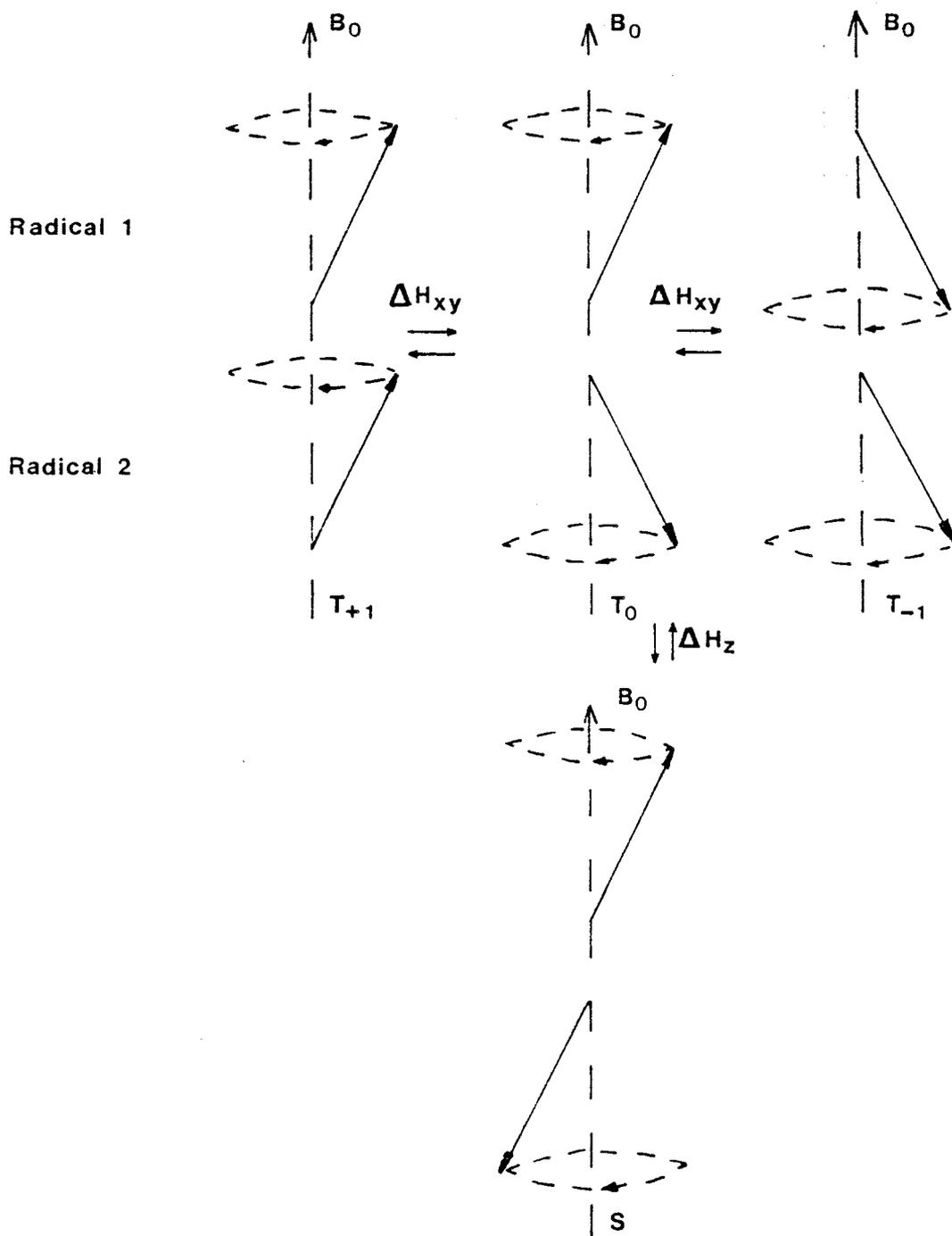


Figure 5

Représentation vectorielle des configurations de spin triplet et singlet d'une paire radicalaire placée dans un champ magnétique.

Les états S et  $T_0$  ne diffèrent que par la phase des spins dans le mouvement de précession.

L'échange S- $T_{+}$  nécessite quant à lui un basculement de spin.

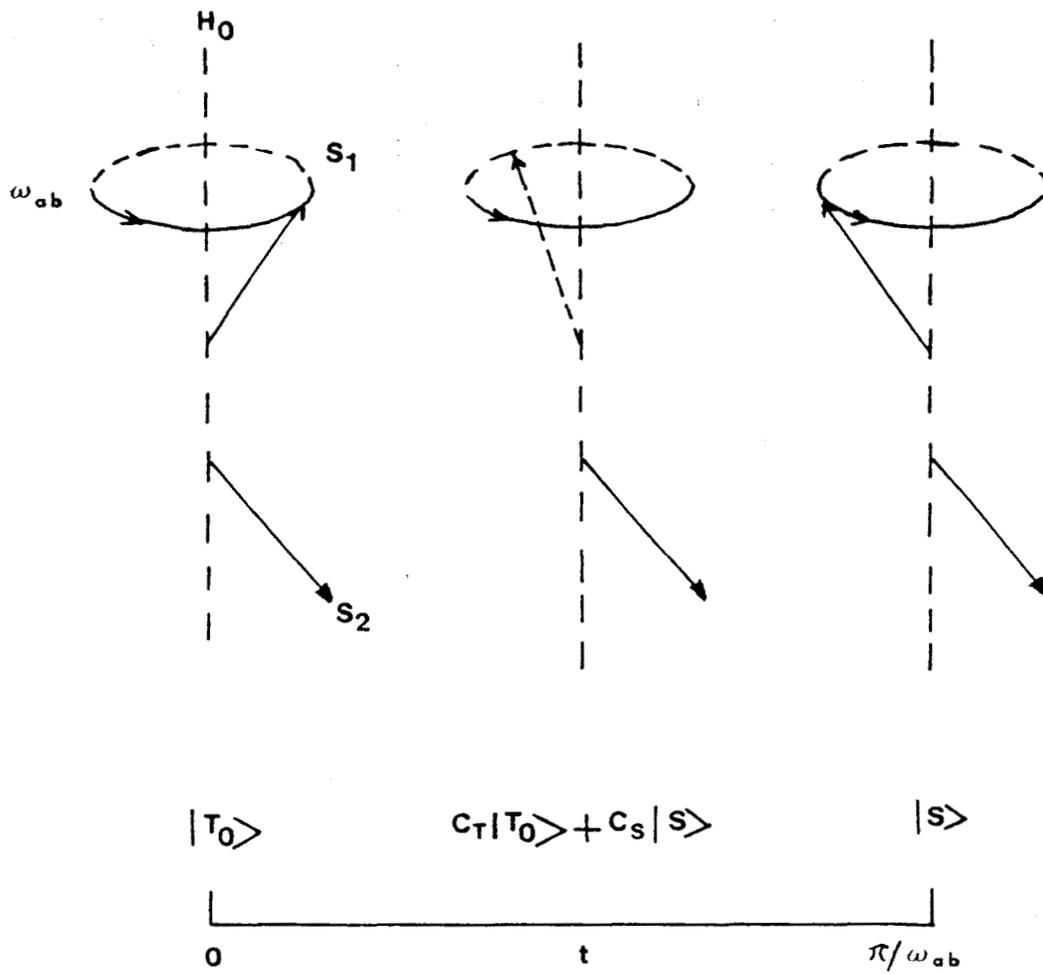


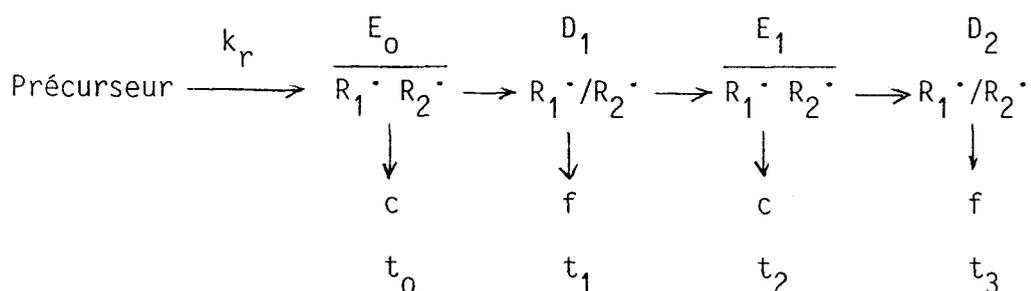
Figure 6

Modèle vectoriel du mélange S-To.

sera alors exalté. C'est ce qu'on devrait constater, par exemple, dans les solutions visqueuses et les micelles.

### 3 - Les règles de KAPTEIN

On peut regrouper l'ensemble des réactions nécessaires à l'observation du phénomène de CIDNP sur le schéma suivant :



$k_r$  est la constante de vitesse de formation de la paire radicalaire. La barre indique que les spins électroniques sont corrélés au sein de la paire. E désigne une paire de rencontre ou de re-rencontre, et D une paire dans le mode diffusif avec des molécules de solvant séparant (/) les deux radicaux. c et f correspondent respectivement aux produits de cage et de fuite (ou de piégeage).

Si l'on considère une paire géminée formée initialement dans un état T, celle-ci ne conduira à la formation de produits diamagnétiques que si elle acquiert un caractère S par le mélange S-To. Ce mélange dépendant des interactions de couplage hyperfin, il sera plus rapide pour certains états de spins nucléaires que pour d'autres. Ces états seront favorisés dans la formation de produits à partir de la paire.

Inversement, si au départ la paire se trouve dans un état S, ces mêmes états seront plus rapidement convertis en état non réactif To et seront par conséquent défavorisés dans la formation des produits. Une paire F se comportera qualitativement comme une paire T puisque plus le caractère T d'une paire est accentué, plus faible sera sa probabilité de réagir au cours d'une rencontre. Ces considérations permettent d'énoncer la première règle de la CIDNP : la polarisation due à une paire T ou F est de signe opposé à celle due à une paire S.

D'autre part, le mélange S-To ayant lieu à champ élevé, il ne

peut provoquer une polarisation de spin nucléaire absolue composée d'un excès de spins possédant tous la même orientation dans l'ensemble de la paire radicalaire et des produits de réactions. Ceci conduit à une "ségrégation" de spins où un excès de spins possédant une orientation donnée dans une partie du système sera exactement contrebalancé par un excès de spins possédant l'orientation opposée dans une autre partie du système. Selon la nature de cette ségrégation, on distinguera les effets nets ( $\Delta g \neq 0$ ) et les effets de multiplet ( $\Delta g=0$ ).

Enfin, si un produit de réaction P issu d'une paire radicalaire présente un effet net, alors les radicaux diffusant doivent avoir une polarisation égale et opposée à celle de P, laquelle polarisation peut être transmise aux produits de ces radicaux. Cette dernière est cependant souvent réduite par les phénomènes de relaxation dans les radicaux et compensée par la polarisation provenant de paires F dans le cas de produits de paires F concernant ce radical. Donc, par exemple, si tous les radicaux conduisant éventuellement à un même produit P (soit par une réaction géminée, soit au cours de rencontres de paires F), alors P ne sera pas polarisé à moins que la durée de vie des radicaux libres soit suffisante pour qu'une partie de la polarisation soit perdue par la relaxation dans les radicaux.

L'ensemble de ces considérations qualitatives sur la théorie de la paire radicalaire de l'effet de CIDNP à champ élevé a été résumé par KAPTEIN<sup>11,17</sup> en deux règles permettant de prévoir les signes des effets nets ( $\Gamma_n$ ) et de multiplet ( $\Gamma_m$ ).

$$\Gamma_n(i) = \mu \cdot \epsilon \cdot \Delta g \cdot A_i \quad \begin{array}{l} + : A \text{ (Absorption exaltée)} \\ - : E \text{ (Emission)} \end{array} \quad (11)$$

$$\Gamma_m(i,j) = \mu \cdot \epsilon \cdot A_i \cdot A_j \cdot J_{ij} \cdot \sigma_{ij} \quad \begin{array}{l} + : E/A \\ - : A/E \end{array} \quad (12)$$

Les différents paramètres ainsi que leurs signes sont définis de la manière suivante :

- $\mu$  + si précurseur T ou paire F
- si précurseur S

- $\epsilon$  + si produit de recombinaison
- $\epsilon$  - si produit de fuite
  
- $\sigma_{i,j}$  + si les noyaux  $i$  et  $j$  sont situés sur le même radical
- $\sigma_{i,j}$  - si les noyaux  $i$  et  $j$  sont situés sur des radicaux différents

$\Delta g = g_1 - g_2$  où  $g_1$  est le facteur de LANDE du radical portant le noyau  $i$  considéré et  $A_i$  et  $A_j$  sont les valeurs algébriques des constantes de couplage hyperfin. Ces grandeurs sont obtenues à partir des spectres de RPE des radicaux considérés.  $J_{ij}$  est la valeur de la constante de couplage de spin nucléaire (qui détermine l'ordre des niveaux).

L'application de ces règles permet ainsi de préciser soit la multiplicité d'un précurseur, soit le type de produits obtenus, soit les signes des paramètres magnétiques. L'interprétation quantitative du phénomène reste cependant beaucoup plus délicate, le nombre de paramètres intervenant étant plus important. Nous le verrons dans les chapitres suivants et les références qui y sont citées.

#### 4 - Mélange de l'effet net et de l'effet de multiplet

Dans le cas de paires radicalaires où  $g_1 \neq g_2$  et de plusieurs noyaux magnétiques, il peut y avoir différentes combinaisons des effets nets et des effets de multiplet. Les spectres présentent alors de nombreuses particularités parmi lesquelles une forte dépendance vis-à-vis du champ magnétique, à cause du terme en  $1/2 \mu_B \cdot \Delta g$  de l'équation 9.

L'interprétation qualitative de ces spectres peut être réalisée en les considérant comme le résultat de la combinaison d'un effet net pur et d'un effet de multiplet pur, avec des coefficients de mélange ajustables<sup>18</sup>. D'autre part, le phénomène de relaxation sélective pourra dans certains cas atténuer ou même supprimer totalement la polarisation de certains noyaux due à l'effet de multiplet. C'est ce qui se passe, par exemple, lorsqu'on observe un système où sont couplés un groupe CH et un groupe CH<sub>2</sub>. Le temps de relaxation beaucoup plus court de CH<sub>2</sub> par rapport à CH (contribution de l'interaction dipôle-dipôle intramoléculaire) provoquera l'annulation de certains effets<sup>19</sup>.

## 5 - Réarrangement des radicaux : effet de mémoire et effet coopératif.

Durant le temps du mélange S-To ( $10^{-7}$  à  $10^{-9}$  s), un radical (ou les deux) de la paire peut être modifié et réarrangé en un nouveau radical. Cette réaction est trop rapide pour affecter les états des spins nucléaires ou électroniques de la paire. La nouvelle paire ainsi créée peut conduire à la formation de nouveaux produits. Ce phénomène, souvent appelé effet de substitution de paire<sup>20</sup>, comprend principalement l'effet de "mémoire"<sup>21</sup> et l'effet "coopératif"<sup>22</sup>.

L'effet de mémoire permet, par exemple, d'expliquer l'observation d'effets nets à partir de paires radicalaires symétriques ( $\Delta g=0$ ). On suppose alors que ces paires résultent du réarrangement de radicaux provenant d'une paire antécédente où l'effet  $\Delta g$  existe, et persiste lors de la réaction de la nouvelle paire symétrique. Dans certains cas, cependant, l'effet de mémoire ne permet pas d'expliquer toutes les polarisations. Il faut alors considérer plusieurs paires radicalaires et faire, non pas la somme des effets qu'elles entraînent, mais appliquer les règles de KAPTEIN en prenant la résultante de chacun des paramètres magnétiques des différentes paires concernées. Ceci constitue l'effet coopératif. Ces deux effets ont pu être parfaitement mis en évidence, en particulier au cours de réactions de décarboxylation de radicaux<sup>21,22b</sup>.

## 6 - Phénomènes de relaxation

La CIDNP étant un phénomène dynamique, il est inévitable que les phénomènes de relaxation modifient les populations des états de spin produites par le seul mécanisme par paire radicalaire, et donc vont perturber les effets de CIDNP normalement prévus par le RPM. Parmi ces phénomènes, on peut relever :

- La relaxation transverse des spins nucléaires qui provoque le transfert d'une partie de la polarisation d'un ensemble de noyaux vers un autre, initialement non polarisé (voir Chap. II),

- La relaxation sélective des spins nucléaires (voir §4),
- Les temps de relaxation des spins nucléaires dans les radicaux qui influencent les polarisations dues aux produits formés à partir des radicaux diffusant hors de la paire principale. Ces produits seront formés à partir de réactions de dismutation, de fragmentation ou de transfert de charge. Ce problème devient particulièrement important quand tous les radicaux conduisent au même produit, et se présente au cours de réactions cycliques (voir Chap. II).
- Enfin, le cas, moins courant mais néanmoins important, de la relaxation des spins électroniques. Celle-ci peut interférer avec le mélange S-To. La relaxation transverse ( $T_2$ ) provoque un rephasage des spins (comme le mélange S-To) alors que la relaxation longitudinale ( $T_1$ ) provoque un basculement des spins (et va interagir surtout avec le mélange S-T<sub>+</sub>). Ces effets sont souvent beaucoup plus lents que les effets dus au champ magnétique. Ils expliquent cependant la raison pour laquelle les atomes d'halogènes, les radicaux hydroxyles ( $\cdot\text{OH}$ ) et probablement également les radicaux alcoxy ( $\text{RO}\cdot$ ) ne peuvent être invoqués dans des processus de paires radicalaires conduisant à des effets de CIDNP. Ces espèces possèdent des temps de relaxation excessivement courts. De même, les effets de CIDNP pourront être masqués dans le cas de radicaux très volumineux ou dans un solvant de viscosité élevée (diminution de  $T_2$ ).

Actuellement, grâce aux sources de lumière pulsées et aux spectromètres RMN à transformée de FOURIER, il est possible d'observer les polarisations de CIDNP avant que la relaxation puisse avoir lieu dans les produits diamagnétiques. C'est la technique de CIDNP résolue dans le temps qui commence à être utilisée de façon croissante (voir Chap. II).

## 7 - Le cas des biradicaux

Un biradical peut être considéré comme une paire radicalaire intramoléculaire. Le RPM peut provoquer des polarisations de spin

nucléaire dans ce cas. Cependant il faut remarquer que dans un biradical, la mobilité des radicaux est soit inexistante, soit considérablement limitée par comparaison avec une paire de radicaux séparés. En conséquence, l'intégrale d'échange n'est plus nulle et le mélange  $ST_+$  ne peut plus être négligé. On montre ainsi que c'est le mélange  $ST_-$  qui provoque en majorité les polarisations observées sur les biradicaux, la valeur de l'intégrale d'échange étant généralement négative. Le signe de la constante de couplage hyperfin n'intervient plus dans le signe de la polarisation observée. Le spectre est alors soit totalement en émission (pour les biradicaux triplet), soit totalement en absorption exaltée (pour les biradicaux singulet).

Les réactions de ce type les plus étudiées sont les photolyses de cétones cycliques. Les effets de CIDNP dépendent alors fortement de la valeur du champ magnétique  $B_0$  et de la longueur des chaînes du biradical<sup>23</sup>. La référence 24 constitue une approche théorique du problème.

Néanmoins, certaines réactions faisant intervenir des biradicaux peuvent également donner lieu au mélange S-To, donc à des spectres de CIDNP classiques (combinant émission et absorption exaltée). La réactivité de l'état triplet, supposant l'intervention du couplage spin-orbite, est alors suggérée pour expliquer ce phénomène, observé particulièrement pour les biradicaux à chaîne courte.

## 8 - Limitation des règles de KAPTEIN

Bien que l'application des règles de KAPTEIN ait permis d'interpréter qualitativement la plus grande partie des spectres de CIDNP observés, il convient d'être attentif dans certains cas particuliers où les prévisions qu'elles établissent se sont avérées inexactes. CLOSS<sup>25</sup> a ainsi montré que certaines réactions pouvaient avoir lieu au sein de la paire radicalaire à partir de l'état triplet, au lieu de l'habituel état singulet comme le RPM en fait état. Dans ce cas, il propose l'introduction d'un paramètre supplémentaire, appelé facteur "voie de sortie", dans les équations 11 et 12. Ce facteur, noté  $\nu$ , est positif et n'affecte pas les règles quand il s'agit d'une voie de sortie singulet et négatif lorsqu'elle est triplet. Différentes informations doivent être prises en compte pour

identifier ce facteur, telles que les cinétiques d'inhibition ou la connaissance des potentiels rédox et des énergies des états excités, par exemple<sup>26</sup>.

Ceci montre que la terminologie concernant les polarisations dites de "recombinaison" et de "fuite" manque de généralité bien que communément utilisée dans la littérature traitant de CIDNP. ROTH<sup>27</sup> fait ainsi la distinction entre trois types de mécanismes de "sélection" de spin opérant dans les paires radicalaires : (i) le plus courant, basé sur l'hypothèse que seules les paires singulet peuvent donner des produits de recombinaison tandis que les paires triplet ne peuvent que diffuser ; (ii) un second reposant sur une compétition entre recombinaison et réaction d'une paire secondaire formée par fragmentation de la paire principale. Les produits de cette seconde paire montrent alors des polarisations identiques à celles de produits de fuite de la première. Ce phénomène ressemble un peu aux effets de mémoire et coopératif précédemment décrits ; (iii) le troisième, impliquant un état triplet dont l'énergie est placée au-dessous ou juste au-dessus de l'énergie de la paire radicalaire; dans ce cas, il y a compétition entre recombinaison des paires singulet et triplet<sup>25,28</sup>. KAPTEIN<sup>24c</sup> propose même un quatrième type de mécanisme où l'état triplet de la paire (ou du biradical dans le cas étudié) est réactif.

Ces auteurs proposent, plutôt que de faire intervenir un paramètre supplémentaire dans les règles de KAPTEIN comme le suggère CLOSS, de changer la signification du paramètre  $\epsilon$  pour tenir compte de ces différents processus de sélection de spin. Au lieu de faire la distinction entre recombinaison et fuite,  $\epsilon$  caractérise la "voie de sortie" hors de la paire radicalaire (ou du biradical).  $\epsilon$  est positif pour une "sortie" singulet et négatif pour une "sortie" triplet. Cette interprétation a de plus l'avantage d'établir une symétrie entre  $\mu$  et  $\epsilon$ , chacun caractérisant l'état de spin électronique respectivement à l'"entrée" et à la "sortie" de la paire radicalaire.

D'autres déviations aux règles peuvent être dues à des réactions d'échange rapides, qui permettent le transfert de la polarisation d'un groupe de noyaux vers un autre initialement non polarisé parce que ne possédant pas de constante de couplage hyperfin<sup>29</sup>.

L'interprétation des spectres de CIDNP doit également tenir compte de la contribution de l'effet OVERHAUSER pur (NOE). Celle-ci

peut devenir importante lorsqu'intervient un mécanisme de relaxation dipolaire intramoléculaire comme dans les biradicaux par exemple<sup>30</sup>, ou lorsque la valeur de la constante de couplage spin-spin entre deux noyaux est voisine de la différence entre leurs déplacements chimiques<sup>31</sup>.

Les effets de CIDNP peuvent être perturbés par la présence de noyaux magnétiques possédant des constantes de couplage hyperfin suffisamment élevées (<sup>13</sup>C, <sup>31</sup>P, <sup>119</sup>Sn,...) par rapport à celles des autres noyaux présents ainsi qu'à la différence des facteurs g. Dans ce cas, les règles relatives à la prédiction des signes de l'effet net<sup>32</sup> et (ou) de l'effet de multiplet<sup>33</sup> peuvent être erronées.

Les perturbations peuvent également se manifester en fonction du champ appliqué, même lorsqu'on reste dans le domaine des hauts champs. Ainsi, KAPTEIN<sup>34</sup> a noté une inversion des polarisations dues à l'effet net, entre un spectre enregistré à 100 MHz et un autre à 360 MHz au cours de la photolyse de phényl-1[<sup>13</sup>C-2]propanone-2. Ces polarisations sont correctement prédites par les règles à 360 MHz, mais pas à 100 MHz. C'est le contraire pour les effets de multiplet <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C. Ce phénomène est lié à l'intensité des interactions magnétiques (valeur de a<sub>i</sub> et Δg) qui n'est pas prise en compte par les règles de signe, mais il est parfaitement interprété sur les bases du RPM.

Dans ces conditions, il semble souhaitable de faire dans ces différents cas des simulations quantitatives de spectres.

## 9 - Techniques par impulsions appliquées à la CIDNP\*

La CIDNP est un phénomène dynamique, dépendant du temps. Cette dépendance est liée aux réactions chimiques primaires et secondaires, à la relaxation nucléaire, ou à des perturbations dans des systèmes possédant des couplages spin-spin. Le principal désavantage des techniques de spectroscopie par onde continue est de refléter un équilibre dynamique entre la création de la polarisation nucléaire et sa destruction par ces différents processus. La spectroscopie par impulsions

\* Nous ne considérerons ici que la CIDNP avec une source lumineuse continue. L'utilisation de sources pulsées (laser par exemple) et leurs avantages seront abordés dans le chapitre suivant.

et transformation de FOURIER permet d'enregistrer un spectre en quelques secondes, donc de suivre son évolution en fonction du temps. L'étude de la variation de l'intensité des signaux polarisés conduit ainsi à des informations d'ordre cinétique sur la réaction suivie. Elle permet aussi l'étude d'autres noyaux moins sensibles pour la RMN ( $^{13}\text{C}$  principalement<sup>35</sup>, ou encore  $^{15}\text{N}$  ou  $^{31}\text{P}$ ) grâce aux possibilités d'accumulation de spectres qu'elle offre.

Néanmoins, il convient d'être prudent quant à l'utilisation de cette technique. Dans le cas d'addition de FID successifs par exemple, il faudra veiller à ce que l'intervalle de temps entre deux impulsions de radiofréquence soit suffisamment long, afin de tenir compte des temps de relaxation des espèces polarisées ou de permettre à certains systèmes d'atteindre l'état stationnaire de concentration de ces espèces.

Un autre facteur joue un rôle essentiel. Il s'agit de l'angle de flip  $\theta$ . Les intensités relatives des signaux pour des systèmes ne se trouvant pas dans leur état d'équilibre sont dans de très nombreux cas fortement influencés par la valeur de cet angle<sup>36</sup>. Pour de faibles valeurs ( $10^\circ < \theta < 20^\circ$ ) le système est peu perturbé et les données peuvent être traitées comme pour la spectroscopie en onde continue. Par contre, pour  $\theta = 90^\circ$ , on peut obtenir des intensités totalement différentes. Ceci est particulièrement vérifié dans le cas de systèmes présentant des couplages spin-spin homonucléaires ( $^1\text{H}$  ou  $^{19}\text{F}$ ). Si l'effet net n'est pas affecté par la valeur de l'angle de flip, l'effet de multiplet sera par contre partiellement masqué pour des angles supérieurs à  $26^\circ$  et sera même totalement supprimé à  $90^\circ$ <sup>36</sup>. D'où la nécessité d'utiliser dans ces conditions de faibles valeurs. Néanmoins, dans le cas où il existe une superposition des deux effets (net et multiplet) il peut alors être intéressant d'enregistrer le spectre pour  $\theta = 90^\circ$  afin de pouvoir confirmer la nature exacte de l'effet net quand celle-ci n'est pas évidente a priori. Ceci s'applique très bien à des systèmes faiblement couplés. Par contre, pour les systèmes fortement couplés, le phénomène est plus complexe et les intensités pour des valeurs de  $\theta$  élevées, perturbent non seulement les multiplets, mais l'ensemble du spectre.

Pour les systèmes ne présentant que des couplages hétéronucléaires (tant que ceux-ci restent faibles) le spectre est indépendant de  $\theta$ . Ceci est particulièrement intéressant dans le cas des spectres  $^{13}\text{C}$  ou  $^{15}\text{N}$  en abondance naturelle avec ou sans découplage du proton. Ceux-ci ne sont

pas modifiés par la valeur de  $\theta$  .

On pourra signaler pour terminer, la possibilité offerte, par les spectromètres RMN par transformée de FOURIER, de mettre en oeuvre des séquences impulsionnelles. Les techniques de soustraction et de présaturation par exemple (voir Chap. II) permettent ainsi d'obtenir des spectres desquels les signaux non affectés par la CIDNP sont éliminés et dont l'interprétation est ainsi facilitée.

### III - LA CIDNP A CHAMP FAIBLE

La CIDNP à bas champ (de 100 à 1000 G approximativement) pose un problème théorique beaucoup plus délicat à résoudre que la CIDNP à haut champ. En effet, à bas champ, les interactions de nature hyperfine deviennent suffisamment importantes pour que les mélanges  $ST_{\pm}$  deviennent dominants<sup>37</sup>. Une étude détaillée de la variation de l'effet de CIDNP en fonction du champ utilisé permettra ainsi d'évaluer l'importance relative des mélanges  $S-T_0$  et  $S-T_{\pm}$  pour une réaction donnée.

D'autre part, l'effet de multiplet est indépendant du champ magnétique appliqué (2ème et 3ème termes de l'équation 9). On peut donc également envisager l'étude de la CIDNP à champ nul<sup>38</sup>.

Une partie des travaux réalisés dans notre laboratoire a illustré ces études en champ magnétique variable, ainsi que les problèmes expérimentaux afférents<sup>8</sup>.

### IV - LE MECANISME TRIPLET OVERHAUSER (TM)

La première théorie rendant compte des effets de CIDNP (juste après la découverte du phénomène) supposait l'existence d'une légère différence de population des états de spin électronique de la paire radicalaire. La polarisation électronique était ensuite transférée aux états de spin nucléaire selon le mécanisme de relaxation transverse électron-noyau, couramment appelé effet OVERHAUSER (NOE). Bien que rapidement abandonné au profit du RPM, il semble cependant que le TM soit toujours présent dans les processus de polarisations nucléaires de la CIDNP<sup>39</sup>. Mais dans la majorité des cas, il est totalement masqué par le

RPM beaucoup plus efficace. On l'observera, néanmoins, quand la polarisation électronique initiale est très importante, ou quand le RPM est inopérant<sup>40</sup>. On retiendra simplement ici quelques critères expérimentaux permettant l'étude du TM, se manifestant par l'influence de divers facteurs<sup>8b</sup> :

- Le dégazage des solutions, le TM étant affecté par la présence d'oxygène davantage que le RPM.

- La concentration de l'espèce polarisée, le TM devenant prépondérant à fortes concentrations.

- La valeur du champ magnétique extérieur (qui peut également affecter le RPM).

- L'orientation du vecteur champ électrique de la lumière polarisée incidente par rapport à la direction du champ magnétique externe.

## V - CONCLUSION

La meilleure compréhension des mécanismes responsables de la polarisation magnétique fait de la CIMP (CIDEP + CIDNP), combinée aux techniques conventionnelles de spectrométrie RPE et RMN, un puissant outil d'investigation en photochimie organique et en photobiologie, des réactions des états excités triplet et des radicaux libres. Elle fournit ainsi des renseignements sur les caractéristiques et la structure des intermédiaires et sur le mécanisme de leurs interactions.

La CIDEP peut par exemple, fournir des données au moins qualitatives sur les différences de rendement de passage intersystème vers différents sous-états triplet, les temps de relaxation de spin longitudinaux des triplets et des radicaux, ainsi que les constantes d'inhibition des triplets. La CIDNP, quant à elle, permettra l'étude des différents processus de "cage" de ces espèces (recombinaison, piégeage).

Enfin, si jusqu'à présent l'observation de ces phénomènes qui se faisait à l'"état stationnaire" rendait leur interprétation quantitative très délicate, l'utilisation de la photolyse pulsée par laser couplée à la RMN par transformée de FOURIER<sup>41</sup> (voir chapitre suivant) ou à des spectromètres RPE à réponse ultra-rapide<sup>42</sup> devrait permettre des

mesures absolues de facteurs d'exaltation des signaux et la détermination de rendements quantiques absolus par différentes réactions faisant intervenir des radicaux libres. Cette spectrométrie résolue dans le temps présente en outre l'avantage d'observer la paire dès sa formation et de minimiser les complications pouvant être dues à la relaxation spin-réseau, donc de révéler certaines réactions "cachées" à l'état stationnaire.

--oooOooo--

PROCESSUS	ECHELLE DE TEMPS (sec.)
Agitation moléculaire (petites molécules et radicaux).	$10^{-13}$ à $10^{-11}$
Recombinaison primaire (trop rapide pour la CIDNP) C'est le véritable effet de "cage" selon Noyes.	$10^{-11}$ - $10^{-10}$
Recombinaison secondaire	$10^{-10}$ - $10^{-7}$
Mélange S-T	$10^{-9}$ - $10^{-8}$
Relaxation Spin-Spin électronique ( $T_2$ )	$10^{-6}$ - $10^{-5}$
Relaxation Spin-Réseau Nucléaire dans les radicaux ( $T_{1R}$ )	$10^{-5}$ - $10^{-3}$
Relaxation Spin-Réseau Nucléaire dans les produits diamagnétiques ( $T_{1N}$ )	1 - 100

**TABLEAU I** : Echelle de temps des principaux processus intervenant en CIDNP.



## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

--0000000--

- 1) R.W. FESSENDEN et R.H. SCHULER - *J. Chem. Phys.* 39, 2147 (1963)
- 2) a) J. BARGON, H. FISCHER et U. JOHNSON - *Z. Naturforsch.* 22a, 1551 (1967) - b) J. BARGON et H. FISCHER - *Ibid.*, 1556.
- 3) a) H.R. WARD et R.G. LAWLER - *J. Amer. Chem. Soc.* 89, 5518 (1967)  
b) R.G. LAWLER - *Ibid.*, 5519.
- 4) a) G.L. CLOSS - *J. Amer. Chem. Soc.* 91, 4552 (1969) - b) G.L. CLOSS et A.D. TRIFUNAC - *Ibid.* 92, 2183 (1970)
- 5) R. KAPTEIN et J.L. OOSTERHOFF - a) *Chem. Phys. Letters* 4, 195 (1969)  
- b) *Ibid.*, 214.
- 6) J.K.S. WAN, D.A. HUTCHINSON et S.K. WONG - *Acc. Chem. Res.* 7, 58 (1974) et références citées.
- 7) K.H. HAUSER et D. STEHLIK - *Adv. Magn. Reson.* 3, 79 (1968)
- 8) a) S. CAPLAIN - Thèse d'état ès Sciences Physiques, Lille (1980)  
b) G. VERMEERSCH - Thèse d'état ès Sciences Physiques, Lille (1982)
- 9) a) *Chemically Induced Magnetic Polarization* - Ed. L.T. Muus, P.W. Atkins, K.A. Mc Lauchlan et J.B. Pedersen, D. Reidel, Dordrecht (Pays-Bas) (1977) - b) P.W. ATKINS et G.T. EVANS - *Adv. Chem. Phys.* 35, 1 (1976)  
- c) J.H. FREED et J.B. PEDERSEN - *Adv. Magn. Reson.* 8, 1 (1976) - d) K.A. Mc LAUCLAN - *Sci. Prog. Oxf.* 67, 509 (1981)
- 10) F.J. ADRIAN - a) *J. Chem. Phys.* 53, 3374 (1970) - b) *Chem. Phys. Lett.* 10, 70 (1971) - c) *J. Chem. Phys.* 54, 3912 (1971)
- 11) R. KAPTEIN - *J. Amer. Chem. Soc.* 94, 6251 (1972)
- 12) R.M. NOYES - a) *J. Chem. Phys.* 22, 1349 (1954) - b) *J. Amer. Chem. Soc.* 77, 2042 (1955) - c) *Ibid.* 78, 5486 (1956) - d) *Progr. React. Kinet.* 1, 129 (1961)
- 13) N.J. TURRO et G.C. WEED - *J. Amer. Chem. Soc.* 105, 1861 (1983)
- 14) F.J. ADRIAN - Voir réf. (9a), Chap. V
- 15) Z. SCHULTEN et K. SCHULTEN - *J. Chem. Phys.* 66, 4616 (1977)
- 16) J.B. PEDERSEN et J.H. FREED - *J. Chem. Phys.* 57, 1004 (1972)
- 17) R. KAPTEIN - a) Thèse, Chap. VIII, Université de Leiden (1971) -  
b) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 732 (1971)
- 18) a) G.L. CLOSS et A.D. TRIFUNAC - *J. Amer. Chem. Soc.* 92, 2186 (1970)  
b) G.L. CLOSS, C.E. DOUBLEDAY et D.R. PAULSON - *Ibid.*, 2185

- 19) K. MOLLER et G.L. CLOSS - J. Amer. Chem. Soc. 94, 1002 (1972)
- 20) R. KAPTEIN - a) J. Amer. Chem. Soc. 94, 6262 (1972) - b) Voir réf. (9a), Chap XIV
- 21) R. KAPTEIN, J. BROKKEN-ZIJP et F.J.J. de KANTER - J. Amer. Chem. Soc. 94, 6280 (1972)
- 22) J.A. DEN HOLLANDER - a) Chem. Phys. 10, 167 (1975) - b) J. Chem. Soc. Chem. Commun., 352 (1975)
- 23) G.L. CLOSS et C.E. DOUBLEDAY - J. Amer. Chem. Soc. 95, 2735 (1973)
- 24) a) F.J.J. DE KANTER - Thèse de Doctorat, Université de Leiden - (Pays-Bas) (1978) - b) F.J.J. DE KANTER et R. KAPTEIN - J. Amer. Chem. Soc. 104, 4759 (1982)
- 25) G.L. CLOSS et M.S. CZEROPSKI - J. Amer. Chem. Soc. 99, 6127 (1977)
- 26) J. BARGON - Voir réf. (9a), Chap XXIII
- 27) H.D. ROTH et M.L. MANION SCHILLING - J. Amer. Chem. Soc. 102, 4303 (1980)
- 28) a) H.D. ROTH et M.L. MANION SCHILLING - J. Amer. Chem. Soc. 101, 1898 (1979) - b) R.S. HUTTON, H.D. ROTH, B. KRAEUTLER, W.R. CHERRY et N.J. TURRO - *Ibid.*, 2227
- 29) G.L. CLOSS et M.S. CZEROPSKI - Chem. Phys. Letters 53, 321 (1978)
- 30) G.L. CLOSS et M.S. CZEROPSKI - Chem. Phys. Letters 45, 115 (1977)
- 31) N.E. POLYAKOV, T.V. LESHINA et R.Z. SAGDEEV - Chem. Phys. Letters 114, 566 (1985)
- 32) K.M. SALIKHOV - Chem. Phys. 64, 371 (1982)
- 33) R.S. HUTTON, H.D. ROTH et S.H. BERTZ - J. Amer. Chem. Soc. 105, 6371 (1983)
- 34) P.J. HORE, S. STOB, J. KEMMINK et R. KAPTEIN - Chem. Phys. Lett. 98, 409 (1983)
- 35) W.B. MONIZ, C.F. PORANSKI et S.A. SOJKA - Topics in <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy, Ed. G.C. Levy, Wiley-Interscience, New-York, Vol. 3, pp. 361 à 389 (1979)
- 36) A. SCHÄUBLIN, A. HÖHENER et R.R. ERNST - J. Magn. Resonance 13, 196 (1974)
- 37) G.L. CLOSS - Voir réf. (9a), Chap. XIII
- 38) G.T. EVANS et R.G. LAWLER - Mol. Phys. 30, 1085 (1975)
- 39) J.K.S. WAN - Adv. Photochem. 12, 283 (1980)
- 40) F.J. ADRIAN - Voir réf. (9a), Chap. XXI, pour une étude théorique du sujet
- 41) G.L. CLOSS, R.J. MILLER et O.D. REDWINE - Acc. Chem. Res. 18, 196 (1985)
- 42) K.A. Mc LAUHLAN - Chem. Britain 21, 825 (1985)

--0000000--

## CHAPITRE II

--0000000--

## LA PHOTOSENSIBILISATION

--oooOooo--

### INTRODUCTION

L'intérêt suscité par l'étude des interactions entre les êtres humains et les rayons solaires ne s'est développé que très récemment<sup>1</sup>. Ceci peut paraître paradoxal puisque le rôle essentiel tenu par la lumière dans certains processus vitaux est reconnu depuis des époques pouvant remonter jusqu'à la plus haute antiquité. Le soleil est nécessaire à la vie et la lumière visible est indispensable à la photosynthèse. Les synthèses de la mélanine (colorant de la peau) et de la vitamine D<sub>3</sub> (nécessaire à la fixation du calcium dans l'organisme) ont besoin de la lumière solaire. On utilisait déjà dans l'ancienne Egypte des onguents (contenant des furocoumarines dont on reparlera plus tard) en combinaison avec la lumière pour le traitement d'une maladie de la peau : le vitiligo.

Ce n'est que depuis une vingtaine d'années, cependant, que l'on a pris conscience que la lumière pouvait également avoir une activité néfaste. Ceci s'est fait avec le développement de méthodes thérapeutiques utilisant directement la lumière (traitement de la jaunisse des nouveaux-nés par exemple) ou la combinant avec des substances exogènes ou endogènes dites photosensibilisantes (traitement du psoriasis ou du vitiligo par les furocoumarines, de certains cancers par les hémato-porphyrines, ...) <sup>2</sup>. On connaît mieux également la nature de différentes maladies pour lesquelles la lumière solaire joue un rôle prépondérant (porphyries, photodermatoses, cancers de la peau, ...).

On s'est ainsi aperçu de l'apparition d'effets indésirables (photo-toxicité, photoallergie) liés aux réactions photochimiques concernant les médicaments<sup>3</sup> ou d'autres composés : produits d'utilisation courante (aliments, produits d'entretien) ou produits cosmétiques par exemple. Ceci explique le développement actuel des travaux dans le domaine récent de la photobiologie. Ceux-ci sont particulièrement orientés vers l'étude de la compréhension des mécanismes de photosensibilisation et la recherche de systèmes de photoprotection<sup>4</sup>.

L'étendue et la complexité de ces phénomènes ont nécessité la participation d'équipes de chercheurs interdisciplinaires. Elles vont ainsi de chimistes qui synthétiseront des molécules nouvelles aux cliniciens qui les utiliseront sur leurs patients, en passant par les photochimistes, les biochimistes et les biologistes. Ils s'efforceront d'étudier la photo-réactivité de ces molécules et de mettre au point des tests permettant d'évaluer leur degré de phototoxicité par des expériences *in vitro* et *in vivo*.

## A - LE PHENOMENE DE PHOTOSENSIBILISATION

### I - LES RADIATIONS SOLAIRES

Deux systèmes organiques sont principalement concernés par les effets de la lumière solaire et ce pour des raisons évidentes : la peau et les yeux. Les radiations solaires atteignant la surface terrestre, s'étendent du domaine ultra-violet (290 nm) jusqu'aux zones de l'infra-rouge et bien au-delà (environ 20% de ces radiations ont une longueur d'onde supérieure à 1000 nm). Rappelons que le spectre visible s'étale de 380 nm à 800 nm. La plupart des réactions photobiologiques concernant la peau sont induites par les radiations comprises entre 290 nm et 320 nm (UV - B). A côté d'effets bénéfiques, telle la production de vitamine D, elles peuvent provoquer une réponse érythémateuse ou "coup de soleil", une stimulation de la pigmentogénèse mais aussi l'induction de cancer de la peau. Elles se traduisent au niveau cellulaire par l'inhibition de la mitose, des synthèses de l'ADN, des ARN et des protéines. Les radiations UV de plus grande longueur d'onde (UV - A de 320 nm à 380 nm) se traduisent par peu d'effets immédiats et visibles, mais, plus sournoisement, elles accentuent les effets provoqués par les UV - B, dont

l'effet carcinogène. D'autre part, les UV - A sont responsables de la grande majorité des réactions produites par des photosensibilisateurs exogènes.

On retiendra, pour terminer, le problème de l'appauvrissement en ozone de la stratosphère et son incidence sur l'efficacité de la filtration des rayonnements de longueur d'onde inférieure à 320 nm, ceux qui précisément présentent un certain danger pour l'être humain.

## II - LA PHOTSENSIBILISATION

La réponse d'un individu à la lumière solaire résulte en général d'un équilibre entre deux mécanismes. L'un dépend de la déficience de cet individu en mélanine. Cette substance se comporte comme un filtre protecteur naturel. Une personne à peau très pâle sera très vulnérable à une exposition prolongée au soleil et présentera un risque très élevé de cancer de la peau. Ce risque est considérablement réduit chez les personnes à peau colorée.

L'autre mécanisme sera, par contre, observé même chez ce second type d'individus. Dans ce cas, la peau devient très sensible à la lumière à cause d'un agent photosensibilisant. Celui-ci peut être exogène (c'est le cas d'un médicament appliqué localement ou ingéré par voie orale) ou endogène (production d'un métabolite par exemple). Les principales cibles de ces agents sont alors les protéines et les acides nucléiques.

## III - LES MECANISMES DE LA PHOTSENSIBILISATION<sup>5</sup>

Il se peut que la réaction photochimique d'un composé (R) ne puisse être observée dans des conditions données ; soit parce qu'il n'absorbe pas directement la radiation lumineuse ( $h\nu$ ) à laquelle on l'expose, soit à cause d'un rendement de passage intersystème trop faible pour le conduire à son état excité triplet, qui serait l'état réactif concerné par la réaction attendue.

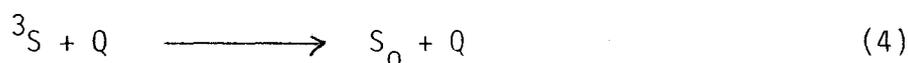
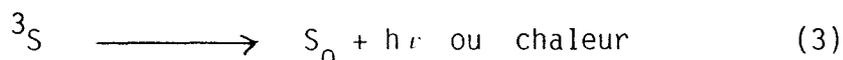
Cependant, cette même réaction peut avoir lieu dans ces mêmes conditions, en présence d'une autre molécule (S) qu'on appellera photosensibilisateur. Le processus peut alors être résumé dans les équations suivantes :



L'état excité réactif  $R^*$  de  $R$  est alors obtenu par transfert d'énergie (éq. 2) à partir de l'état excité  $S^*$ .  $S^*$  est créé quant à lui, par absorption directe de la radiation lumineuse par une molécule de sensibilisateur dans son état fondamental ( $S_0$ , éq. 1).

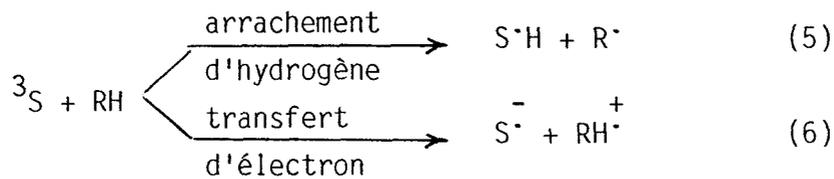
Rigoureusement en photochimie, l'action de  $S$  est de type catalytique, i.e. cette espèce n'est pas modifiée au cours de la réaction. Mais en photobiologie, le phénomène de photosensibilisation est beaucoup moins restrictif et concerne également des composés qui peuvent être affectés par la réaction étudiée. En effet, la plupart des réactions photosensibilisées concernent les états excités de  $S$ . Ceux-ci peuvent réagir soit directement avec le substrat biologique (molécule  $R$ ) soit avec une autre molécule, conduisant à des produits qui pourront éventuellement réagir avec le substrat à leur tour. On parlera dans ce cas "d'action photodynamique".

Ainsi, au cours d'une réaction photosensibilisée, la première étape est l'absorption d'un photon ( $h\nu$ ) par  $S_0$ . L'état excité obtenu est alors en général  $^1S$ , l'état **singulet** caractérisé par une énergie élevée et une durée de vie brève ( $10^{-9}$  à  $10^{-6}$  s). On peut ensuite, par passage intersystème, atteindre un état de plus basse énergie et de plus longue durée de vie ( $10^{-3}$  à 10 s) : l'état **triplet**  $^3S$ . Pour la plupart des sensibilisateurs photodynamiques, cette étape s'effectue avec un excellent rendement. A cause de sa plus longue durée de vie, cet état a donc une probabilité beaucoup plus grande de réagir avec d'autres molécules avant de revenir à l'état fondamental. Ces réactions peuvent consister soit en un transfert de charge (mécanisme de type I) soit en un transfert d'énergie (mécanisme de type II) avec des substrats se trouvant à proximité de  $S^*$ . Mais l'état triplet peut également être désactivé soit par un processus radiatif ou non (éq. 3), soit par certains types de composés appelés inhibiteurs  $Q$  (éq. 4).

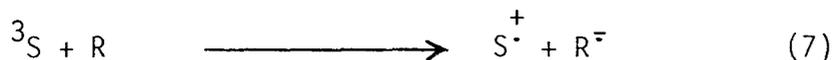


### 1 - Le mécanisme de type I

Il s'agit d'un mécanisme de nature radicalaire et il concerne une action directe du sensibilisateur (S) sur le substrat biologique (RH) selon le schéma :



ou bien, si le substrat est oxydant :



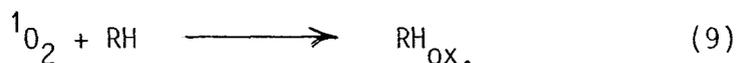
Dans le cas où ce substrat est l'oxygène, on obtiendra alors des espèces très réactives de ce composé tels les radicaux anion superoxyde  $\text{O}_2^{\cdot-}$  ou hydroxyle  $\text{HO}^\cdot$ .

### 2 - Le mécanisme de type II

Il s'agit d'un transfert d'énergie et celui qui est le plus couramment observé résulte de l'interaction entre l'état triplet du sensibilisateur et l'état fondamental de l'oxygène (qui est un état triplet) :



${}^1\text{O}_2$  est bien plus réactif que  $\text{O}_2$  à l'état fondamental et peut oxyder un grand nombre de substrats biologiques.



L'oxygène singulet peut exister sous deux états  ${}^1\Delta_g$  et  ${}^1\Sigma_g^+$ . On pense en général que c'est le premier, de durée de vie plus longue, qui est impliqué dans bon nombre de réactions photodynamiques<sup>6</sup>.

#### IV - LES SENSIBILISATEURS PHOTODYNAMIQUES

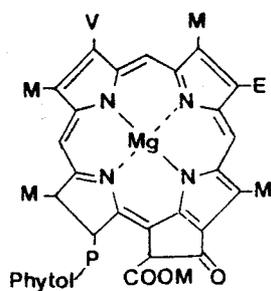
On connaît un très grand nombre d'agents responsables de la sensibilisation de systèmes biologiques à la lumière (environ un demi-millier) et on les regroupe souvent improprement sous le terme de "colorant" (dye). Le tableau I donne une liste choisie de quelques-uns d'entre eux parmi les plus répandus et auxquels il sera fait référence dans la suite du texte. Leur action résulte le plus souvent d'une contribution des deux mécanismes décrits précédemment. Leur part respective dépendra évidemment de la nature du sensibilisateur, de celle du substrat, de la concentration en oxygène, mais aussi de l'environnement dans lequel sont placés les différents partenaires.

Cependant, si des progrès considérables ont été faits ces dernières années sur la connaissance des processus initiaux concernant les réactions photodynamiques<sup>7</sup>, les étapes suivantes sont encore mal connues : nature des produits intermédiaires, finaux, difficultés liées à la modélisation in vitro et à la transposition des résultats in vivo... Ceci explique donc la quantité de travaux reportés dans ce domaine et dans des revues aussi diversifiées que celles concernant la dermatologie, la pharmacologie, la biophysique et enfin la photobiologie.

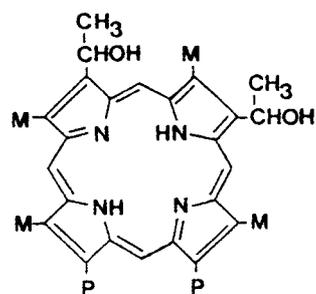
#### V - PHOTOALLERGIE ET PHOTOTOXICITE

L'action indésirable d'une substance sous l'effet de la lumière se traduit chez un sujet par une réponse photoallergique et/ou phototoxique. Cliniquement ces deux phénomènes sont fréquemment indiscernables. Cependant, on admet généralement que :

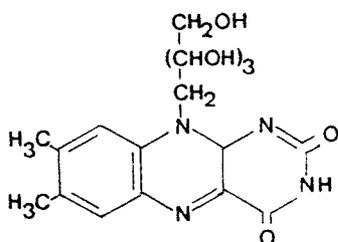
- la photoallergie<sup>8</sup> se manifeste après plusieurs expositions du sujet à la lumière et ne concerne qu'un faible pourcentage de la population traitée (nature immunologique du phénomène). On a même observé que dans certains cas, le sujet continuait de rester sensible à la lumière longtemps après l'interruption du traitement.
- La phototoxicité<sup>9</sup> se manifeste dès la première exposition et peut toucher tous les sujets traités.



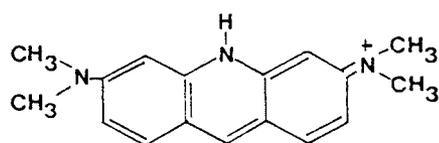
CHLOROPHYLLE a



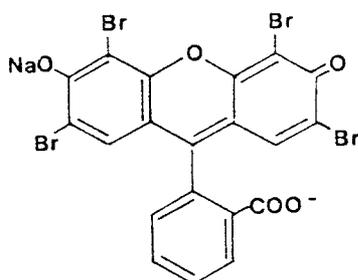
HEMATOPORPHYRINE



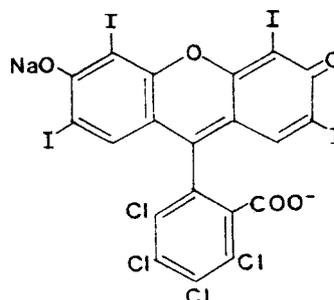
RIBOFLAVINE



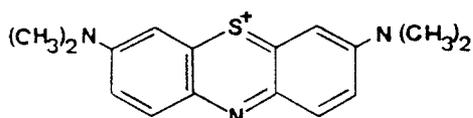
ACRIDINE ORANGE



EOSINE Y



ROSE DE BENGALE



BLEU DE METHYLENE



TABLEAU I

Structures de quelques photosensibilisateurs d'usage courant.  
 E, M, P, V représentent respectivement des groupements éthyle,  
 méthyle, acide propionique et vinyle.

Les figures 1 et 2 montrent chacun de ces deux mécanismes. Il faut également remarquer que, parfois, la même substance peut, administrée à hautes doses, induire une réponse phototoxique, mais, après de faibles doses répétées, induire une réponse photoallergique. Au cours de notre travail, nous nous sommes surtout intéressés au problème de phototoxicité et nous allons exposer ici les connaissances actuelles sur le sujet.

## 1 - LA PHOTOTOXICITE

Elle peut être divisée en deux processus : (i) la réaction de photosensibilisation du composé biochimique in vivo, puis (ii) la réponse biologique résultant de cette réaction. Pour étudier le premier, les travaux sont souvent réalisés in vitro afin de déterminer si un composé phototoxique modifie une molécule biologique isolée et, dans l'affirmative, en préciser les mécanismes ainsi que les produits obtenus. C'est ce en quoi a consisté une grande partie de notre travail. Le photobiologiste essaie ensuite d'identifier le mécanisme opérant in vivo.

Le second processus est du ressort des biochimistes et des cliniciens et est évalué par différents types de tests : inactivation de virus, létalité de bactéries ou de cellules de mammifères, fréquence des mutations chez les bactéries et observations d'érythèmes sur la peau humaine -"photopatchs tests".

## 2 - LES MECANISMES DE PHOTOTOXICITE

Comme le montre la figure 2, on peut distinguer principalement deux types de mécanismes : l'un direct où l'un des états excités (triplet le plus souvent, ou singulet) du photosensibilisateur (ou d'une espèce instable qui en dérive) réagit directement avec le substrat biologique ; l'autre indirect où c'est une autre molécule qui réagit (photoproduit ou espèce oxygène activée).

Le mécanisme direct comprend :

- les réactions d'addition du photosensibilisateur dans un état excité avec le substrat biologique.

COMPOSE PHOTOALLERGIQUE



FORMATION DE RADICAUX LIBRES  
ET/OU OXYDATION



FORMATION D'UN NOUVEL HAPTENE



CONJUGAISON HAPTENE-PROTEINE  
(ANTIGENE → PHOTOADDUIT COVALENT)



SENSIBILISATION PAR LES CELLULES  
IMMUNO-COMPETENTES (ICC)(LYMPHOCYTES)



INTERACTION PHOTOANTIGENE - ICC

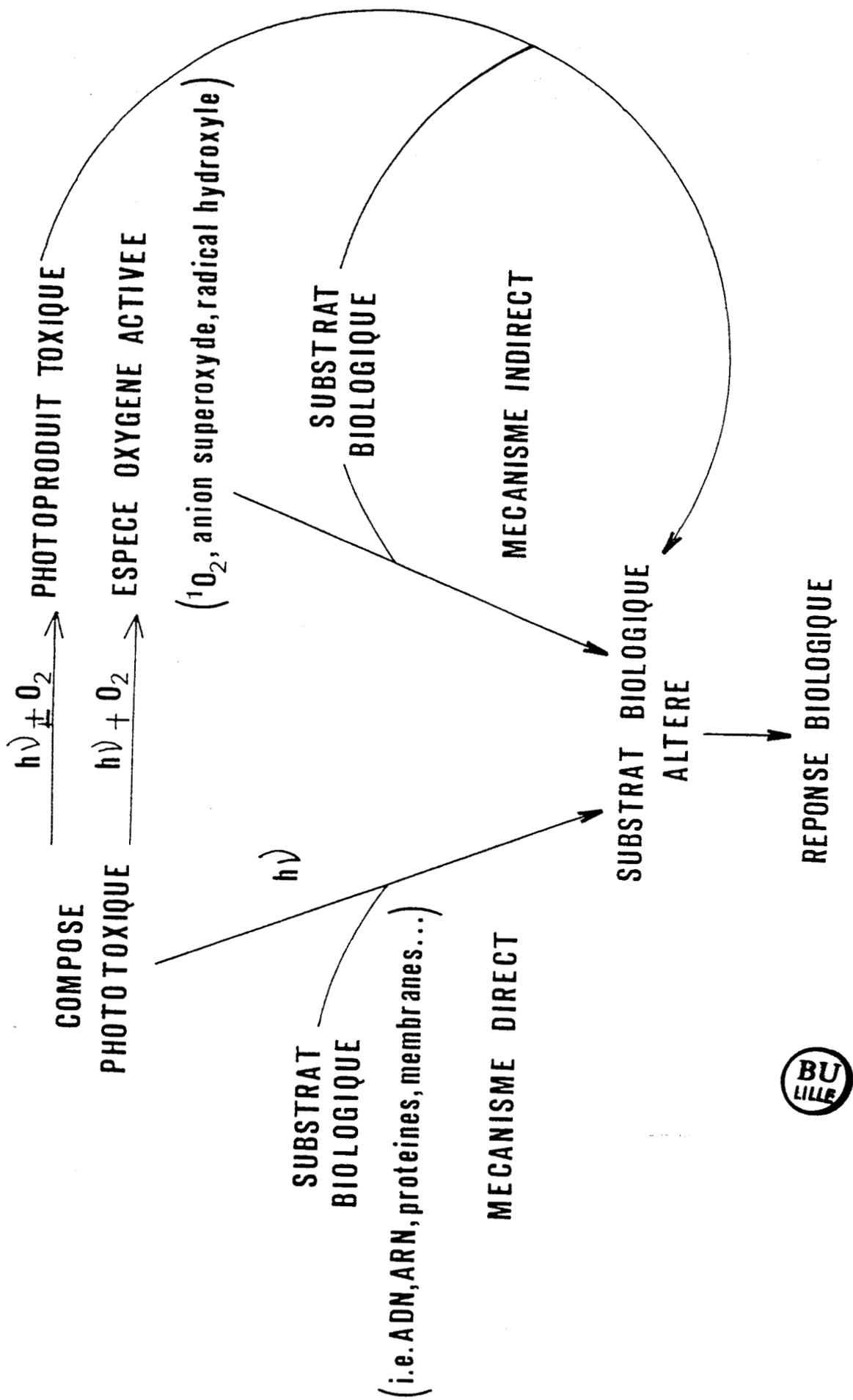


REPONSE BIOLOGIQUE  
(ALTERATION CELLULAIRE)



Figure 1

Mécanismes de photoallergie



**Figure 2**

Mécanismes de phototoxicité.

- les réactions de fragmentation conduisant à des radicaux instables du photosensibilisateur.
- les réactions de photoionisation conduisant à des radicaux cations et à des électrons.
- les réactions de type I décrites précédemment.

A cause de la faible durée de vie de toutes ces espèces transitoires, le composé phototoxique devra, pour réagir, soit être complexé au substrat, soit être très proche de sa cible quand il absorbera la lumière.

Le mécanisme indirect comprend :

- les réaction de type II décrites précédemment, conduisant à des espèces oxygène activées ( $^1\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$ ,  $\text{HO}^\cdot$ , ...).
- les réactions conduisant à la formation de photoproduits stables dérivant du composé phototoxique.

Dans ce cas, les espèces formées ayant une durée de vie plus longue, leur interaction avec les substrats biologiques pourra se faire à des distances plus grandes que dans le mécanisme précédent. Il est à noter également que différents agents phototoxiques réagissant par le mécanisme indirect pourront causer les mêmes modifications biologiques puisqu'ils pourront engendrer des espèces actives identiques ( $^1\text{O}_2$  par exemple).

Enfin, on pourra également remarquer que, dans le cas où l'agent photosensibilisant est une substance médicamenteuse, il faudra auparavant vérifier qui, du principe actif, de ses métabolites ou des composés entrant dans la composition du médicament (conservateurs, antioxydants, colorants, ...) est sensible à la lumière.

## VI - CONCLUSION & PERSPECTIVES

En conclusion, les effets de la lumière solaire peuvent donc être à la fois bénéfiques (photochimiothérapie, ...) et néfastes (phototoxicité, photoallergies, ...). Pour atteindre les cibles biologiques, elle nécessite généralement la présence d'un photosensibilisateur qui sera initiateur de ces effets.

Les faits exposés montrent combien la compréhension des phénomènes de photosensibilisation est peu aisée et que, bien que la transposition des résultats obtenus *in vitro* (quelle que soit l'élaboration du modèle d'étude adopté) soit toujours délicate *in vivo*, les éléments qu'ils fournissent sont indispensables au photobiologiste. La présence d'effets secondaires indésirables au cours de traitements par certaines substances, explique aussi la recherche de nouvelles molécules, possédant des propriétés pharmacodynamiques semblables tout en n'étant plus phototoxiques. On peut aussi développer l'utilisation d'agents photo-protecteurs ou inhibiteurs de la phototoxicité de ces substances (les caroténoïdes par exemple).

Dans notre travail, nous nous sommes surtout intéressés (i) à l'étude du mécanisme primaire d'action de certaines substances photosensibilisantes, (ii) à leur interaction avec des cibles biologiques privilégiées (bases des acides nucléiques et amino-acides) et (iii) à essayer d'évaluer par une méthode simple et rapide (la photo-CIDNP) leurs effets secondaires néfastes ou leur potentiel photosensibilisant.

## B - UTILISATION DE LA CIDNP DANS LE DOMAINE DES MOLECULES D'INTERET BIOLOGIQUE ET DE LA PHOTOSENSIBILISATION

A ses débuts, la CIDNP fut essentiellement appliquée à l'étude de petites molécules organiques. Le premier exemple de l'utilisation de cette technique avec des systèmes d'intérêt biologique concernait un dérivé de la chlorophylle. TOMKIEWICZ et KLEIN<sup>10</sup> avaient en effet observé que la chlorophylle b, irradiée en présence de quinone, induisait des effets de CIDNP sur les protons de la quinone. Plus tard, ROTH et LAMOLA<sup>11</sup>, puis CLOSS<sup>12</sup> reprirent ce travail dans d'autres conditions expérimentales (à l'aide de la CIDNP résolue dans le temps, par exemple<sup>12</sup>) ainsi qu'avec d'autres dérivés de la chlorophylle. MARUYAMA et coll.<sup>13a,b,c,d</sup> observèrent le même type d'effets avec la phéophytine A ou avec des composés à structure porphyrrique.

L'intérêt de ces études repose sur le rôle essentiel que les processus de transfert de charge sont supposés jouer dans le mécanisme de la photosynthèse et en particulier dans les systèmes chlorophylle (Chl)-quinone (Q). Les effets de CIDNP observés s'expliquent par la

formation initiale d'une paire de radicaux ions  $\overline{\text{Chl}^+\text{Q}^-}$  résultant d'un transfert électronique à partir de la chlorophylle. L'application de la théorie du RPM (cf Ch. I) permet ainsi d'identifier la multiplicité de l'état excité réactif de cette dernière. Il a été montré que la réaction était très influencée par le milieu dans lequel elle était effectuée. Le pH, les concentrations des réactifs, le solvant utilisé modifient les effets de CIDNP et par conséquent la nature du mécanisme.

Cependant, ces travaux sont restés très ponctuels. Par contre, l'apport de la photo-CIDNP a été clairement établi dans l'étude structurale des protéines en solution.

### I - PHOTO-CIDNP DES AMINO-ACIDES ET DES PROTEINES

La plupart des travaux réalisés dans ce domaine sont relativement récents<sup>14,15</sup> et ont été essentiellement accomplis par deux équipes : celle de KAPTEIN aux Pays-Bas et celle de MUSZKAT en Israël. La méthode repose sur l'exaltation sélective de signaux de RMN d'une protéine. Ces signaux correspondent à certains résidus aromatiques de surface. La polarisation est créée par une photoréaction réversible, non destructrice, entre un sensibilisateur (généralement une flavine) et les trois acides aminés aromatiques suivants : tyrosine, histidine et tryptophane<sup>16</sup>. Ces derniers sont polarisés par l'intermédiaire de réactions de transfert de charge avec le photosensibilisateur dans un état excité (schéma 1). Ces réactions (particulièrement l'arrachement d'hydrogène, éq. 4) nécessitent un contact direct des deux réactifs et ne peuvent avoir lieu qu'avec des résidus accessibles donc situés à la surface de la protéine. La méthode constitue, dans ce cas, une source d'information d'ordre structural (plus que mécanistique) sur la protéine. En effet, l'intensité des effets de CIDNP sera liée à l'activité (donc à l'accessibilité) des résidus dans la protéine et permet de distinguer ceux qui sont exposés de ceux qui sont dissimulés.

La technique facilite aussi l'attribution de certaines raies dans un spectre RMN haute résolution de la protéine, lorsque la structure de cette dernière est connue. Elle permet enfin, en suivant l'évolution des signaux des espèces polarisées, d'étudier un certain nombre d'interactions protéines-ligand (ex : enzyme-inhibiteur). Elle identifie ainsi les résidus impliqués dans les liaisons avec les ligands et qui deviennent alors inaccessibles.

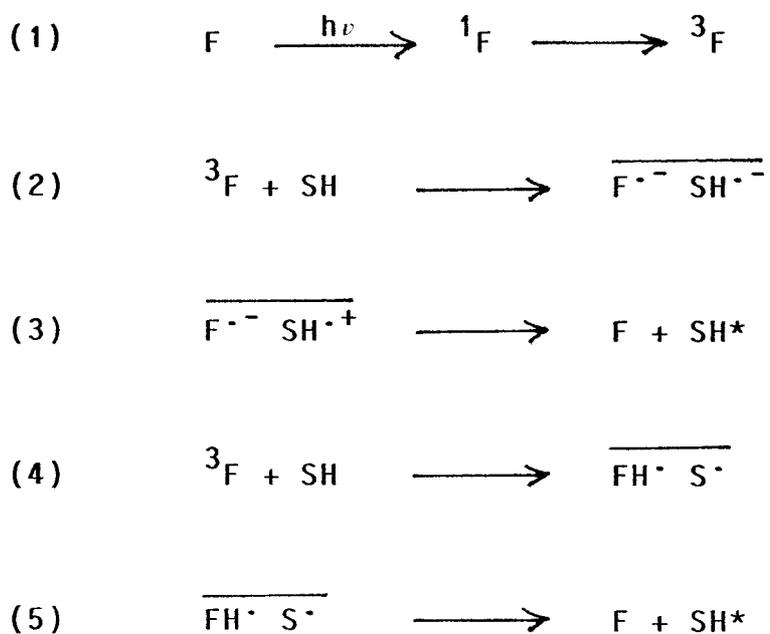


Schéma 1

Réactions donnant naissance aux effets de CIDNP lors de l'action d'un photosensibilisateur (F - ex : flavine) sur un substrat biologique (SH - ex : acide aminé aromatique). \* Une étoile désigne une espèce polarisée

Il convient de noter la haute réversibilité des réactions de transfert de charge impliquées dans ce processus (schéma 1). Les polarisations observées proviennent uniquement des réactifs et ceux-ci sont retrouvés pratiquement intacts en fin de réaction. D'autre part, quand l'irradiation est continue (créant un état stationnaire) les signaux correspondant au sensibilisateur ne sont pas polarisés. Ceci s'explique par le fait que les polarisations qui devraient logiquement résulter des réactions (3) et (5) sont perturbées par d'autres processus<sup>16a</sup> (cf schéma 2). Parmi ceux-ci, le plus important correspond aux réactions (6a) et (6b) qui conduisent à des polarisations de même intensité, mais de signes opposés (produits de cage et de fuite). L'effet global sur le sensibilisateur (la flavine F sur cet exemple) sera donc nul.

Cependant, dans le cas du substrat SH, la polarisation créée par (6b) est atténuée à cause de la relaxation intervenant dans les radicaux diffusant librement. Ceci n'est pas vrai pour la flavine pour laquelle le temps de relaxation est plus long. Enfin, dans ce type de réaction cyclique, la polarisation observée peut également être influencée par la possibilité de formation de paires F au cours de la phase diffusive (7). Ces paires pourront à leur tour soit se recombinaisonner (7a), soit diffuser (7b) et les polarisations obtenues s'ajouter ou se retrancher des polarisations dues à (6). Elles pourront encore être interceptées dans une réaction d'échange (8). Bien que la réaction de dismutation (9) ne soit pas rigoureusement incluse dans un processus cyclique sa contribution ne peut pas non plus être écartée. Nous verrons un peu plus loin que l'influence de ces différentes voies peut être appréciée grâce à la technique récente de photo-CIDNP résolue dans le temps. Cette technique, par exemple, permet l'étude de la dépendance des intensités des signaux de CIDNP en fonction du temps (vide infra).

Sur ces bases, la photo-CIDNP s'est avérée fournir des spectres de protéines considérablement simplifiés par rapport aux spectres RMN "classiques". Elle permet une identification spécifique de chaque résidu polarisé, donne des signaux considérablement amplifiés par les facteurs d'exaltation (d'où un gain de temps) et conserve la haute résolution de la RMN à champ élevé.

Les flavines sont les photosensibilisateurs les plus couramment utilisés. Mais des dérivés xanthéniques (fluorescéine, rose Bengale, érythrosine B ou éosine Y) ont également conduit au même type de

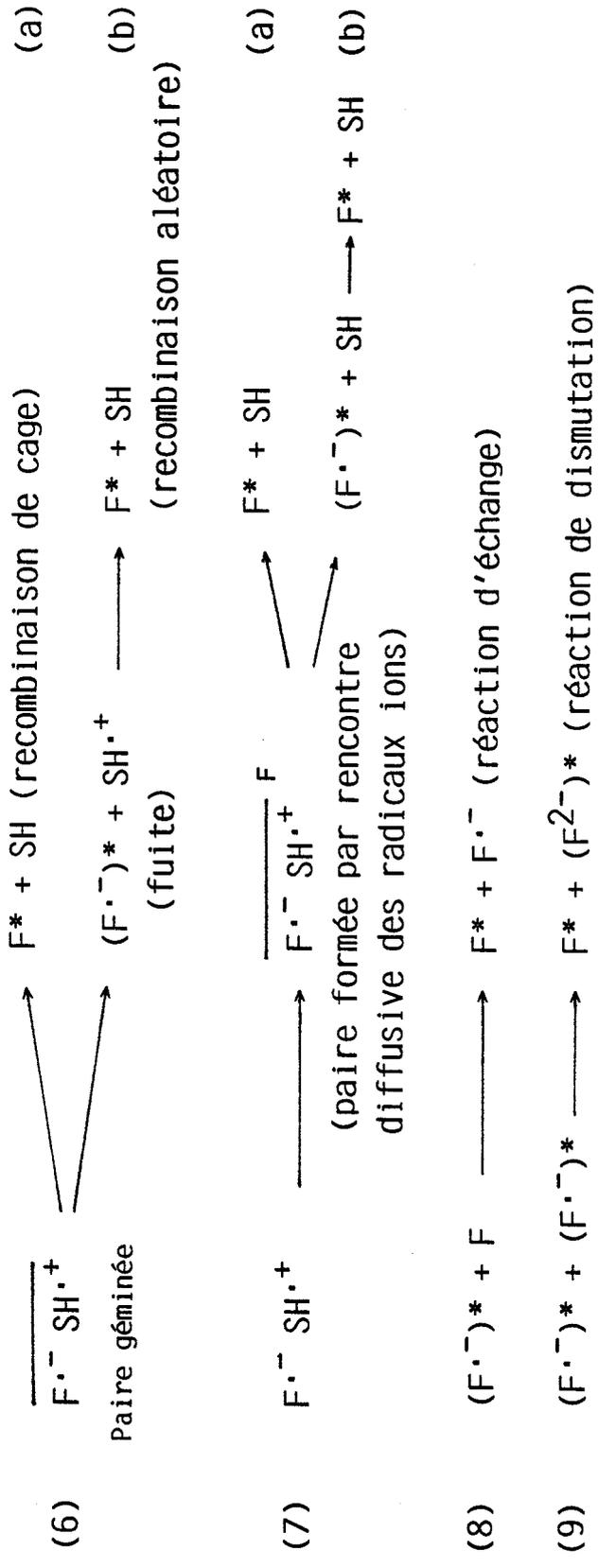


Schéma 2

Réactions secondaires et autres processus intervenant lors de l'action d'un photosensibilisateur (F) sur un substrat biologique (SH)•



résultats (MUSZKAT et coll.<sup>15,17,18</sup>). Les résidus testés sont donc essentiellement des acides aminés aromatiques : tyrosine souvent, histidine quelquefois (ceux-ci réagissent par arrachement d'hydrogène<sup>15</sup>) ainsi que tryptophane (transfert d'électron)<sup>19</sup>. L'allure des spectres obtenus est indiquée sur la figure 3. Le même type de polarisations est également observé avec d'autres dérivés phénoliques ainsi qu'avec des catécholamines<sup>20</sup>.

Nous exposerons brièvement les principaux résultats obtenus par la méthode puis quelques aspects techniques pour la mettre en oeuvre.

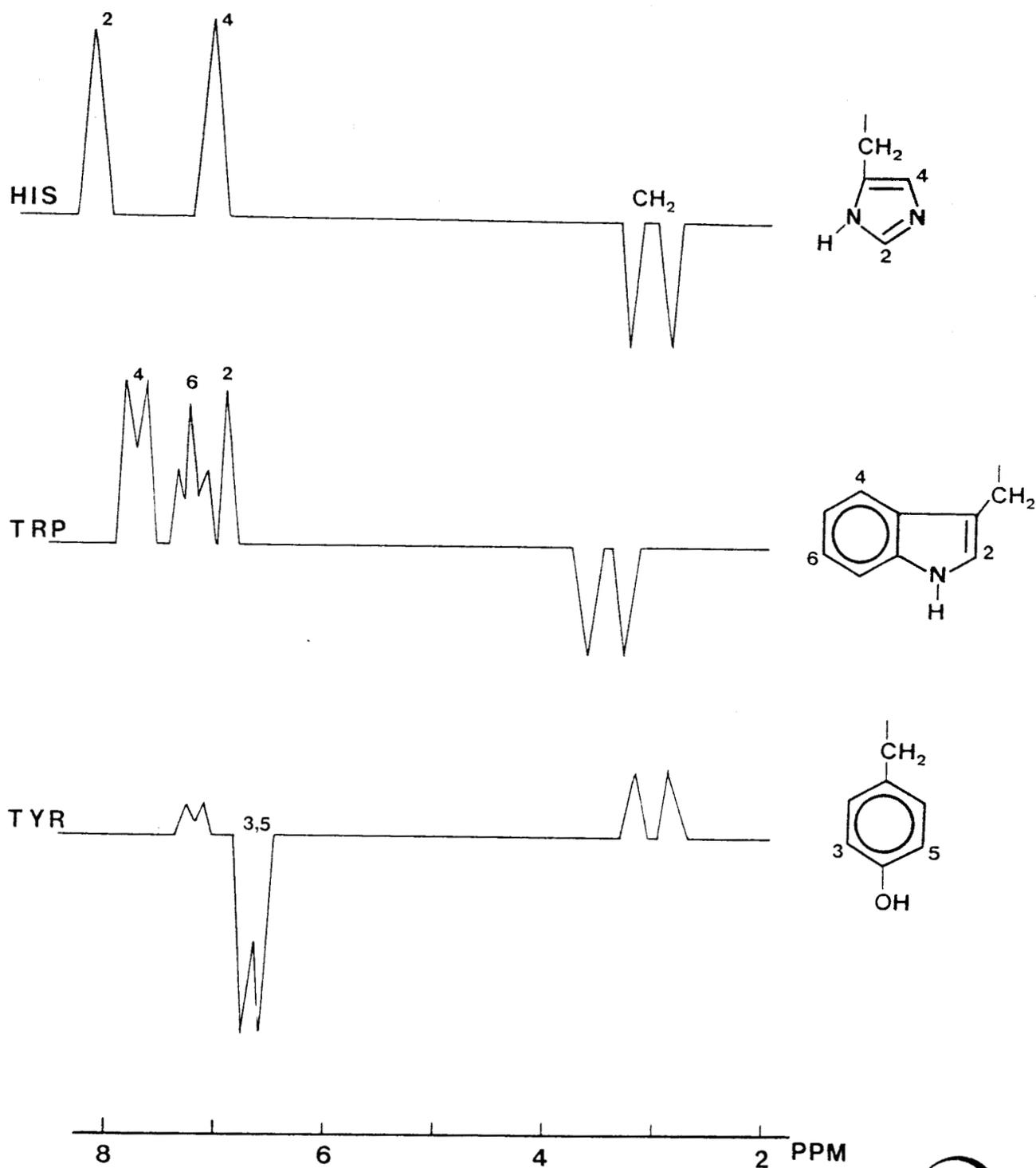
### 1 - Attribution des signaux RMN de résidus aromatiques des protéines.

Celle-ci ne peut évidemment être réalisée que pour des protéines dont la séquence et la structure tridimensionnelle sont déjà connues de façon à identifier les résidus accessibles responsables des effets de CIDNP. La méthode est en général complémentaire d'autres techniques communément utilisées en RMN : l'irradiation sélective, les transferts de polarisation, la spectroscopie d'écho de spin ou l'addition d'agents paramagnétiques. Parmi les protéines ainsi étudiées, on peut citer : la protéine du gène -5 du bactériophage M13<sup>21a</sup>, les phospholipases A<sub>2</sub> des pancréas de porc<sup>22a</sup> et de boeuf<sup>22c</sup>, la ribonucléase pancréatique bovine<sup>23b</sup>, le lysozyme de blanc d'oeuf (de poule) (attribution de certains résidus tryptophane)<sup>24</sup>, le facteur de croissance de l'épiderme<sup>25</sup>, des flavodoxines et flavoprotéines (FAD)<sup>26</sup>.

### 2 - Etude de la conformation des protéines en solution

L'intensité des effets de CIDNP peut être directement corrélée avec l'exposition, la mobilité et l'orientation d'un résidu au sein d'une protéine. Ceci est surtout vrai dans le cas de la tyrosine ou de l'histidine où la polarisation est liée à un arrachement d'hydrogène mais l'est moins dans celui du tryptophane. Un transfert d'électron est en effet beaucoup moins sensible à des paramètres d'ordre structuraux et pourra s'exercer à plus grande distance sans nécessiter une totale accessibilité du résidu.

Dans les deux premiers cas surtout, la photo-CIDNP permet ainsi d'avoir une idée de la conformation des protéines en solution (les rayons



**Figure 3**

Représentation schématique des spectres de photo-CIDNP obtenus avec l'histidine (HIS), le tryptophane (TRP) et la tyrosine (TYR).

Ces schémas représentent la différence entre le spectre de CIDNP et le spectre de RMN non perturbé.



X s'intéressent à des structures cristallines) et d'évaluer certaines modifications conformationnelles pouvant être liées au pH de la solution par exemple ou à des phénomènes d'auto-association de la protéine (en fonction de sa concentration). Elle permet également, dans le cas où la protéine n'est plus seule en solution, d'étudier ses interactions avec des substrats, des inhibiteurs ou d'autres protéines (voir paragraphe 3).

L'accessibilité des résidus tyrosine et histidine a été étudiée dans les protéines suivantes : la colipase A du pancréas de porc<sup>27</sup>, les ribonucléases A et S du pancréas de boeuf<sup>23a</sup>, la dihydrofolate réductase de *Lactobacillus casei*<sup>28</sup>, la phosvitine du jaune d'oeuf de poule<sup>29</sup>, la nucléase du staphylocoque<sup>30</sup>, les neurotoxines et membranotoxines du venin de serpent<sup>31</sup>. On a également mis en évidence des changements de conformation en fonction du pH des ribonucléases précitées<sup>23b</sup> et de la phospholipase A<sub>2</sub> du pancréas de boeuf<sup>22b</sup> ainsi que les possibilités d'auto-association de l' $\alpha$ -lactalbumine bovine<sup>32</sup> et de l'insuline<sup>33</sup>. Une analogie (structurale et fonctionnelle) a pu être établie entre trois inhibiteurs polypeptidiques, isolés à partir de la rate de boeuf, et l'inhibiteur trypsique du pancréas de boeuf (BPTI)<sup>34</sup>. On notera enfin l'étude très intéressante concernant l'accessibilité de certains résidus dans le cristallin-gamma II de veau<sup>35</sup>. Les résultats obtenus pourraient aider à une meilleure compréhension de l'aspect moléculaire de la cataracte.

### 3 - Etude de l'interaction protéines-ligands

La comparaison des spectres de photo-CIDNP d'une protéine seule et en présence d'un ligand, permet d'identifier les sites de liaison de celle-ci. Le résidu concerné ne sera alors plus polarisé dans le second spectre, ou moins intensément selon son degré de participation à l'interaction.

Ce genre d'étude a été réalisé avec des inhibiteurs nucléotidiques par exemple, avec la protéine du gène-5 du bactériophage M13<sup>21</sup>, les ribonucléases A et S du pancréas de boeuf<sup>23b</sup> ou la nucléase de staphylocoque<sup>30</sup>, afin de rechercher les sites actifs de ces protéines vis-à-vis de l'ADN. L'influence de différents ligands sur l'accessibilité de certains résidus a été démontrée avec l'anhydrase carbonique B humaine<sup>36</sup>, la dihydrofolate réductase<sup>28</sup> ou la NADPH-Cytochrome P450

réductase<sup>37</sup>, pour laquelle le retrait de la flavine (FMN) liée à l'enzyme modifie l'activité catalytique de ce dernier. Ce retrait s'accompagne d'une accessibilité retrouvée d'un résidu tyrosine. Celui-ci serait donc situé à proximité du site de liaison du FMN constituant le site actif de l'enzyme.

L'ion calcium  $\text{Ca}^{2+}$  a été étudié en tant que ligand des troponines C cardiaque et squelettique ou la calmoduline<sup>38</sup> ainsi qu'avec la nucléase de staphylocoque<sup>30</sup>. On a mis en évidence que l'interaction entre BPTI et différentes sérine protéases exerce d'importants effets sur les tyrosines accessibles, aussi bien au niveau de l'enzyme que de l'inhibiteur<sup>39</sup>. Les résultats montrent, d'autre part, que la zone de contact dans les constituants du complexe est différente et plus importante en solution que dans le cristal.

En plus de l'accessibilité d'un résidu, la photo-CIDNP permet, dans certains cas, de juger de sa mobilité. Dans le cas de la tyrosine par exemple, les protons 2 et 6 du cycle aromatique possèdent une valeur de constante de couplage hyperfin, au sein du radical tyrosyle, trop faible pour leur permettre d'être polarisés par voie directe. Cependant, ces protons montrent des effets de CIDNP dépendant de la taille de la molécule comportant le résidu tyrosine. Ces polarisations proviennent d'un mécanisme de relaxation dipolaire transverse à partir des protons 3 et 5. Ce phénomène est appelé polarisation transverse ("cross polarization"). Par analogie avec l'effet NOE, son amplitude dépendra des distances internucléaires, de l'agitation moléculaire et des mouvements internes (d'où les variations des effets de CIDNP). La mesure de la valeur du rapport des intensités des polarisations de  $\text{H}_{2,6}$  sur celle de  $\text{H}_{3,5}$  permet d'estimer le temps de corrélation rotationnel de la molécule ( $\tau_c$ ) sur la base d'un modèle simplifié élaboré par HORE et al.<sup>40</sup>. L'immobilisation d'un résidu tyrosine (diminution de  $\tau_c$ ) a été ainsi mise en évidence lors de l'interaction de la [Met] encéphaline, des  $\beta$ -endorphines humaine et de chameau en présence de micelles phospholipidiques<sup>41</sup>. De plus, l'analyse du signal correspondant à  $\beta$ - $\text{CH}_2$  (fig. 3) permet de juger du degré de liaison de la protéine avec les micelles et donc de savoir si l'immobilisation du résidu résulte d'une interaction directe avec ces derniers ou d'un repliement conformationnel de la protéine<sup>42</sup>. En effet, l'élargissement ("broadening") de ce signal indique que le résidu est engagé dans un processus de liaison. Une étude analogue a été faite avec l'inhibiteur tryptique sécrétoire de pancréas de boeuf<sup>42</sup>

#### 4 - Conclusion

La grande sensibilité et la spécificité de la photo-CIDNP pour certains résidus aromatiques d'un grand intérêt biochimique permettent donc d'explorer différents domaines d'une protéine, au sein de laquelle ces résidus sont généralement répartis sur toute la séquence. Il faut cependant interpréter les changements d'intensité d'un signal donné dans un spectre de photo-CIDNP avec le plus grand soin et de nombreux paramètres doivent être contrôlés au cours des mesures. Le principe de la méthode consistant à corréliser l'intensité des signaux d'acides aminés à leur degré d'accessibilité dans la protéine, il convient évidemment de pouvoir attribuer d'éventuelles modifications de cette intensité à ce seul paramètre. Ces différences peuvent résulter, soit effectivement d'un changement conformationnel de la protéine, soit d'un phénomène d'aggrégation de cette dernière, soit de son interaction avec des ligands, soit du type de photosensibilisateur utilisé. Mais la participation d'autres phénomènes souvent indésirables, est également à prendre en compte. Un travail récent de VOGEL et SYKES<sup>43</sup> met l'accent sur l'influence de différents facteurs, qu'il convient de minimiser en prenant les précautions expérimentales appropriées. Il faudra, ainsi, contrôler la fraîcheur des échantillons utilisés et la valeur du pH (surtout dans le cas de l'histidine). Il faudra optimiser le nombre de passages pour l'enregistrement des spectres, les valeurs des concentrations (en particulier celle du sensibilisateur), la puissance de la lumière excitatrice et la durée d'irradiation.

La méthode se limite essentiellement comme nous l'avons vu, à l'étude de résidus aromatiques précis : tyrosine, histidine ou tryptophane. Cependant, elle a également pu être appliquée à des résidus aliphatiques telles que la lysine, ou la cystéine (pour tester l'accessibilité de groupes thiols S-H). Ceux-ci n'étant pas normalement polarisés, l'idée est de greffer sur le résidu, une molécule possédant une fonction phénolique parasubstituée. Celle-ci pourra montrer des effets de CIDNP intenses et fera fonction de sonde extrinsèque.

En greffant un groupement pyrophosphate ou un de ses dérivés sur un résidu lysine de la ribonucléase pancréatique bovine, on pourra ainsi étudier son accessibilité de la même façon que pour la tyrosine ou l'histidine<sup>44</sup>. Des résultats identiques ont été obtenus pour les résidus

cystéine du glutathion ou de la papaine (avec possibilité d'extension à d'autres protéines cystéinylées), lorsqu'on greffe des groupements hydroxy-4 phénylés à ces résidus<sup>45</sup>. Récemment, KAPTEIN et al.<sup>46</sup> ont observé des effets de CIDNP sur un amino-acide particulier que l'on rencontre dans de nombreux antibiotiques naturels (éthamycine par exemple) : l'acide hydroxypicolinique.

## II - PHOTO-CIDNP DES NUCLEOBASES

Si les protéines constituent le matériel le plus utilisé dans les applications de la photo-CIDNP au milieu biologique, des polarisations de spin nucléaire ont également été observées de la même façon sur les bases des acides nucléiques et leurs nucléotides. Le même type de mécanisme que celui détaillé dans le schéma 1 en est à l'origine. On utilise toujours des flavines comme photosensibilisateurs<sup>47,48</sup>. Comme dans le cas des protéines, ces polarisations peuvent renseigner sur la structure d'oligonucléotides ou sur leurs interactions avec d'autres molécules.

KAPTEIN et al.<sup>47</sup> ont ainsi observé des effets de CIDNP principalement sur les bases puriques (adénine et guanine) et leurs nucléotides en présence d'une flavine photoexcitée. Les polarisations sur 5'-AMP sont fortement influencées par le pH et l'addition de tampons. Ceci s'explique par un mécanisme de substitution de paire, dans lequel le radical cation  $AMP^{\cdot+}$  préalablement formé est déprotoné par un catalyseur basique<sup>47b</sup>. Dans le cas de différents dideoxynucléotides contenant un fragment adénylyle, la CIDNP a permis de mettre en évidence que cette déprotonation pouvait se faire suivant deux voies, suggérant l'intervention d'un équilibre conformationnel syn-anti dans les oligodesoxynucléotides<sup>47c</sup>.

Mc CORD et al. ont étudié d'autres oligonucléotides en s'intéressant plus particulièrement aux polarisations créées sur le fragment guanosine<sup>48a</sup>. Sur la base de leurs résultats, ils ont évalué l'accessibilité des résidus guanosine dans l'ARN<sub>t</sub><sup>-Phe</sup> de levure<sup>48b</sup>.

### III - ASPECT EXPERIMENTAL

#### 1 - Matériel et technique

Le dispositif expérimental est en général celui décrit par KAPTEIN<sup>14a,49</sup>. La source de lumière est un laser à Argon ionique interfacé avec un spectromètre RMN opérant à haut champ (360 MHz). Ce type de laser permet d'obtenir de fortes puissances lumineuses (jusqu'à 20W) mais présente l'inconvénient que leur lumière est principalement concentrée dans deux raies visibles (488 et 514 nm). La lumière est modulée par un obturateur commandé par ordinateur, permettant la synchronisation de celle-ci avec les impulsions de radiofréquence (rf). Deux séquences d'impulsion peuvent être utilisées. La première permet une détection plus aisée de faibles polarisations de signaux situés dans un massif compliqué de raies (ce qui est fréquent dans les spectres RMN des protéines). C'est la méthode par différence (schéma 3). On enregistre successivement les FID des spectres RMN normaux (sans éclairage) et ceux obtenus pendant irradiation. Par soustraction de ces deux FID, on obtient le véritable spectre de CIDNP donnant directement le facteur d'exaltation du signal. Une présaturation du spectre (ensemble d'impulsion rf espacées dans le temps de façon aléatoire) est également opérée, pour saturer soit l'ensemble du spectre, soit un signal intense dû au solvant ( ex : HDO).

La seconde séquence permet de différencier (lorsqu'ils existent simultanément) les phénomènes d'élargissement d'une raie pouvant être dus à des processus d'échange entre triplets ou radicaux libres, des phénomènes de polarisation proprement dits. Elle est basée sur la différence de durée de vie des deux phénomènes (respectivement  $10^{-4}$  s et quelques secondes). Ceci signifie que le phénomène d'élargissement ("broadening") ne peut être observé que lorsque la solution est irradiée pendant l'acquisition du FID. Il suffit alors d'enregistrer le FID, un court délai (0,1 s par exemple) après la fin de l'irradiation pour ne conserver que la polarisation du signal.

Il est également important d'irradier les solutions par impulsions lumineuses. En effet, une irradiation continue (même à faible puissance) provoquerait un échauffement trop important de l'échantillon d'autant plus qu'un spectre RMN de protéines nécessite toujours plusieurs passages.

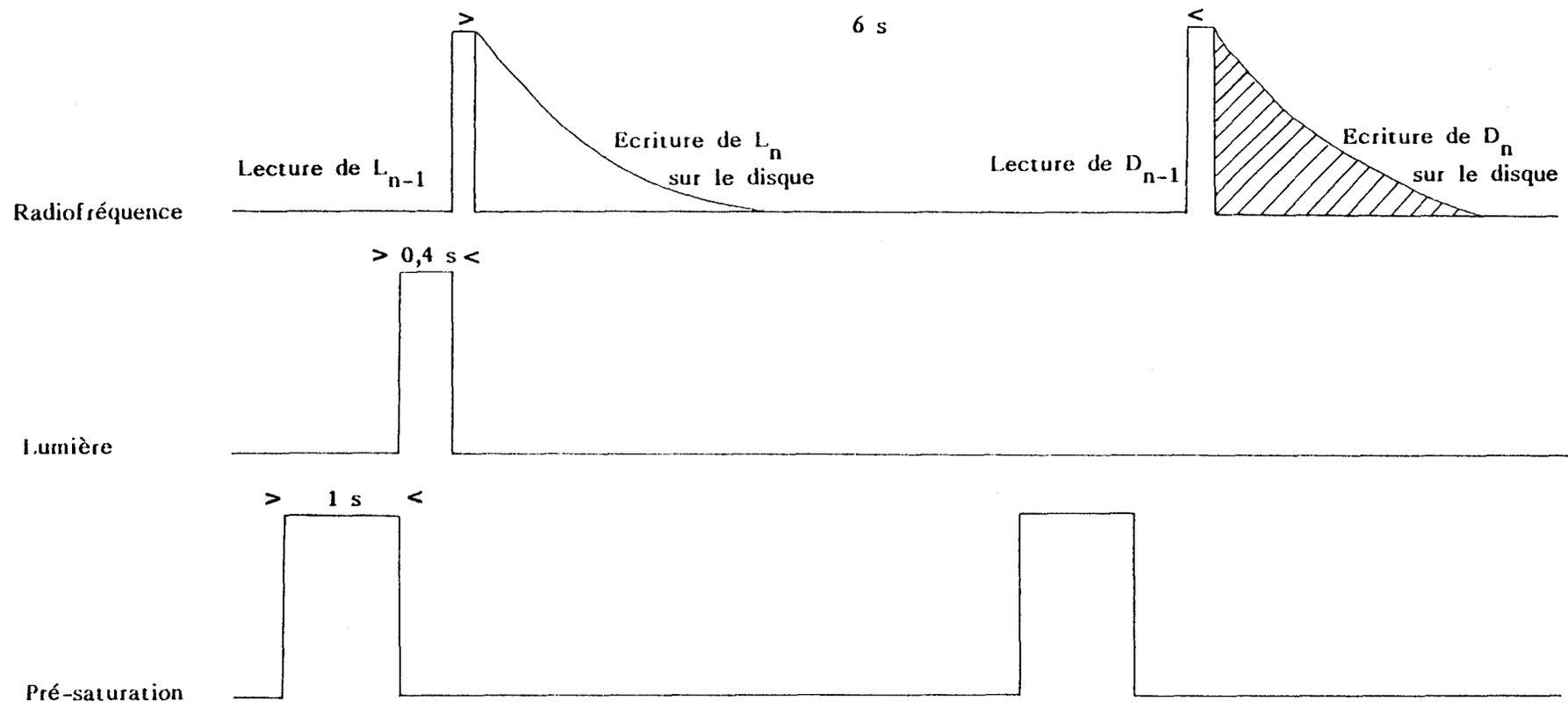


Schéma 3

Séquence impulsionnelle pour l'enregistrement de spectres de CIDNP par la méthode par différence.

L et D correspondent aux FID enregistrés juste après irradiation (L) et aux FID normaux (D).

Les temps indiqués correspondent aux temps moyens généralement utilisés.

Ainsi, le délai entre deux périodes d'irradiation est de 12s, suffisant pour éviter un échauffement trop important de l'échantillon.



Néanmoins, l'utilisation d'un laser n'est pas indispensable. MUSZKAT et coll. ont en effet obtenu leurs résultats avec une lampe Hg-Xe de très forte puissance (5000 W, utilisée à 3500 W) avec des périodes d'irradiation variant de 0,3 à 0,5 s.

## 2 - Photo-CIDNP résolue dans le temps

La CIDNP est un phénomène dynamique, dépendant du temps. L'intensité observée d'un signal résulte d'un équilibre dynamique entre la polarisation nucléaire créée et sa destruction due aux processus de relaxation ou à des réactions chimiques secondaires. Ceci peut conduire, comme nous l'avons déjà mentionné plus haut, à une annulation parfaite de certains effets (schéma 2, réactions (6), (7), (8) ou (9)) et rendre délicate une étude cinétique par exemple. Cependant, ces effets se produisent sur une échelle de temps de plusieurs dizaines de  $\mu$ s, alors que les réactions de recombinaison se font en général en une fraction de  $\mu$ s. Il suffit alors, pour mesurer les polarisations provenant de ces dernières, d'enregistrer le spectre le plus rapidement possible après la création de la paire par un éclair laser. C'est le principe de la photolyse éclair par laser à la différence que l'éclair excitateur et la détection optique sont respectivement remplacés par une impulsion de radiofréquence et une détection RMN du FID résultant.

ERNST et coll.<sup>50</sup> ont décrit des séquences impulsionnelles permettant ce type de mesures rendues possibles par l'apparition de spectromètres par transformation de Fourier. Ils ont ainsi pu observer des réactions secondaires lentes d'intermédiaires diamagnétiques avec une résolution de temps de  $2,5 \cdot 10^{-3}$  s. CLOSS et MILLER<sup>51</sup> ont différencié dans une réaction photochimique non cyclique des processus de recombinaison géminée des processus de phase aléatoire, ces derniers dépendant du temps avec une résolution de l'ordre de la microseconde. Cette valeur s'avère être la limite puisqu'elle est imposée par la durée de l'impulsion de radiofréquence permettant l'observation du signal. Encore est-elle atteinte au détriment du rapport signal/bruit puisqu'elle correspond souvent, sur des spectromètres à haut champ, à des angles de flip de moins de  $20^\circ$ . Néanmoins, les mêmes auteurs ont pu mesurer la cinétique d'états triplets et de biradicaux atteignant une résolution inférieure à la

$\mu\text{s}$  ( $\approx 100$  ns)<sup>52,53</sup> en utilisant une source de radiofréquence amplifiée<sup>54</sup>. BLÜMICH<sup>55</sup> a également décrit un dispositif expérimental permettant d'atteindre une résolution du même ordre.

La première application de cette technique à des molécules d'intérêts biologique a permis à CLOSS et SITZMANN<sup>12</sup> de déterminer les valeurs relatives des constantes de couplage hyperfin des radicaux cations de la chlorophylle et de quelques-uns de ses dérivés. KAPTEIN et coll.<sup>56</sup> ont montré que lors des réactions des flavines avec le tryptophane par exemple, l'impossibilité d'observer des polarisations sur les flavines était principalement due à la réaction de dismutation des radicaux flavinyles (schéma 2, réaction (9)) parmi les autres processus d'annihilation des polarisations de fuite et celles de recombinaison. Ils ont également étudié<sup>57</sup>, par cette technique, la photoréduction d'une flavine par le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). Ils en ont précisé le mécanisme et caractérisé d'importants intermédiaires radicalaires selon que la réaction était faite en présence ou en absence d'oxygène. Des simulations de spectre leur ont également permis de calculer les constantes de couplage hyperfin et le facteur de Landé de  $\text{NADH}^{\cdot+}$ .

Le processus expérimental permettant ces mesures peut être brièvement résumé de la façon suivante. L'échantillon placé à l'intérieur de la sonde de RMN est irradié par un éclair laser d'une durée de quelques centaines de ns. Cet éclair est suivi, après le délai désiré, d'une impulsion rf. Le FID résultant est enregistré et la séquence peut être renouvelée plusieurs fois si on désire une amélioration du rapport signal/bruit. La répétition de ces mesures à différents délais entre l'éclair et l'impulsion rf, donne l'évolution du spectre en fonction du temps. Les méthodes de présaturation ou par différence exposées plus haut, peuvent également être utilisées pour simplifier certains spectres.

#### IV - CONCLUSION

Sur la base de l'étude d'une réaction réversible de type I (radicalaire) de différents sensibilisateurs, la photo-CIDNP s'est avérée être un outil précieux pour l'identification de résidus de surface dans les protéines ou des acides nucléiques simple brin. Elle apporte également de grandes simplifications aux spectres RMN de ces macromolécules. Ces

simplifications peuvent cependant devenir dans certains cas une limitation de la méthode. Néanmoins, la mise au point de nouvelles techniques d'enregistrement des spectres a permis de reculer certaines des limites dans ce domaine, grâce en particulier à la photo-CIDNP résolue dans le temps. Bien qu'elle ne parviendra jamais aux valeurs atteintes par les techniques de détection optique (photolyse éclair U.V. à la femto-seconde), elle possède avec la RMN l'avantage des informations contenues dans un spectre de haute résolution : identification des produits et des intermédiaires de réaction, mécanismes réactionnels des radicaux libres, propriétés magnétiques et cinétique de ces radicaux.

D'autre part, la combinaison de la photo-CIDNP avec la RMN bidimensionnelle (2D)<sup>58</sup> et les séquences impulsionnelles afférentes, devrait permettre de mieux étudier le phénomène de polarisation transverse ("cross polarization") qui, comme nous l'avons vu, peut donner de nombreux renseignements d'ordre structural sur les protéines.

--oooOooo--

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

--0000000--

- 1) R.J. WURTMAN - *Scient. Amer.* 233, 68 (1975)
- 2) J.H. EPSTEIN - *The Science of Photobiology*, Ed. K.C. Smith, Plenum Press, New York, Ch. 7 (1977)
- 3) G.M.J. BEIJERSBERGEN Van HENEGOUWEN - *Trav. Soc. Pharm. Montpellier* 39, 149 (1979)
- 4) T.B. FITZPATRICK, M.A. PATHAK, L.C. HARBER, M. SEJI et A. KUKITA - *Sunlight and Man*, Ed. M.A. Pathak et al., Univ. Tokyo Press, Tokyo, Ch. 1 (1974)
- 5) J.D. SPIKES - *The Science of Photobiology*, Ed. K.C. Smith, Plenum Press, New York, Ch. 4 (1977)
- 6) M.A.J. RODGERS - *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*, Ed. R.V. Bensasson, G. Jori, E.J. Land et T.G. Truscott, Plenum Press, New York. Ser. A, NATO ASI Series, Vol. 85, p.181 (1985)
- 7) Pour une revue générale, voir la réf. précédente, volume complet.
- 8) a) I.E. KOICHEVAR - *Photochem. Photobiol.* 30, 437 (1979) - b) L.C. HARBER et R.L. BAER - *J. Invest. Dermatol.* 58, 327 (1972)
- 9) I.E. KOICHEVAR - *J. Invest. Dermatol.* 76, 59 (1981)
- 10) M. TOMKIEWICZ et M.P. KLEIN - *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 143 (1973)
- 11) A.A. LAMOLA, M.L. MANION, H.D. ROTH et G. TOLLIN - *Ibid.* 72, 3265 (1975)
- 12) G.L. CLOSS et E.V. SITZMAN - *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 3217 (1981)
- 13) K. MARUYAMA, H. FURUTA et T. OTSUKI - a) *Chemistry Letters* 857 (1980) - b) *Ibid.*, 1025 (1981) - c) *Ibid.*, 1509 (1981) - d) *Ibid.*, 709 (1981) - e) *Ibid.*, 845 (1983) - f) *Ibid.*, 847 (1983)
- 14) a) R. KAPTEIN - *Spectroscopy in Molecular Biology*, Ed. B. Pullman, D. Reidel, Dordrecht, Pays-Bas, p 211 (1978) - b) R. KAPTEIN, K. DIJKSTRA et K. NICOLAY - *Nature* 274, 293 (1978)

- 15) K.A. MUSZKAT - *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 872 (1977)
- 16) a) P.J. HORE et R. KAPTEIN - *NMR Spectroscopy : New Methods and Applications*, Ed. G.C. Levy, Amer. Chem. Soc., Washington D.C., p 285 (1982) - b) F. MÜLLER, C.G. VAN SCHAGEN et R. KAPTEIN - *Methods in Enzymology* 66, 385 (1980)
- 17) K.A. MUSZKAT et C. GILON - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 79, 1059 (1977)
- 18) K.A. MUSZKAT et C. GILON - *Nature* 271, 685 (1978)
- 19) E.F. Mc CORD, R.R. BUCKS et S.G. BOXER - *Biochemistry* 20, 2880 (1981)
- 20) K.A. MUSZKAT, M. WEINSTEIN et C. GILON - *Biochem. J.* 173, 993 (1978)
- 21) a) G.J. GARSSEN, R. KAPTEIN, J.G.G. SCHOENMAKERS et C.W. HILBERS *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 5281 (1978) - b) C.W. HILBERS, G.J. GARSSEN, R. KAPTEIN, J.G.G. SCHOENMAKERS et J.H. VAN BOOM - *NMR Spectroscopy in Molecular Biology*, Ed. B. Pullman, D. Reidel, Dordrecht, Pays-Bas, p. 351 (1978)
- 22) a) E.H.J.M. JANSEN, H. MEYER, G.H. DE HAAS et R. KAPTEIN - *J. Biol. Chem.* 253, 6346 (1978) - b) E.H.J.M. JANSEN, G.J.M. VAN SCHARRENBURG, A.J. SLOTBOOM, G.H. DE HAAS et R. KAPTEIN - *J. Amer. Chem. Soc.* 101, 7397 (1979) - c) M.R. EGMOND, A.J. SLOTBOOM, G.H. DE HAAS, K. DIJKSTRA et R. KAPTEIN - *Biochim. Biophys. Acta* 623, 461 (1980)
- 23) a) B.G.J.M. BOLSCHER, J.A. LENSTRA et R. KAPTEIN - *J. Magn. Reson.* 35, 163 (1979) - b) J.A. LENSTRA, B.G.J.M. BOLSCHER, S. STOB, J.J. BEINTEMA et R. KAPTEIN - *Eur. J. Biochem.* 98, 385, (1979)
- 24) P.J. HORE et R. KAPTEIN - *Biochemistry* 22, 1906 (1983)
- 25) A. DE MARCO, E. MENEGATTI et M. GUARNERI - *Febs Letters* 159, 201 (1983)
- 26) a) C.G. VAN SCHAGEN, F. MÜLLER et R. KAPTEIN - *Biochemistry* 21, 402 (1982) - b) C.T.W. MOONEN, P.J. HORE, F. MÜLLER, R. KAPTEIN et S.G. MAYHEW - *Febs Letters* 149, 141 (1982)
- 27) P. CANIONI, P.J. COZZONE et R. KAPTEIN - *Ibid.* 111, 219 (1980)
- 28) J. FEENEY, G.C.K. ROBERTS, R. KAPTEIN, B. BIRDSALL, A. GRONENBORN et A.S.V. BURGEM - *Biochemistry* 19, 2466 (1980)
- 29) H.J. VOGEL - *Ibid.* 22, 668 (1983)
- 30) P.J. COZZONE et R. KAPTEIN - *Febs Letters* 155, 55 (1983)
- 31) K.A. MUSZKAT, I. KHAIT, K. HAYASHI et N. TAMIYA - *Biochemistry* 23, 4913 (1984)

- 32) L.J. BERLINER et R. KAPTEIN - *J. Biol. Chem.* 255, 3261 (1980)
- 33) K.A. MUSZKAT, I. KHAIT et S. WEINSTEIN - *Biochemistry* 23, 5 (1984)
- 34) A. DE MARCO, L. ZETTA, E. FIORETTI et F. ASCOLI - *Gaz. Chim. Ital.* 115, 49 (1985)
- 35) W.H. GARNER, A. SPECTOR, T. SCHLEICH et R. KAPTEIN - *Current Eye Res.* 3, 127 (1984)
- 36) R. KAPTEIN et P. WYETH - *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 538 (1980)
- 37) Y. NISIMOTO, F. HAYASCHI, H. AKATSU, Y. KYOGOKU et Y. SHIBATA - *J. Biol. Chem.* 259, 2480 (1984)
- 38) M.T. HINCKE, B.D. SYKES et C.M. KAY - *Biochemistry* 20, 4185 (1981)
- 39) K.A. MUSZKAT, S. WEINSTEIN, I. KHAIT et M. VERED - a) *Ibid.* 21, 3775 (1982) - b) *Biopolymers* 22, 387 (1983)
- 40) P.J. HORE, M.R. EGMOND, H.T. EDZES et R. KAPTEIN - *J. Magn. Reson.* 49, 122 (1982)
- 41) a) L. ZETTA, P.J. HORE et R. KAPTEIN - *Eur. J. Biochem.* 134, 371 (1983) - b) L. ZETTA, R. KAPTEIN et P.J. HORE - *Febs Letters* 145, 277 (1982)
- 42) A. DE MARCO, L. ZETTA et R. KAPTEIN - *Eur. Biophys. J.* 11, 187 (1985)
- 43) H.J. VOGEL et B.D. SYKES - *J. Magn. Reson.* 59, 197 (1984)
- 44) C.L. LERMAN et M. COHN - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97, 121 (1980)
- 45) K.A. JACOBSON, K.A. MUSZKAT et I. KHAIT - *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1384 (1983)
- 46) S. STOB, N. RUSSO et R. KAPTEIN - *Gazz. Chim. Ital.* 115, 249 (1985)
- 47) a) R. KAPTEIN, K. NICOLAY et K. DIJKSTRA - *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1092 (1979) - b) R.M. SCHEEK, S. STOB, T. SCHLEICH, N.C.M. ALMA, C.W. HILBERS et R. KAPTEIN - *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 5930 (1981) - c) T. SCHLEICH, R.M. SCHEEK, S. STOB, N.C.M. ALMA, C.W. HILBERS et R. KAPTEIN - *Photochem. Photobiol.* 35, 575 (1982)
- 48) a) E.F. Mc CORD, K.M. MORDEN, A. PARDI, I. TINOCCO, Jr. et S.G. BOXER - *Biochemistry* 23, 1926 (1984) - b) E.F. Mc CORD, K.M. MORDEN, I. TINOCCO, Jr. et S.G. BOXER - *Ibid.*, 1935
- 49) R. KAPTEIN, K. DIJKSTRA, F. MÜLLER, C.G. VAN SCHAGEN et A.J.W.G. VISSER - *J. Magn. Reson.* 31, 171 (1978)

- 50) S. SCHÄUBLIN, A. WOKAUN et R.R. ERNST - *Ibid.* 27, 273 (1977)
- 51) G.L. CLOSS et R.J. MILLER - *J. Amer. Chem. Soc.* 101, 1639 (1979)
- 52) G.L. CLOSS et R.J. MILLER - *Ibid.* 103, 3586 (1981)
- 53) G.L. CLOSS et O.D. REDWINE - *Ibid.* 107, 4543 (1985)
- 54) R.J. MILLER et G.L. CLOSS  
*Rev. Scient. Instrum.* 52, 1876 (1981)
- 55) B. BLÜMICH - *Mol. Phys.* 51, 1283 (1984)
- 56) P.J. HORE, E.R.P. ZUIDERWEG, R. KAPTEIN et K. DIJKSTRA - *Chem. Phys. Letters* 83, 376 (1981)
- 57) P.J. HORE, A. VOLBEDA, K. DIJKSTRA et R. KAPTEIN - *J. Amer. Chem. Soc.* 104, 6262 (1982)
- 58) R.M. SCHEEK, S. STOB, R. BOELEN, K. DIJKSTRA et R. KAPTEIN - a) *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 78, 245 (1984) - b) *J. Amer. Chem. Soc.* 107, 705 (1985)

--0000000--

--oooOooo--

### CHAPITRE III

--oooOooo--

## LES PHENOTHIAZINES

--oooOooo--

Depuis leur introduction dans les années cinquante, les dérivés phénothiaziniques possédant une chaîne N-alkylaminée latérale sont couramment utilisés en médecine pour le traitement de troubles psychiques, d'allergies ou de nausées. Cependant, il est apparu que certains patients auxquels on administrait des doses élevées pendant une durée prolongée présentaient une photosensibilisation cutanée exagérée. D'autres effets secondaires induits par la lumière sont également observés, comme des opacités de la cornée et du cristallin, des altérations au niveau des globules rouges ou des problèmes d'ordre photo-mutagène par exemple.

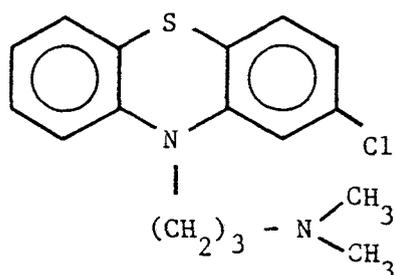
Afin d'expliquer cette activité photobiologique indésirable, on a entrepris de nombreux travaux relatifs au comportement photochimique de ce type de médicaments et en particulier du plus répandu d'entre eux: la chlorpromazine. Tous s'accordent à reconnaître la complexité de cette étude.

Nous rappellerons tout d'abord les principales conclusions dans ce domaine, puis nous exposerons nos résultats en précisant l'apport de la CIDNP dans l'approche du comportement photochimique de solutions aqueuses de dérivés phénothiaziniques, seuls ou en présence de différentes bases des acides nucléiques et de leurs nucléotides.

## A - PRINCIPAUX RESULTATS EN PHOTOCHEMIE

### I - LA CHLORPROMAZINE

La chlorpromazine (CPZ) ou chloro-2(diméthylamino-3propyl)-10 phénothiazine est en général utilisée sous forme de son chlorhydrate, (CPZ,HCl), souvent pour des raisons de solubilité.



CPZ ( $M=318,5 \text{ g.mol}^{-1}$ )

Sa photochimie est fortement influencée par la nature du solvant utilisé ainsi que par la présence d'oxygène.

#### 1 - Solutions aqueuses

L'irradiation prolongée d'une solution aqueuse de CPZ en présence d'oxygène conduit à la formation d'une douzaine de produits au minimum dont très peu ont été identifiés<sup>1</sup>. Parmi ceux-ci, le sulfoxyde de chlorpromazine (CPZ-SO) est le plus aisément décelable<sup>1-7</sup>. D'autres dérivés ont été proposés comme le nitroxyde de chlorpromazine (CPZ-NO)<sup>1</sup>, la promazine (PRO)<sup>1,7</sup>, l'hydroxy-2 promazine(OH-PRO)<sup>5,7</sup> par exemple.

En absence d'oxygène, l'irradiation de CPZ conduit à la promazine, l'hydroxy-2 promazine, des dimères ainsi qu'à des polymères<sup>8</sup>. La formation de ces polymères ne semble pas avoir lieu aux faibles concentrations de CPZ ( $\leq 0,15 \text{ mM}$ )<sup>7,9</sup>.

Les espèces réactives le plus souvent invoquées au cours de ces réactions sont : l'état excité triplet ( $^3\text{CPZ}$ ), le radical cation  $\text{CPZ}^{\cdot+}$  et des radicaux libres (dont celui de la promazine). Elles ont été mises en évidence par photolyse éclair<sup>10</sup> ainsi que par spectroélectrochimie<sup>6</sup>.

Le radical cation pourrait être le précurseur du sulfoxyde dont l'oxygène proviendrait de l'oxygène dissous<sup>3,4</sup> et non du solvant<sup>1,9</sup>.

Il apparaît aussi clairement qu'une rupture de la liaison C-Cl est un processus important. La photoréaction s'accompagne en effet toujours d'une baisse importante du pH correspondant à la libération de chlorure d'hydrogène. Bien connus pour d'autres systèmes chloroaromatiques, deux mécanismes semblent conduire à cette déshalogénéation. L'un implique une rupture homolytique, l'autre un transfert d'électron. Il semble que dans le cas de CPZ la seconde voie soit concernée et qu'un radical anion de CPZ soit ainsi intermédiairement formé. Ce radical anion pourrait résulter soit d'un transfert intramoléculaire entre la chaîne alkylaminée latérale et le noyau aromatique<sup>11</sup>, soit d'une réaction entre une molécule de CPZ et un électron hydraté, formé lors de la photoionisation de CPZ<sup>10,14</sup>. Par perte de l'ion chlorure, ce radical anion conduirait au radical libre de la promazine. Ce processus semble être particulièrement efficace dans les micelles<sup>12</sup>.

On peut encore mentionner la détection de radicaux hydroxyles ( $\text{OH}\cdot$ ) lors de la photolyse de CPZ<sup>13</sup>. DAVIES et al.<sup>14</sup> ont montré par radiolyse pulsée que ces radicaux pouvaient ensuite réagir avec CPZ pour conduire soit au radical cation, soit à la formation de radicaux libres de type cyclohexadiényles, soit à l'arrachement d'un atome d'hydrogène sur le  $-\text{CH}_2$  en position  $\alpha$  de l'azote hétérocyclique.

Les principales réactions invoquées dans ce paragraphe sont regroupées sur la figure 1. Parmi les problèmes controversés, on peut en citer deux, particulièrement :

- Le précurseur de la photoionisation : s'agit-il de l'état excité singulet, du premier état triplet ou d'un état triplet supérieur<sup>10,15</sup> ?

- Le rôle de l'oxygène : sa présence entraîne-t-elle la formation d'oxygène singulet, d'ion superoxyde par transfert d'électron ou la création d'un exciplexe entre CPZ et  $\text{O}_2$ <sup>3,4,12,15,16</sup> ?

## 2 - Solutions non aqueuses

Bien que la photoréaction de CPZ dans les alcools ou d'autres solvants organiques semble être plus simple<sup>17</sup>, le nombre des travaux qui lui ont été consacrés est très restreint, les solvants non aqueux traduisant

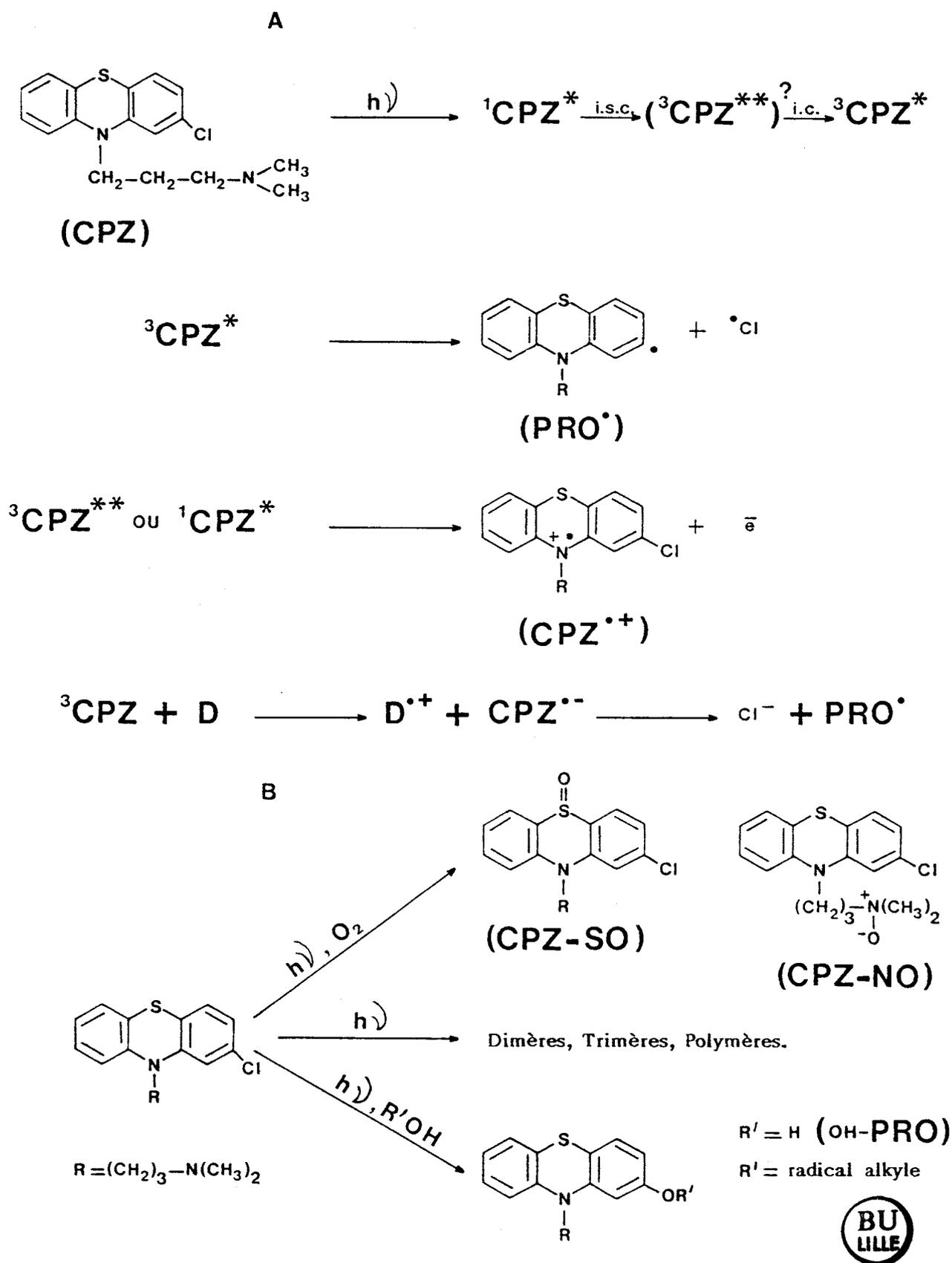


Figure 1

Principaux intermédiaires (A) et produits formés (B) lors de la photolyse de la chlorpromazine d'après les données de la littérature. D = Donneur d'électrons.

mal la réalité "biologique". Des études en solvants binaires (eau + solvant organique) ont montré l'influence de la proportion d'eau sur le rendement de la photoionisation de CPZ, ainsi que celle de l'oxygène<sup>9,10,15</sup>. Dans les alcools, on observe surtout une rupture de la liaison C-Cl conduisant à la formation de promazine et d'adduits avec le solvant.

Dans une solution dégazée de propanol-2, suite à la rupture homolytique de C-Cl à partir de l'état triplet de CPZ, il se forme de la promazine, de l'isopropoxy-promazine, du chlorure d'hydrogène et de l'acétone. En présence d'oxygène, aucune modification n'est observable à cause d'un transfert d'énergie entre <sup>3</sup>CPZ et l'oxygène conduisant à la formation d'oxygène singulet.

Dans le méthanol, en présence d'un sensibilisateur (rose de bengale ou bleu de méthylène) CPZ inhibe efficacement l'oxygène singulet<sup>18</sup>. Le principal résultat de cette interaction est la rupture de la chaîne N-alkylaminée latérale. En absence de photosensibilisateur, la réaction de CPZ avec le méthanol conduit à la promazine et à la méthoxy-2 promazine par 2 voies différentes : l'une radicalaire, l'autre ionique<sup>19</sup>.

Récemment, l'utilisation d'une technique particulière de spectrométrie de masse<sup>20</sup> a permis de déceler à côté des produits couramment décrits (PRO ou 2-OH-PRO) des produits de réaction sur la chaîne latérale de CPZ.

## II - IMPLICATIONS BIOLOGIQUES

CPZ est à la fois impliquée dans des processus photoallergiques et phototoxiques. La phototoxicité de la chlorpromazine se manifeste par les deux mécanismes, direct et indirect<sup>21</sup>, décrits au chapitre II.

Le mécanisme direct semble mettre en cause principalement le radical cation CPZ<sup>•+</sup>. En effet, celui-ci pourrait être impliqué à la fois dans le métabolisme, l'activité et la phototoxicité du médicament. Il est relativement stable et interagit fortement avec les macromolécules (en particulier l'ADN)<sup>22</sup> et les membranes biologiques. La chlorpromazine forme également des photoadduits avec les protéines<sup>23</sup> ; mais dans ce cas, il semblerait que des radicaux libres résultant de la déchloruration

de CPZ soient en cause.

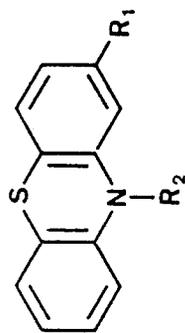
CPZ peut également se révéler toxique par l'intermédiaire de certains de ses photoproduits stables (dimères, polymères, sulfoxyde, ...) et à un degré moindre par celui de l'oxygène singulet (les autres espèces oxygène activé n'ont pas été caractérisées). Ce mécanisme indirect est responsable de la photolyse des globules rouges<sup>7</sup>, de la formation de certains adduits covalents avec l'ADN (voir plus loin), des interactions avec les phospholipides<sup>24</sup> et même de troubles oculaires<sup>25</sup>.

D'autre part, il est également évident que la formation de chlorure d'hydrogène lors de la photoréaction de CPZ joue un rôle important dans les effets secondaires de ce médicament. Ce rôle est à la fois lié à la toxicité propre de ce composé et à son influence sur le pH du milieu. Les propriétés mutagènes et cancérigènes sont en effet amplifiées aux valeurs de pH acide<sup>26</sup>.

Les références bibliographiques citées dans ce paragraphe sont volontairement limitées à certains des travaux les plus récents sur le sujet. Le lecteur plus intéressé par l'aspect biologique du problème pourra consulter celles qui sont citées dans les articles mentionnés ainsi que la référence 21 pour une documentation plus ample sur les travaux antérieurs à 1981.

## B - PHOTO-CIDNP <sup>1</sup>H et <sup>13</sup>C DE QUELQUES PHENOTHIAZINES

Les formules des différentes phénothiazines que nous avons utilisées et quelques-uns de leurs paramètres physiques sont donnés respectivement dans les tableaux I et II. Dans un premier temps, nous avons étudié leur photoréaction principalement en solution aqueuse, puis nous avons comparé leurs comportements respectifs en présence de bases des acides nucléiques ainsi que de leurs nucléotides et nucléosides, l'ADN semblant être comme nous venons de le voir, une cible privilégiée de ces molécules.



COMPOSE	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	SEL
Chlorpromazine	-Cl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Chlorhydrate
Chlorproéthazine	-Cl	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	"
Promazine	-H	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	"
Prométhazine	-H	-CH <sub>2</sub> -CH-N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   CH <sub>3</sub>	"
Triflupromazine	-CF <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	"
Fluphénazine	-CF <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH)	"
Thioridazine	-SCH <sub>3</sub>	-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - 	"
Chloro-2 N-méthyl phénothiazine	-Cl	-CH <sub>3</sub>	"
Méthopromazine	-OCH <sub>3</sub>	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Maléate
Alimémazine	-H	-CH <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   CH <sub>3</sub>	Tartrate
Aminopromazine	-H	-CH <sub>2</sub> -CH-CH <sub>2</sub> -N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>   N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Fumarate

TABLEAU I : Formules des différentes phénothiazines étudiées.

COMPOSE	U.V. 27,28		$\phi_{\text{Fluor.}}^{29}$	$\phi_{\text{Phosph.}}^{29}$	$\tau_{\text{T}}^{29-a}$ ns	$g^b$	58-c $E_{\text{OX}}$ (V/SCE)
	$\lambda_{\text{max}}$ (nm)	log $\epsilon$					
Chlorpromazine	206	4,45	0,004	0,57	55	2,0056 <sup>66</sup>	0,68
	256	4,55					
	310	3,65					
Chlorproéthazine	207						
	255						
	307						
Promazine	205	4,43	0,007	0,69	55	2,0053 <sup>69</sup>	0,58
	254	4,51					
	306	3,64					
Prométhazine	205	4,42	0,008	0,73	56		
	253	4,49					
	304	3,61					
Triflupromazine	255		0,011	0,80	47		0,75
	305						
Fluphénazine	206	4,37	0,010	0,54	50		
	260	4,52					
	312	3,59					
Thioridazine	260		0,005	0,95	47		
	320						
Chloro-2 N-méthyl Phénothiazine	258	4,78	0,002	0,22	43		
	322	3,84					
Méthopromazine	210	4,62	0,009	0,66	45		0,55
	253	4,43					
	307	3,69					
Alimémazine	206	4,29				2,0053 <sup>70</sup>	
	255	4,57					
	306	3,71					
Aminopromazine	260		0,006	0,74	58		
	310						

TABLEAU II : Quelques paramètres physico-chimiques des phénothiazines. a) Durée de vie de l'état triplet - b) Facteurs de Landé des radicaux cations - c) Potentiels d'oxydation.



## I - LA CHLORPROMAZINE

### 1 - Résultats

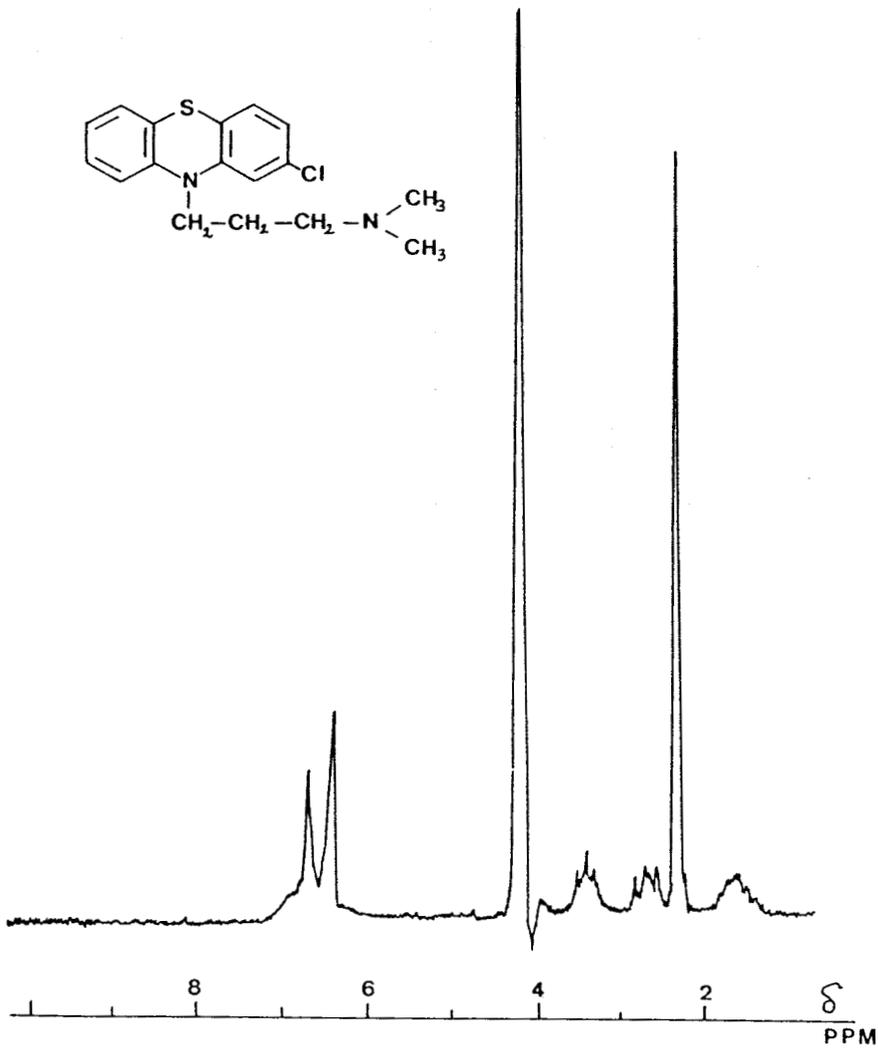
Les résultats obtenus avec ce composé en solution aqueuse sont tout-à-fait particuliers par rapport aux autres dérivés<sup>30</sup>.

La figure 2 montre les spectres  $^1\text{H}$  obtenus avant et pendant irradiation d'une solution de chlorhydrate de chlorpromazine (0,05 M) dans  $\text{D}_2\text{O}$ . Des polarisations apparaissent à la fois sur le produit de départ (CPZ), le solvant (HDO) et trois nouveaux composés (I, II et III) formés au cours de la photoréaction. Si l'irradiation n'est pas trop longue, le spectre obtenu après extinction de la source lumineuse est identique au spectre de départ ; sinon CPZ est progressivement dégradée. Ainsi on peut remarquer principalement les effets de CIDNP sur :

- les protons de la chaîne latérale de CPZ et les protons aromatiques. On notera que le signal ( $\delta = 2,3$  ppm) correspondant aux groupements méthylés portés par l'azote exocyclique, n'est pas polarisé.
- un triplet (A) à  $\delta = 4,9$  ppm provenant de I,
- une raie (E) à  $\delta = 6$  ppm provenant de II,
- un singulet (A) à  $\delta = 9,3$  ppm provenant de III,
- une forte polarisation (E) sur le signal de l'eau (HDO) à  $\delta = 4,10$  ppm.

Lorsque le même spectre est enregistré en  $^{13}\text{C}$  (fig. 3) on retrouve en particulier deux signaux en émission correspondant à deux carbones des composés I et III précédemment mentionnés. Les polarisations sur les atomes de C de CPZ, HCl sont plus délicates à interpréter. L'acquisition du spectre nécessite en effet plusieurs accumulations prolongeant le temps d'irradiation. Une grande partie du réactif est ainsi consommée. Les carbones aromatiques sont très perturbés ( $\delta = 115$  à  $150$  ppm) ainsi que les  $\text{CH}_2$ - $\beta$  ( $\delta = 22,7$  ppm) et - $\alpha$  ( $\delta = 44,9$  ppm) de la chaîne aliphatique latérale. Nous avons également remarqué qu'en ajoutant quelques gouttes de méthanol à la solution aqueuse de CPZ, HCl, les spectres obtenus (cf fig. 4 pour  $^1\text{H}$  et fig. 5 pour  $^{13}\text{C}$ ) pendant irradiation, nous permettaient d'observer l'apparition d'un signal polarisé supplémentaire par rapport aux spectres précédents. Ce nouveau signal

A



B

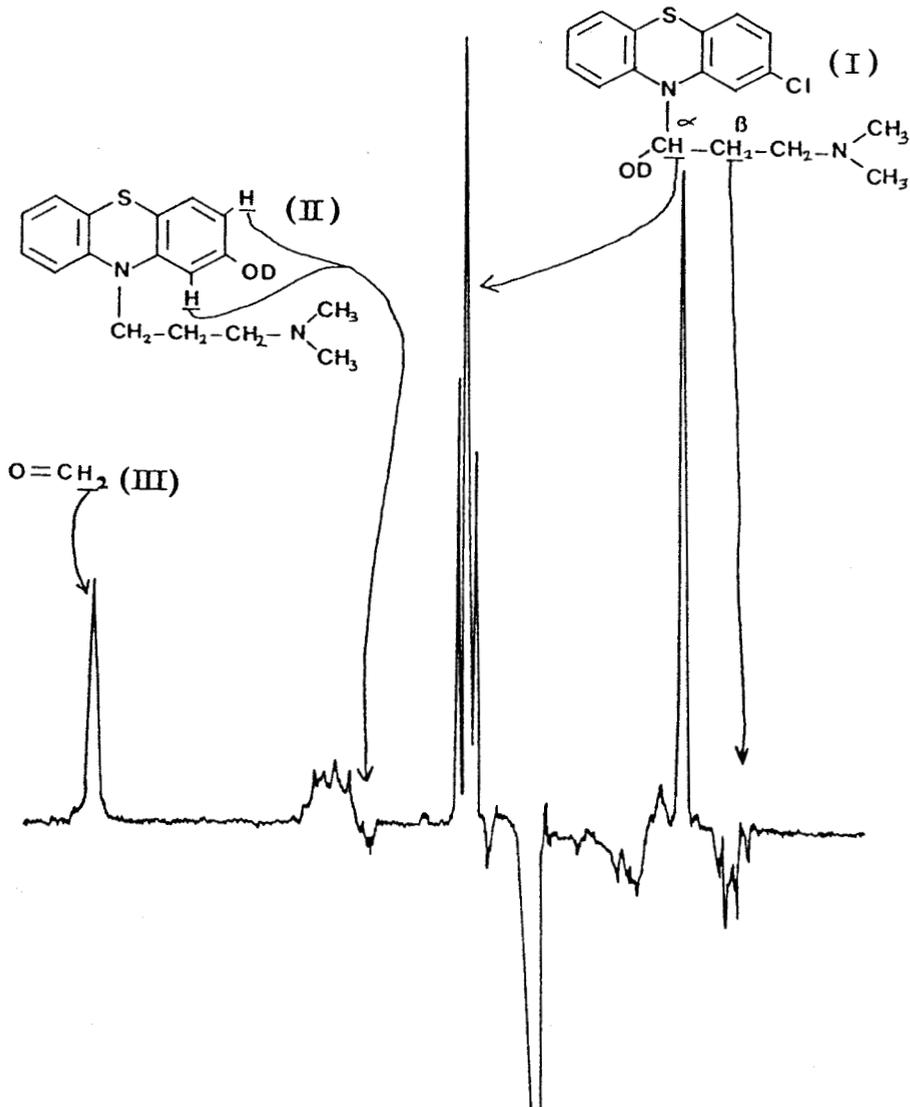


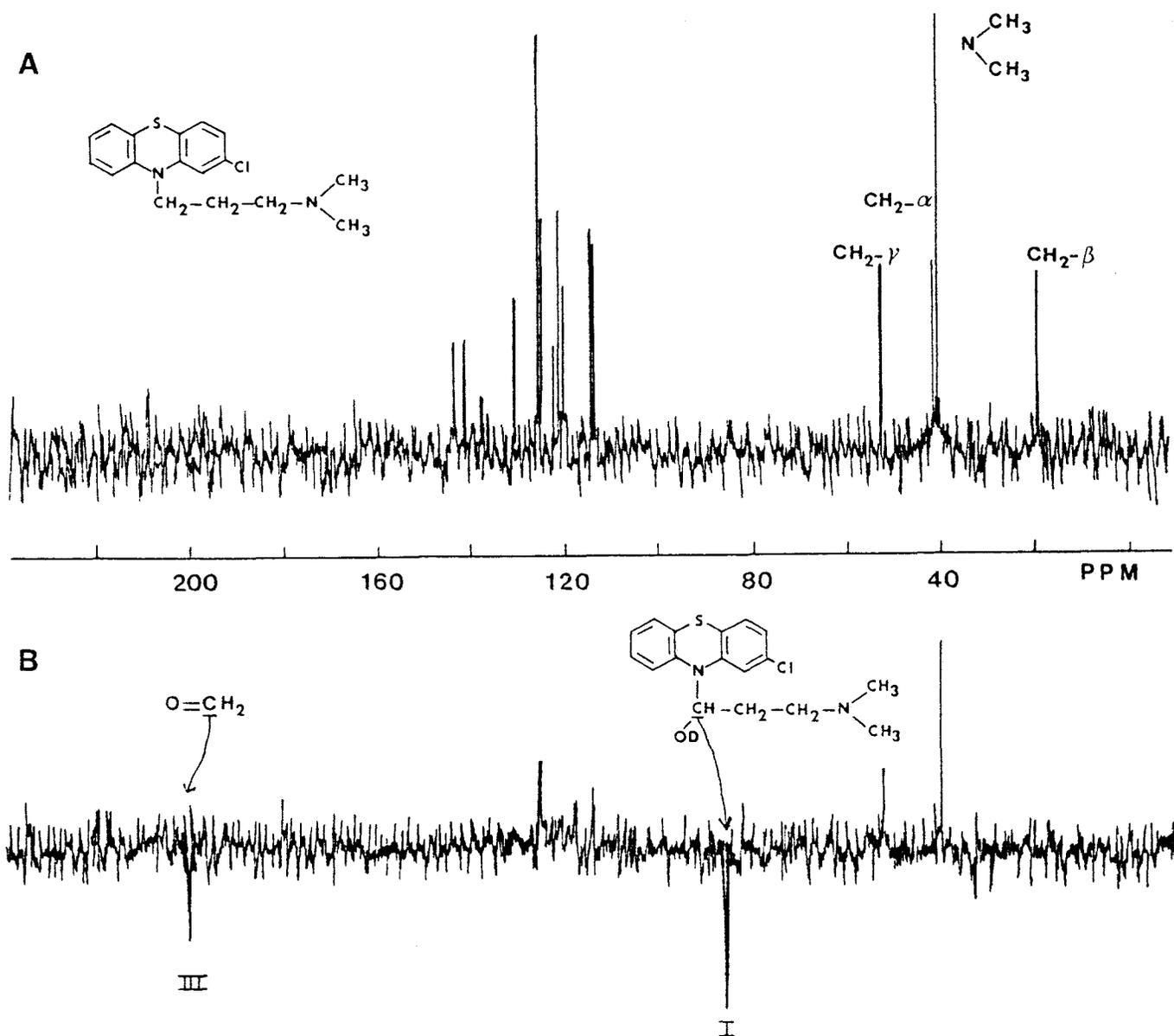
Figure 2

Spectre CIDNP -  $^1\text{H}$  : CPZ +  $\text{D}_2\text{O}$ 

A - avant irradiation

B - pendant irradiation





**Figure 3**

Spectre CIDNP -  $^{13}\text{C}$  (découplage large-bande) : CPZ +  $\text{D}_2\text{O}$  .

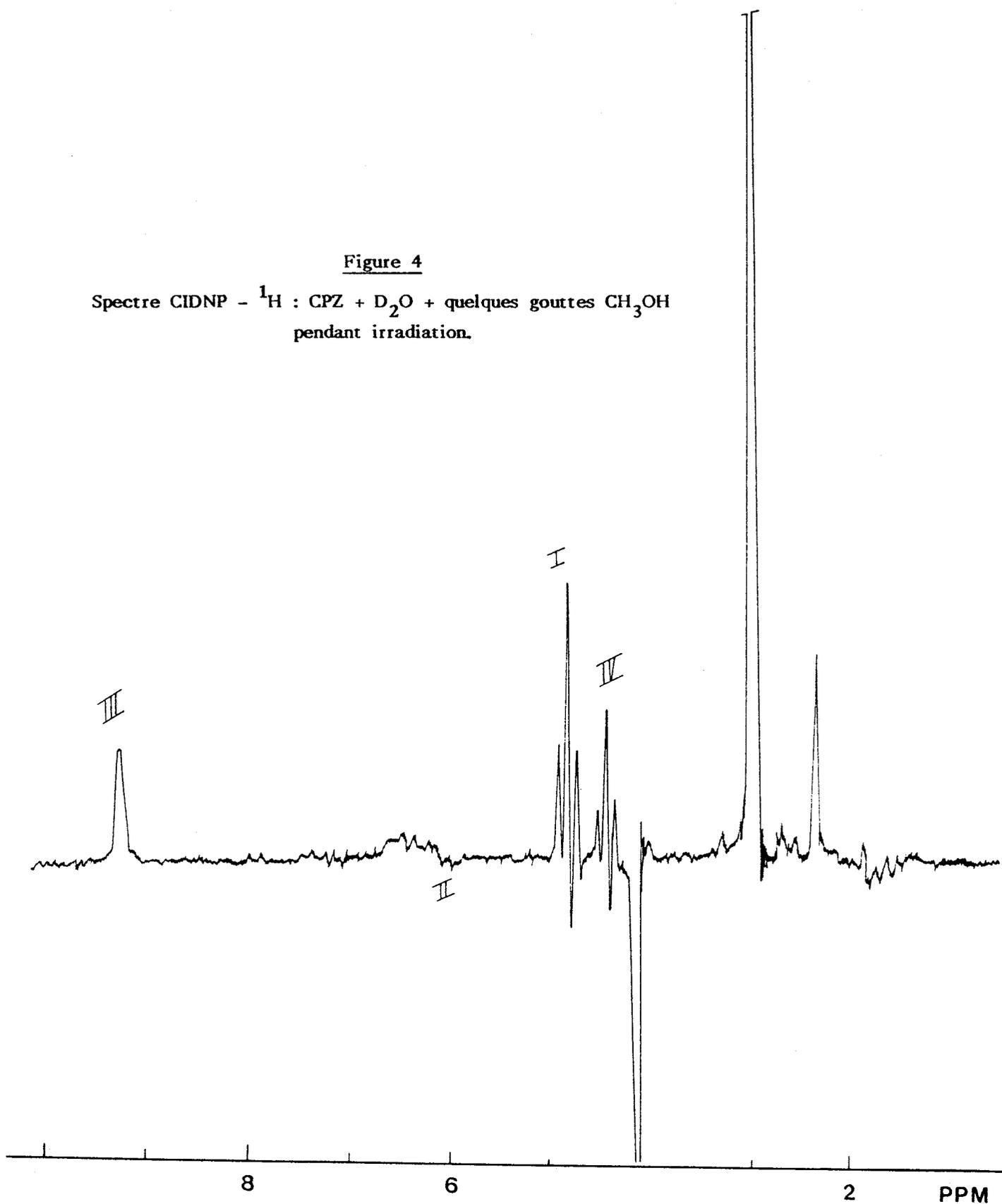
A : avant irradiation .

B : pendant irradiation .



Figure 4

Spectre CIDNP -  $^1\text{H}$  : CPZ +  $\text{D}_2\text{O}$  + quelques gouttes  $\text{CH}_3\text{OH}$   
pendant irradiation.



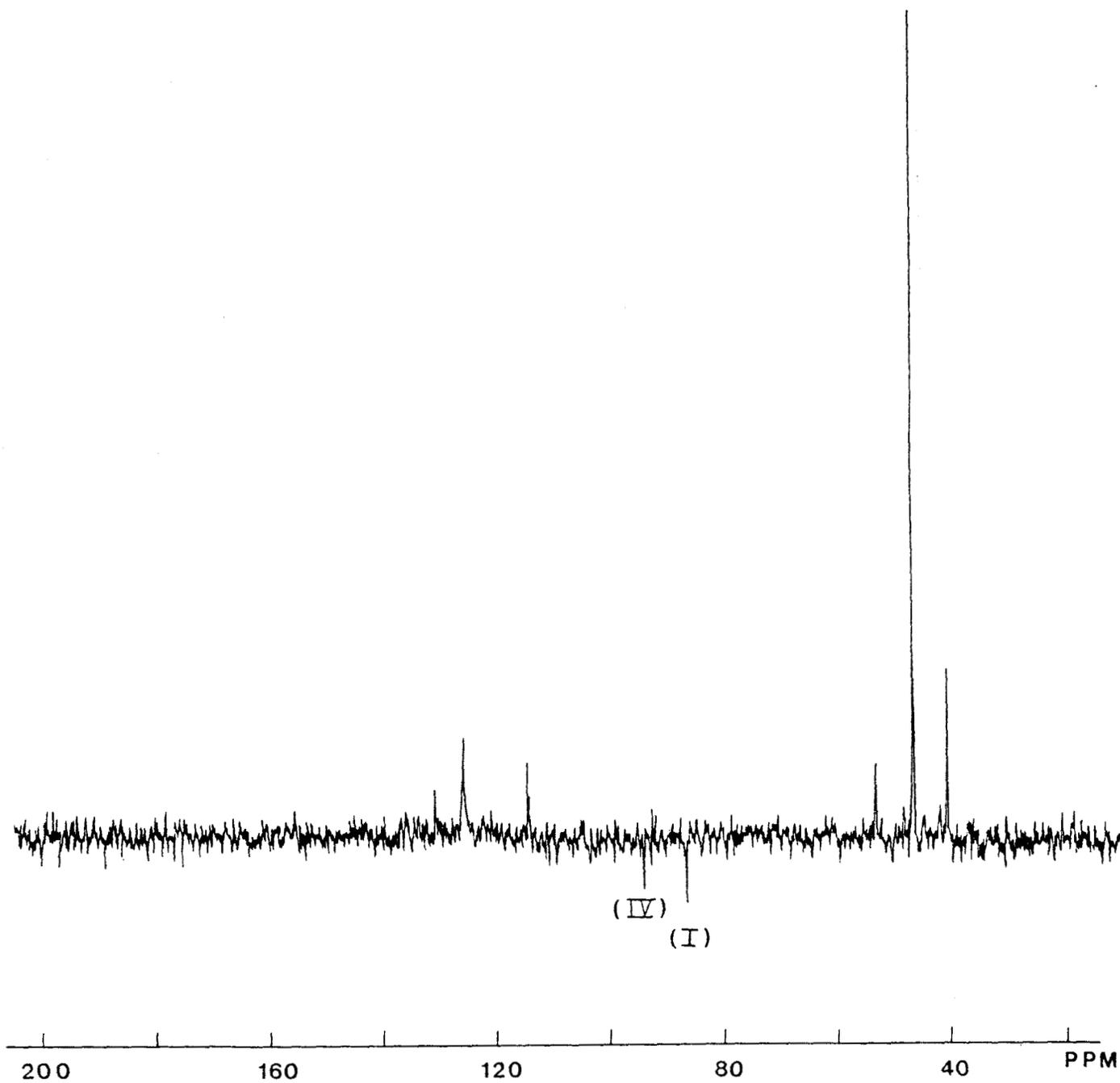


Figure 5

Spectre CIDNP -  $^{13}\text{C}$  (découplage large bande) pendant irradiation.

CPZ +  $\text{D}_2\text{O}$  + quelques gouttes  $\text{CH}_3\text{OH}$ .



apparaît en RMN du  $^1\text{H}$  sous forme d'un triplet (A ;  $\delta = 4,5$  ppm ; fig. 4) semblable à celui du composé I. En  $^{13}\text{C}$  (fig. 5), l'équivalent de ce signal montre de l'émission ( $\delta = 93,7$  ppm) dans la région du spectre où l'on observe le carbone appartenant à I. Cette double analogie nous fait attribuer ces signaux à un même composé IV dont la structure serait très voisine de celle de I. Si l'on remplace le méthanol par quelques gouttes d'éthanol ou d'isopropanol, le triplet de IV en RMN du  $^1\text{H}$  est remplacé par un signal ayant les mêmes multiplicité et polarisation, un déplacement chimique voisin, mais une intensité plus faible.

Hormis pour des raisons de solubilité (la chlorpromazine et les autres dérivés utilisés étant principalement commercialisés sous forme de sels) le choix de l'eau comme solvant correspond évidemment aux implications biologiques des composés étudiés. D'autre part, quand il est irradié dans des solvants organiques tels que l'acétonitrile, l'acétone ou le benzène, CPZ,HCl ne montre plus aucun effet de CIDNP. Néanmoins dans le méthanol- $\text{d}_4$ , il faut remarquer que le triplet correspondant aux protons méthyléniques en  $\alpha$  de la chaîne latérale de CPZ,HCl disparaît pendant irradiation et réapparaît lentement après l'extinction de la source lumineuse. On note également un effet d'élargissement (broadening) du signal correspondant aux protons méthyléniques en  $\beta$ . Par contre aucun produit nouveau (en particulier de substitution avec le solvant) n'est polarisé au cours de cette réaction.

Enfin, dans le chloroforme, le phénomène est plus complexe car il semble que, dans ce cas, l'espèce irradiée soit différente du fait de la coloration violette que prend la solution avant irradiation, laissant penser à une modification de CPZ,HCl.

L'eau s'est donc avérée comme étant de plus, le solvant permettant d'acquérir le plus d'informations sur la structure de produits de la dégradation photochimique primaire de CPZ,HCl. L'addition d'eau non deutériée, si elle masque une partie du spectre RMN- $^1\text{H}$ , ne modifie pas les effets de CIDNP obtenus dans  $\text{D}_2\text{O}$  pure. De même que l'irradiation de CPZ,HCl dans une solution 0,1 M de SSC (sel monosodé de l'acide citrique) donne des résultats similaires, permettant en particulier de retrouver les composés I et III.

La comparaison des comportements respectifs de CPZ,HCl et de la chlorpromazine base (CPZ) a été rendue difficile par l'insolubilité de cette dernière dans l'eau. Néanmoins, nous avons pu faire des essais dans

des mélanges binaires eau + solvant neutre vis-à-vis de la CIDNP comme par exemple l'acétonitrile ou éventuellement l'acétone. Dans de tels systèmes, les effets de CIDNP sur CPZ,HCl sont considérablement atténués au fur et à mesure que la proportion d'eau dans le mélange est réduite. Malheureusement dans les conditions où la solubilité de CPZ devient acceptable, cette proportion est peu importante. Le fait qu'aucun effet de CIDNP ne soit alors obtenu n'est donc pas forcément lié à un comportement différent de la base par rapport à son chlorhydrate. Dans l'acétonitrile ou le benzène purs, on n'observe toujours rien. Dans le méthanol pur enfin, le seul effet visible l'est sur le solvant, pour lequel le signal de OD montre de l'émission sans que l'on décèle d'effets sur CPZ, d'éventuels adduits ou d'effets comparables à ceux observés avec le chlorhydrate.

En dernier lieu, il convient de signaler qu'aucun des résultats exposés ci-dessus n'est affecté par un dégazage préalable des solutions et qu'ils sont donc indépendants de la présence ou non d'oxygène dans le milieu.

## 2 - Attribution des signaux

Le spectre de la figure 2a nous permet d'attribuer les différentes raies de CPZ,HCl dans D<sub>2</sub>O de la manière suivante :

- protons aromatiques : massif entre  $\delta = 6,3$  ppm et 7 ppm,
- méthyles de l'azote terminal de la chaîne latérale : singulet à  $\delta = 2,3$  ppm,
- méthylènes de la chaîne latérale : CH<sub>2</sub>- $\alpha$  , triplet à  $\delta = 3,4$  ppm ; CH<sub>2</sub>- $\beta$  , multiplet à  $\delta = 1,67$  ppm et CH<sub>2</sub>- $\gamma$  , doublet dédoublé à  $\delta = 2,7$  ppm.

Nous allons à présent exposer les critères d'attribution des signaux appartenant aux nouveaux composés formés au cours de l'irradiation (fig. 2b).

Composé I - Le triplet (A ;  $\delta = 4,9$  ppm) est celui du proton méthinique d'un dérivé de substitution d'un hydrogène du carbone en  $\alpha$  de la chaîne latérale de CPZ par le solvant (fig. 6). La valeur de la constante de couplage  $J_{H\alpha - H\beta}$  est d'environ 4,5 Hz. Le groupement

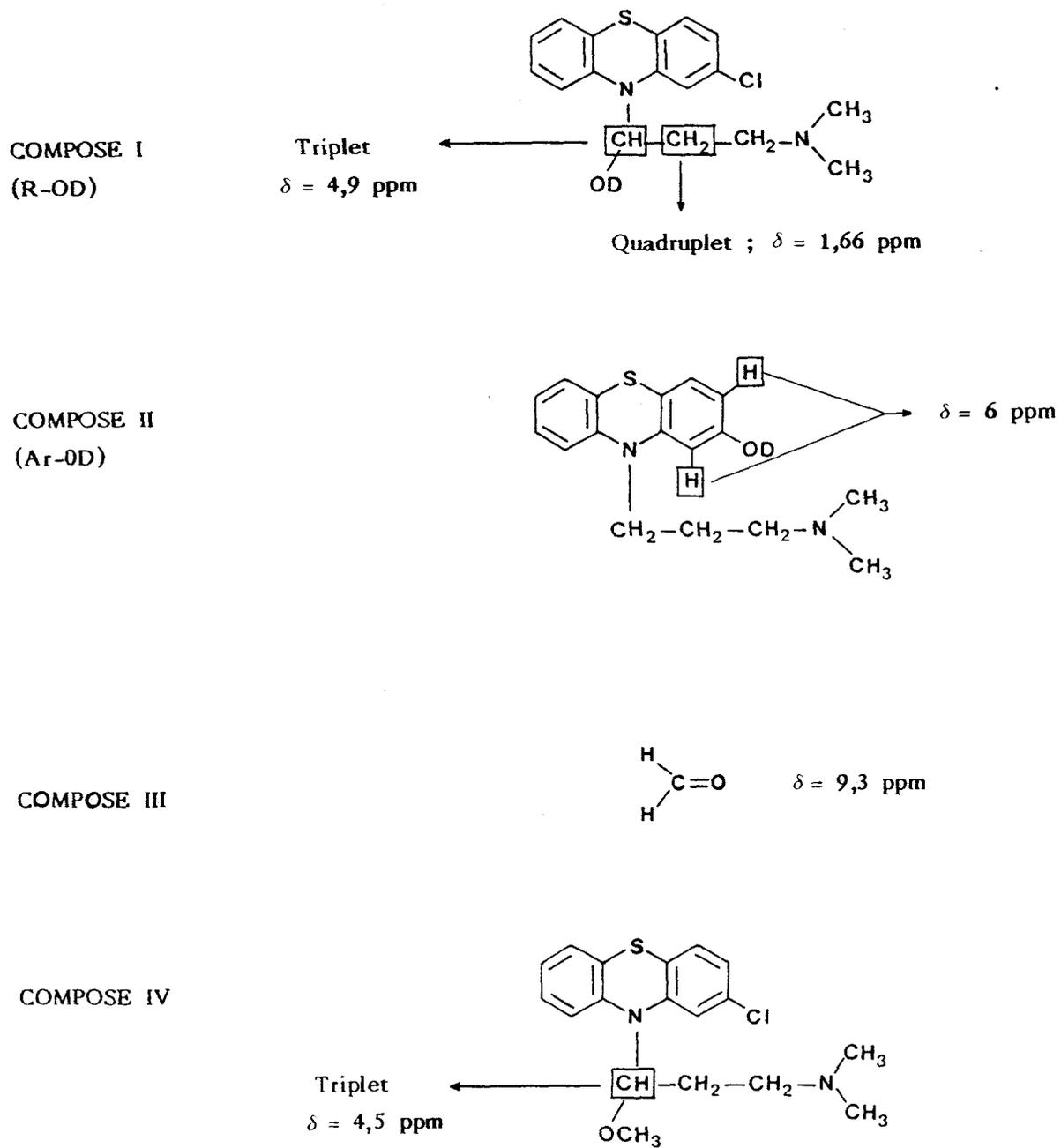


Figure 6

Formules des composés détectés par photo-CIDNP au cours de l'irradiation de CPZ en solution aqueuse.

méthylène en  $\beta$  de la chaîne latérale de ce composé I apparaît sous forme d'un quadruplet en émission à  $\delta = 1,66$  ppm. Ce quadruplet s'explique en admettant l'égalité des constantes de couplage  $J_{H\alpha-H\beta}$  et  $J_{H\beta-H\gamma}$ . Des expériences de découplage par double irradiation nous ont permis d'établir sans ambiguïté que ces deux signaux provenaient d'un même composé. En effet, lorsqu'on applique une radiofréquence de découplage correspondant à la fréquence de résonance du quadruplet ( $\nu_2 = 1508$  Hz) durant l'enregistrement du spectre de CIDNP, la seule modification provient du signal à  $\delta = 4,9$  ppm qui apparaît alors sous forme d'un singulet en absorption exaltée. Le phénomène est un peu moins net lorsque la fréquence de découplage concerne la fréquence de résonance du proton méthinique ( $\nu_2 = 1763$  Hz). L'intensité de la polarisation sur  $CH_2-\beta$  est en effet plus faible et d'autre part ce signal reste couplé avec  $CH_2-\alpha$ .

La nature du composé I nous est également suggérée par le spectre  $^{13}C$  (fig. 3b). Bien que ce spectre contienne moins d'informations que le spectre  $^1H$  pour les raisons exposées précédemment, il nous permet néanmoins de retrouver principalement deux signaux polarisés en émission. Il est raisonnable de penser qu'ils proviennent des atomes de carbone portant les protons dont les polarisations seraient les plus intenses. Pour le composé I, on devrait ainsi retrouver le signal du carbone en  $\alpha$  de l'azote hétérocyclique. Dans CPZ,HCl le glissement chimique de ce dernier est 44,9 ppm. La substitution d'un atome d'hydrogène par un groupement hydroxyle entraînerait son déplacement de 36 à 51 ppm vers les champs faibles, d'après les données de la littérature. Dans I son signal devrait donc se situer entre 81 et 96 ppm. De plus, d'après les règles de KAPTEIN (voir le paragraphe interprétation ci-dessous) sa polarisation devrait être inverse de celle du proton. Nous trouvons effectivement un signal en émission à  $\delta = 86,4$  ppm correspondant à cette description.

Un autre argument nous permet encore d'identifier ce composé I comme un dérivé de substitution par le solvant. En effet, lorsque nous rajoutons quelques gouttes de méthanol à la solution aqueuse de CPZ,HCl, nous observons pendant irradiation, l'apparition d'un composé IV dont les signaux sont tout-à-fait comparables à ceux de I : un triplet (A ;  $\delta = 4,5$  ppm ; fig. 4) en spectre  $^1H$  et une raie en émission en  $^{13}C$  ( $\delta = 93,7$  ppm ; fig. 5). IV est un dérivé de substitution de CPZ avec le

méthanol (fig. 6). Les différences de déplacement chimique (0,4 ppm en  $^1\text{H}$  et 7,3 ppm en  $^{13}\text{C}$ ) correspondent bien aux différences existant lors du remplacement d'un substituant  $-\text{OH}$  par un substituant  $-\text{OCH}_3$ . On observe les mêmes phénomènes (en  $^1\text{H}$  au moins) en remplaçant le méthanol par l'éthanol ou l'isopropanol. L'intensité plus faible du triplet dans ces cas peut-être due d'une part à son masquage partiel par le signal intense du à HDO et d'autre part à une réaction de substitution plus difficile avec ces alcools.

**Composé II** - Nous avons attribué le signal en émission à  $\delta = 6$  ppm à un composé II. Ce signal est situé dans la zone des protons aromatiques mais il est néanmoins bien différencié par rapport à ceux de CPZ, HCl. Dans une série de phénothiazines différemment substituées, il a été montré qu'en général les signaux des protons aromatiques sont peu affectés par les variations de la chaîne latérale mais sont plus sensibles à la nature de la substitution en  $-2$ <sup>31</sup>. Ainsi les protons 1 et 3 qui sont confondus dans un massif complexe pour CPZ,HCl peuvent être isolés quand le chlore est remplacé par d'autres substituants. En particulier lorsqu'on introduit un groupement méthoxy ( $-\text{OCH}_3$ ) en  $-2$ , ces protons sont déplacés vers les champs forts<sup>32</sup>, et se trouvent ainsi séparés des autres protons aromatiques. Nous pensons donc que le composé II serait également un dérivé de substitution par le solvant mais cette fois sur la position  $-2$  du cycle, le chlore étant remplacé par le groupement  $-\text{OD}$ <sup>33</sup> (fig. 6).

**Composé III** - La valeur du déplacement chimique du signal lié à ce composé ( $\delta > 9$  ppm en  $^1\text{H}$  et  $\approx 200$  ppm en  $^{13}\text{C}$ ) suggère qu'il provient d'un dérivé de type aldéhydique. Sa multiplicité (singulet) en  $^1\text{H}$  indique soit que le carbone du groupement carboxyle est relié à un carbone tertiaire (ou un azote substitué) soit qu'il s'agit du formaldéhyde. L'obtention d'acétaldéhyde lorsqu'on irradie dans les mêmes conditions le chlorhydrate de prométhazine (voir paragraphe suivant), et la comparaison des natures des chaînes latérales de cette phénothiazine avec CPZ, indique que III est en fait du formaldéhyde.

## II - LES AUTRES PHENOTHIAZINES

Nous avons entrepris l'étude de la photo-CIDNP de quelques analogues phénothiaziniques de CPZ dans les mêmes conditions. Ces composés diffèrent soit par la nature de leur chaîne latérale, soit par celle du substituant en position -2 du cycle aromatique (cf tableau I). Etant fournis sous forme de sels, nous avons également dans chaque cas préparé la base correspondante. Nous les avons irradiés dans l'eau, l'alcool et, quand nous avons rencontré des problèmes de solubilité, dans des mélanges binaires (eau avec un minimum d'acétone ou d'acétonitrile avec CMPTZ et MPZ par exemple). Cependant, nous avons retenu principalement les résultats dans l'eau (ou avec le pourcentage maximal d'eau en cas d'insolubilité) afin de pouvoir comparer les mécanismes primaires de photoréaction de chacun des dérivés, pris sous leur forme commerciale de sels dans le solvant plus proche des conditions biologiques. D'autre part, comme nous l'avons mentionné pour CPZ, les spectres de photo-CIDNP de la base ainsi que ceux en solvant non aqueux ne fournissent pas suffisamment d'informations. Il en va de même avec les autres phénothiazines.

Dans ces conditions, on peut établir les constatations suivantes. Hormis la chlorproéthazine (CPEtZ) dont la structure est similaire à CPZ et donnant évidemment des spectres de CIDNP identiques, seules la prométhazine (PMTZ) et la thioridazine (TRDZ) rappellent en partie les résultats précédents. Nous exposerons ces deux derniers cas ci-après. Pour tous les autres composés du tableau I, à part une perte de résolution du spectre pendant irradiation, on n'observe aucun effet de CIDNP sur les squelettes phénothiaziniques et aliphatiques des molécules. Aucun dérivé de substitution, ni de type aldéhydique n'est ainsi mis en évidence. Dans le cas des composés utilisés sous forme de sel autre qu'un chlorhydrate (MPZ, ALMZ et AMPZ) le seul phénomène remarquable est la polarisation (absorption exaltée) de leur partie anionique : maléate, tartrate ou fumarate. Les bases de ces composés ne montrent aucun effet de CIDNP.

Quelques gouttes d'acide chlorhydrique ajoutées à la base ne permettent pas non plus l'observation de tels effets, ces composés n'étant de plus pas particulièrement stables sous forme de chlorhydrate.

Enfin, les deux dérivés trifluorométhylés en -2 (TFPZ et FPZ) et

l'équivalent non chloré de CPZ (PRO), bien que n'étant pas eux-mêmes polarisés, permettent, lorsqu'ils sont irradiés en solution aqueuse de retrouver sur le signal HDO une polarisation en émission analogue à celle observée avec CPZ. Les solutions prennent alors une coloration qui disparaît progressivement après extinction de la source lumineuse excitatrice. Ceci est surtout caractéristique avec la promazine (voir le paragraphe interprétation).

Examinons à présent plus en détail les spectres  $^1\text{H}$  obtenus avec la prométhazine d'une part (PMTZ), puis la thioridazine (TRDZ) d'autre part.

#### ● La prométhazine

La figure 7 montre le spectre CIDNP  $^1\text{H}$  obtenu avec ce composé en solution aqueuse. On constate tout d'abord que les polarisations obtenues sont beaucoup moins intenses qu'avec CPZ. Le signal de l'eau (HDO) est toujours en émission mais il ne s'inverse pas. Les signaux de PMTZ ne sont pratiquement pas affectés. On observe principalement l'apparition d'un quadruplet en absorption exaltée ( $\delta = 9,30$  ppm) et un doublet en émission ( $\delta = 1,85$  ppm). Ces deux multiplets possèdent la même constante de couplage ( $J = 3$  Hz) et par comparaison avec un échantillon authentique sont attribués respectivement au proton aldéhyde et aux protons méthyliques de l'acétaldéhyde.

L'attribution du singulet à 4,45 ppm (A) est discutée dans le paragraphe suivant. Par contre, on peut mettre en évidence vers 4,9 ppm un doublet (A, peu intense) qui pourrait correspondre à un composé analogue à I de CPZ, à savoir un composé de substitution par le solvant sur le C en  $\alpha$  de l'azote hétérocyclique.

#### ● La thioridazine

Ce composé est le seul de la série étudiée à posséder un cycle pipéridyle sur la chaîne latérale. Au cours de son irradiation en solution aqueuse, on observe des effets de CIDNP principalement dans la région correspondant aux protons de ce cycle. Il est à noter que pour la fluphénazine (FPZ) qui possède, elle, un cycle pipérazinique nous n'avons pas observé ce type d'effets.

Enfin, le dérivé de substitution et l'aldéhyde analogues à ceux observés avec CPZ ne sont pas visibles sur le spectre obtenu avec TRDZ.

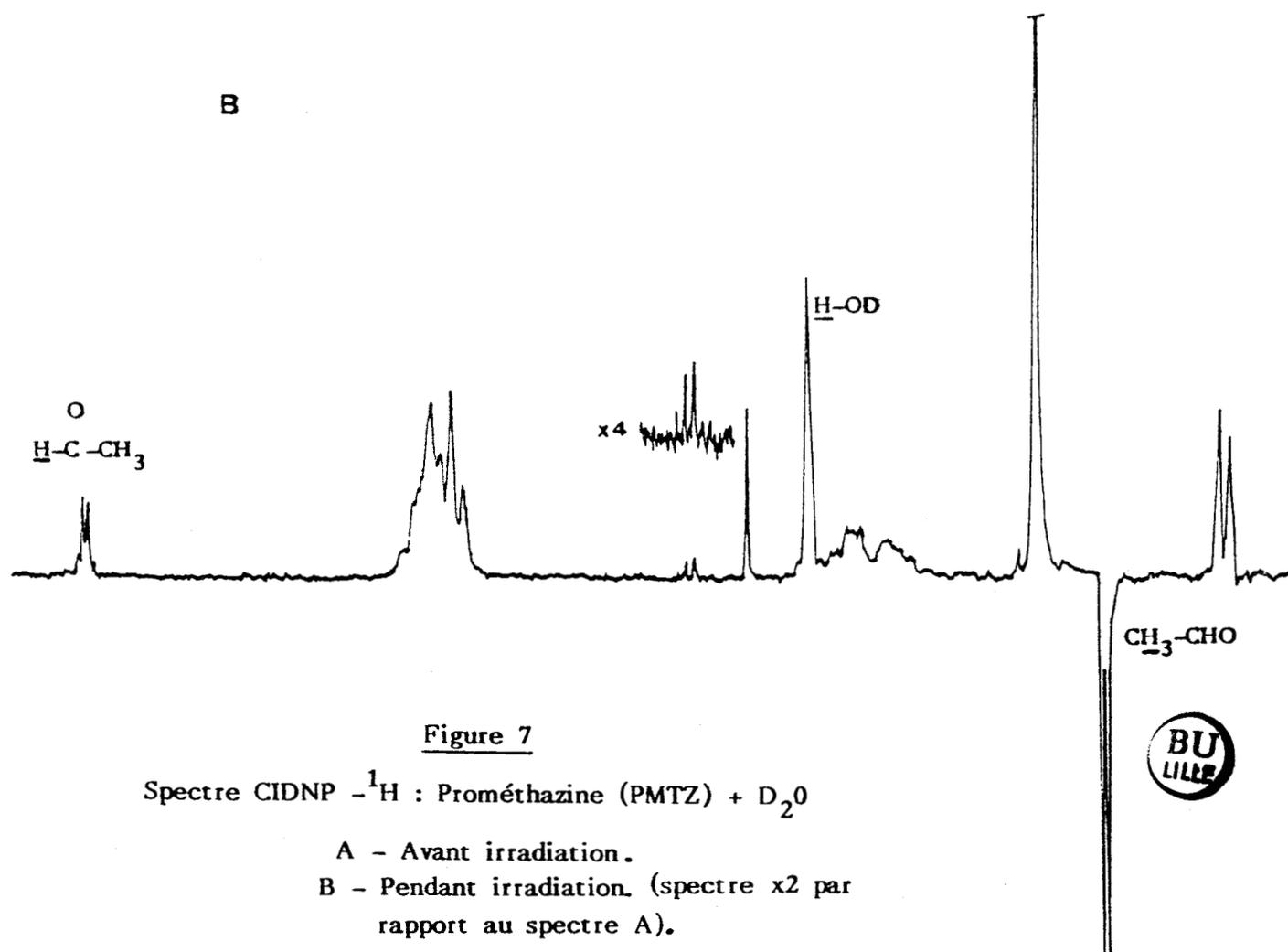
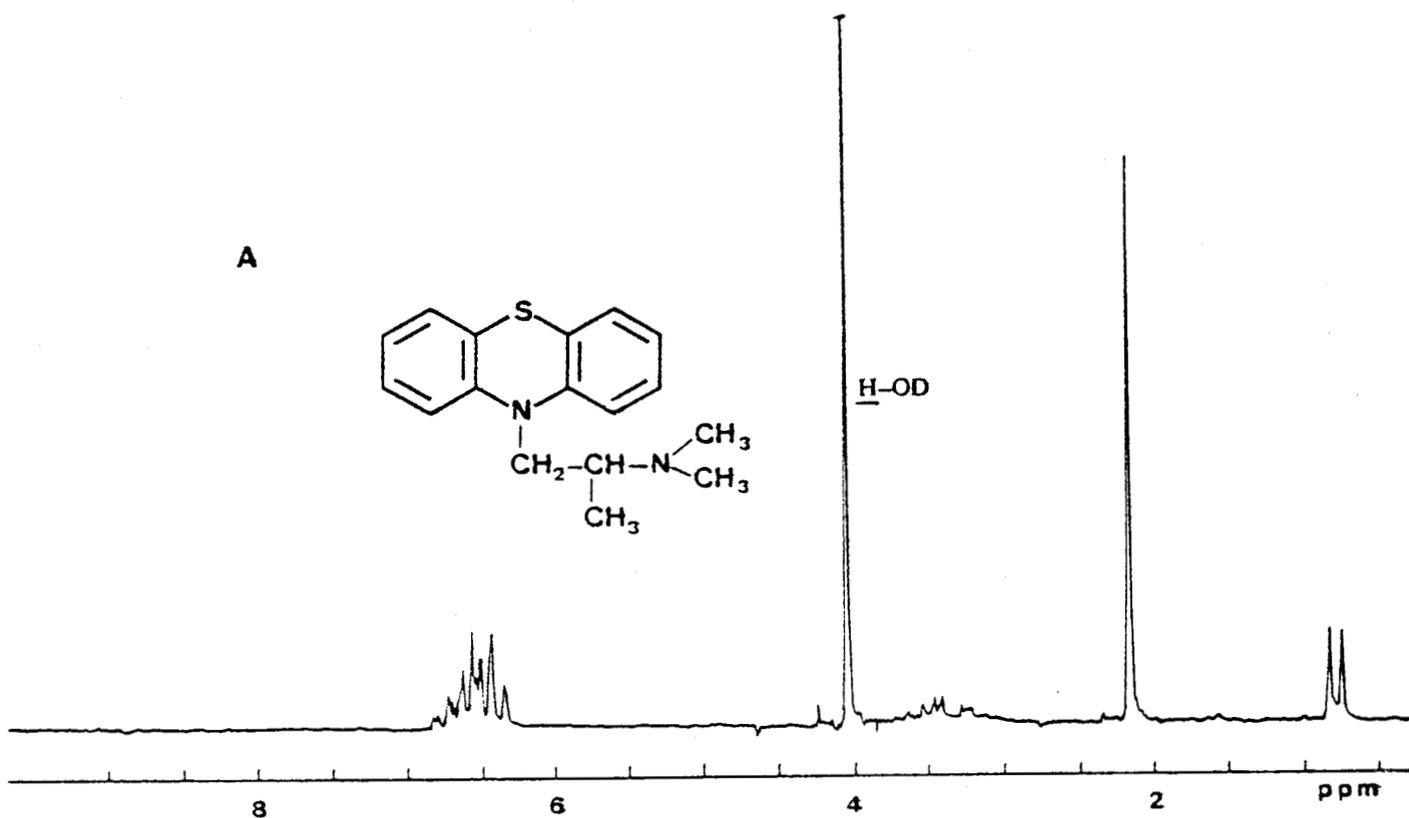


Figure 7

Spectre CIDNP  $^1\text{H}$  : Prométhazine (PMTZ) +  $\text{D}_2\text{O}$

A - Avant irradiation.

B - Pendant irradiation. (spectre x2 par rapport au spectre A).



### III - INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS

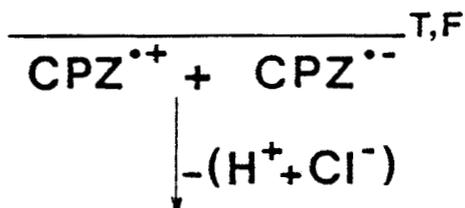
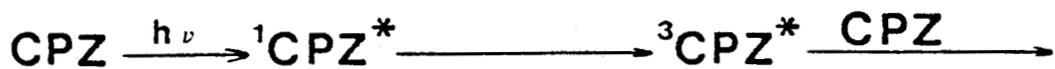
Nous considèrerons ici particulièrement le mécanisme de la photoréaction de CPZ en solution aqueuse puisque, comme nous venons de le voir, c'est le spectre de CIDNP de ce composé qui contient le plus d'informations et qu'il se singularise nettement par rapport à celui des autres phénothiazines.

#### 1 - Formation du dérivé de substitution (I)

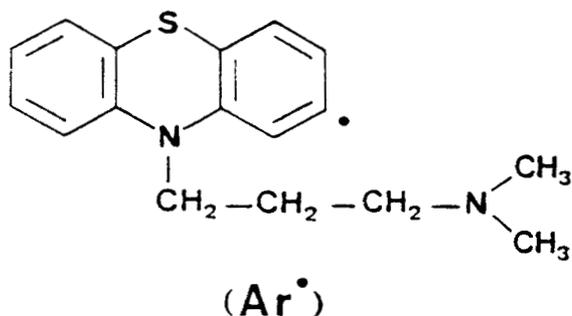
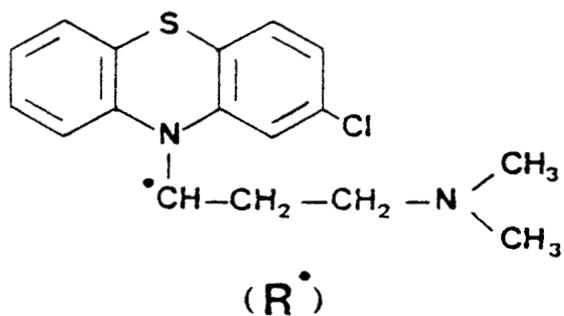
Le schéma 1 permet de décrire le mécanisme de la formation de ce composé. Après absorption de la lumière, la chlorpromazine passe dans un état excité singulet. Le rendement quantique de passage intersystème étant très élevé<sup>29</sup>, on aboutit alors à l'état triplet de la molécule, connu pour être son état réactif. La création de la paire radicalaire, permettant l'observation des effets de CIDNP, peut s'expliquer ensuite par un processus bimoléculaire consistant en un échange d'électron entre 2 molécules de CPZ. Celui-ci conduit alors à une paire de radicaux ions formée soit directement à partir de l'état triplet (T) soit par rencontre diffusive (F). Une paire de radicaux neutres  $\overline{R \cdot Ar \cdot}$  est alors créée à cause de la présence d'un atome de chlore sur le noyau aromatique. Le radical anion subit une deshalogénéation<sup>11</sup> du même type que celle provoquée par les amines sur les chlorures d'aryle<sup>34</sup>. Ceci se traduit par la libération d'acide chlorhydrique dans le milieu, responsable de la faible valeur du pH (2-3) en fin d'irradiation. Au départ la solution est pratiquement neutre (pH 6-7). La présence de chlore sur le noyau aromatique apparaît donc comme essentielle dans cette étape, puisque les phénothiazines portant un substituant différent ( $R_1 \neq -Cl$ ) ne conduisent pas à des composés analogues à I (ou plus difficilement comme dans le cas de PMTZ). Cependant, la nature de la chaîne latérale portée par l'azote hétérocyclique a également une importance puisque la chloro-2 N-méthylphénothiazine (CMPTZ) ne réagit pas non plus par cette voie.

La paire de radicaux neutres  $\overline{R \cdot Ar \cdot}$  réagit ensuite par piégeage par le solvant conduisant aux deux composés I et II. La participation de l'eau est suggérée par la forte polarisation (E) observée sur HOD\*. Si la

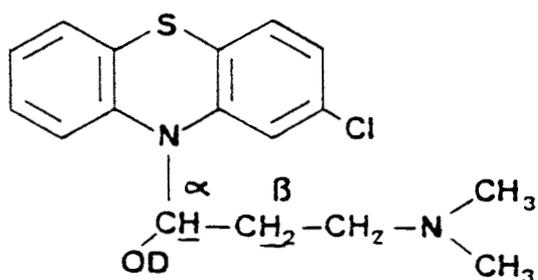
\* Ce type de polarisation a déjà été souvent décrit au cours d'expériences de CIDNP<sup>73</sup>. Toutefois aucune explication satisfaisante n'en a encore été donnée, même si l'une des hypothèses les plus vraisemblables est une réaction concernant des protons échangeables avec le deutérium.



T,F



$\text{D}_2\text{O}$

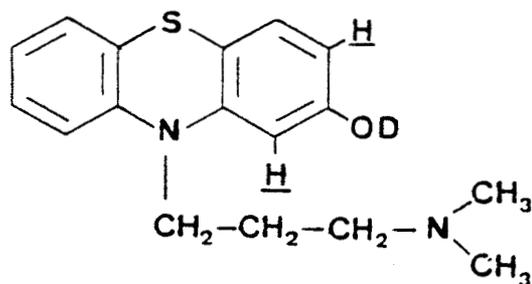


+

(Ar-D)

et (R-D)

+



BU  
LILLE

Schéma 1

Mécanisme de formation du dérivé de substitution (I).

formation de dérivés hydroxylés sur le noyau phénothiazine de CPZ est généralement admise et décrite (cf fig. 1), la mise en évidence de I par la méthode de photo-CIDNP est tout-à-fait originale. Il faut néanmoins noter que ROSENTHAL et al.<sup>18</sup> avaient suggéré sans preuves expérimentales que le carbone placé en  $\alpha$  de la chaîne latérale pourrait être le site réactif lors de la première étape de la réaction conduisant à la N-désalkylation de CPZ lors de son irradiation en présence de molécules photosensibilisantes.

D'autre part, lorsque l'irradiation est réalisée en solution mixte, eau-alcool ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) - cf fig. 4), la formation de IV dont le triplet (A) suggère son analogie avec I correspond à ce même schéma réactionnel. Cette fois, la paire de radicaux neutres  $\overline{\text{R}\cdot\text{Ar}\cdot}$  est à la fois piégé par HOD et  $\text{CD}_3\text{OD}$ , IV étant l'équivalent de I où le substituant  $-\text{OD}$  est remplacé par  $-\text{OCD}_3$  de l'alcool.

Les polarisations dues à R-D ou Ar-D, qui se forment corrélativement à I, II ou IV lors de cette réaction de piégeage par le solvant, sont probablement masquées à cause de la proximité des déplacements chimiques dans R-D et Ar-D avec ceux des produits de départ R-H et Ar-H.

Le mécanisme réactionnel décrit par le schéma 1 est alors compatible avec la règle de KAPTEIN relative à l'effet net (Chap. I). L'absence d'effets de multiplet dans tous les spectres précédemment décrits est attestée par leurs similitudes lorsqu'ils sont enregistrés avec une impulsion correspondant soit à un angle de flip de  $90^\circ$  soit à une valeur d'angle de  $20^\circ$ .

L'application de la règle au composé I nous permet alors les remarques suivantes :

- I étant un composé de substitution par le solvant, il ne peut provenir que d'une réaction de piégeage (produit de fuite) puisque, pour des raisons cinétiques (cf Chap. I), une paire radicalaire où l'un des partenaires serait le radical hydroxyle  $\cdot\text{OD}$  ne conduirait pas à des effets de CIDNP. Le paramètre  $\epsilon$  est donc négatif.

- le proton  $\text{H}_\alpha$  étant situé sur le carbone porteur du radical, la constante de couplage hyperfin  $a_{\text{H}_\alpha}$  sera négative.

- les radicaux  $\text{R}\cdot$  et  $\text{Ar}\cdot$  n'étant pas décrits, nous ne pouvons donner qu'une estimation de la valeur de leurs facteurs g. D'après les

données que nous possédons dans la littérature pour des radicaux de structure voisine, on peut estimer  $g_{R\cdot}$  entre 2,0026 et 2,0031 et  $g_{Ar\cdot}$  entre 2,0020 et 2,0025<sup>35</sup>.  $\Delta g = g_{R\cdot} - g_{Ar\cdot}$  serait donc positif.

• on peut ainsi en déduire  $\Gamma_n(H\alpha) = \mu \cdot \epsilon \cdot \Delta g \cdot a_H = \mu \cdot - \cdot + \cdot - = +\mu$   
Le triplet correspondant à  $H\alpha$  est en absorption exaltée.  $\Gamma_n(H\alpha)$  est donc positif,  $\mu$  doit donc l'être également. Ceci suppose que la paire provient soit d'un précurseur triplet (T) soit d'une rencontre diffusive (F) entre les 2 radicaux.

De la même façon cette règle prévoit de l'émission pour  $H\beta$  de I. En effet, pour ces protons seule la constante de couplage hyperfin change de signe par rapport à celle de  $H\alpha$  (les protons  $\beta$  sont situés en  $\alpha$  de l'atome de carbone porteur du radical), les autres paramètres étant identiques. C'est ce qui est observé sur le spectre avec le quadruplet en émission autour de 2 ppm.

Enfin, en ce qui concerne les protons situés en ortho du substituant hydroxyle dans le composé II,  $\mu$  et  $\epsilon$  restant les mêmes,  $\Delta g$  devenant négatif ( $g_{Ar\cdot} - g_{R\cdot}$ ) et  $a_H$  étant négatif, l'émission observée correspond bien à  $\Gamma_n(H)$  négatif ( +---).

Les spectres <sup>13</sup>C sont également compatibles avec le schéma 1. Dans ce cas, les polarisations provenant du C portant  $H\alpha$  dans I ou IV sont opposées à celles des protons correspondants (cf fig. 3 et 5). Ceci est dû au signe opposé des constantes de couplage hyperfin, ces constantes étant positives pour le carbone porteur du radical libre. L'interprétation des signaux appartenant à CPZ est rendue délicate à cause d'une consommation partielle entraînée par la plus longue durée de l'irradiation (vide supra).

Les produits décrits dans ce schéma sont tous des produits de fuite. Ceci est dû à ce que les signaux d'éventuels produits de recombinaison au sein de la paire radicalaire principale (dimères ou retour aux produits de départ) ne peuvent être analysés à partir du massif complexe observé entre 1,5 et 3 ppm (similitude de tous les glissements chimiques).

## 2 - Formation du dérivé aldéhydique (III)

Ce composé n'est observé que dans le cas de CPZ, de CPEtZ (polarisations dues au formaldéhyde) ainsi que dans celui de la prométhazine PMTZ (polarisations dues à l'acétaldéhyde). Par contre, on ne

l'observe pas avec les équivalents non chlorés de CPZ (possédant une chaîne latérale identique à celle de CPZ, i.e. PRO, TFPZ et MPZ).

La formation d'aldéhydes n'a, à notre connaissance, jamais été observée lors de la photoréaction de CPZ. Cependant, WAALER<sup>36</sup> avait déjà mis en évidence de l'acétaldéhyde lors de la décomposition du chlorhydrate de PMTZ par l'eau bouillante. La rupture de la liaison C-C de la chaîne latérale des phénothiazines N-alkylaminées ne possédant que 2 atomes de C entre les atomes d'azote hétéro- et exocycliques (type PMTZ) est également un phénomène connu<sup>37</sup>.

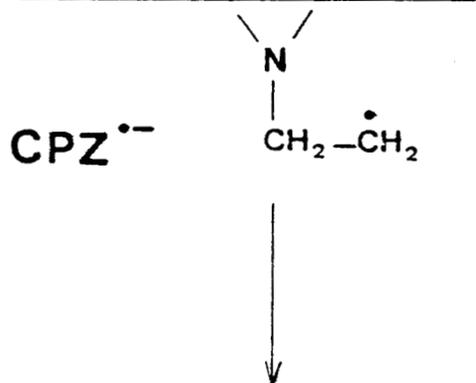
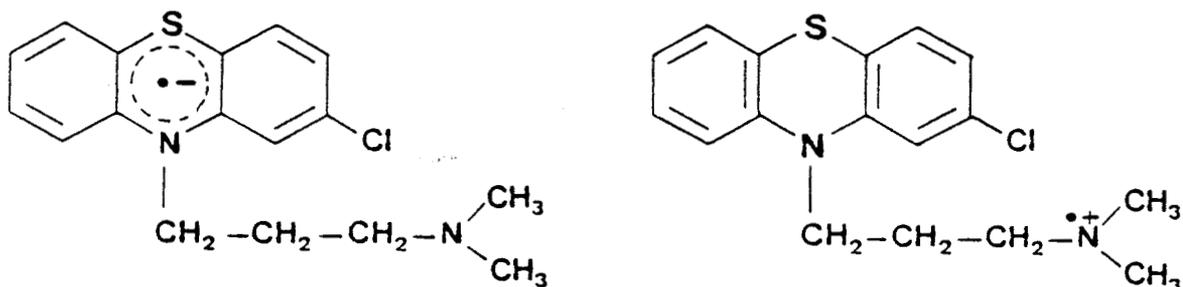
L'aldéhyde (formaldéhyde) obtenu étant le même avec CPETZ qu'avec CPZ, la rupture de la chaîne latérale intervient donc dans notre cas bien au niveau des groupements méthylènes et non pas au niveau des groupements portés par l'atome d'azote terminal ; sinon on obtiendrait de l'acétaldéhyde dans le cas de CPETZ.

Ces considérations nous permettent alors de proposer le mécanisme indiqué sur le schéma 2. La paire invoquée ici ressemble fortement à la précédente (cf schéma 1) en ce sens qu'elle met en jeu 2 radicaux ions de CPZ, le radical cation étant cette fois centré sur l'azote exocyclique. Ce type d'interaction est tout-à-fait courant lorsque l'on met en présence un dérivé aromatique et une amine : la molécule CPZ réunit ici simultanément les deux fonctions. La rupture homolytique de la liaison  $\text{CH}_2\text{-CH}_2$  située en  $\alpha$  de l'azote de la fonction amine se produit alors, conduisant à une nouvelle paire radicalaire et à un ion ammonium. Ce dernier, par hydrolyse, donne naissance au formaldéhyde (III) ainsi qu'à la diméthylamine N,N  $\text{d}_2^*$ . III apparaît donc comme un produit de cage ( $\epsilon > 0$ ) résultant d'une paire  $\text{CPZ}^{\cdot-} \text{CPZ}^{\cdot+}$  dans un état T ou F ( $\mu > 0$ ). Dans cette paire les protons du formaldéhyde sont portés par un carbone situé en  $\alpha$  de l'atome portant l'électron libre ( $a_{\text{H}} > 0$ ). III montrant de l'absorption exaltée, il vient :  $\Gamma \text{CH}_2(\text{III}) = +.+. \Delta g.+ = +(A)$ . La différence  $\Delta g$  doit donc être positive ; ce qui paraît raisonnable quand il a été montré que les facteurs  $g$  des radicaux cations ammonium ont des valeurs relativement élevées et en général supérieures à 2,004 ( $g = 2,004$  pour la triéthylamine<sup>38</sup>).

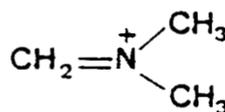
\* La polarisation (A) due aux groupements méthyles de ce composé ne sont pas visibles à cause de la similitude de leurs glissements chimiques avec ceux de CPZ.



T,F



PRODUITS



$\text{D}_2\text{O}$



(III)



Schéma 2

Mécanisme de formation du dérivé aldéhydique (III).

Quant à la paire secondaire, elle peut conduire à la formation de produits par piégeage par le solvant (structures voisines de celles déjà décrites). Le radical anion ( $\text{CPZ}^{\cdot-}$ ) peut aussi par diffusion se retrouver impliqué dans la paire principale décrite dans le schéma 1. La formation d'acétaldéhyde dans le cas de PMTZ peut également être envisagée à partir du schéma 2 (voir schéma 2 bis). La formation du radical neutre  $\text{N}-\dot{\text{C}}\text{H}_2$  pourrait alors, par piégeage dans l'eau, conduire à un dérivé du type  $\text{N}-\text{CH}_2\text{OD}$  dont le groupement méthylène expliquerait la présence du signal (A) à 4,45 ppm que nous n'avons pas attribué (cf fig. 7).

### 3 - Les autres phénothiazines

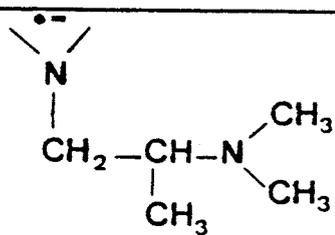
Comme nous l'avons vu dans un paragraphe précédent, leurs spectres de photo-CIDNP ne fournissent que très peu de renseignements. En effet, les seuls effets observables sont des élargissements de raies dans certains cas, associés avec une coloration intense des tubes de RMN. Ce phénomène peut s'expliquer par la présence de radicaux ions particulièrement stables en solution. La durée de vie des radicaux cations des phénothiazines est effectivement connue pour être longue. Cependant, nous n'avons jamais observé de nouveaux composés résultant de réactions ultérieures de ces espèces. L'élargissement des raies (principalement dans la région aromatique) correspond probablement à des réactions d'échange soit d'énergie (entre molécules à l'état excité et molécules à l'état fondamental) soit d'électron (entre radicaux ions et molécules neutres)<sup>39</sup>. C'est en particulier le cas avec la promazine, avec laquelle en outre le signal de l'eau est en émission suggérant une participation du solvant dans ces échanges, bien qu'il ne soit pas concerné, comme dans le cas de CPZ, par la formation de photoadduits.

## IV - CONCLUSION

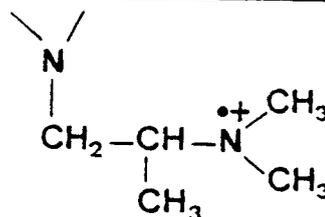
L'étude de la photoréaction de plusieurs dérivés de structure phénothiazinique à usage pharmaceutique nous a permis de mettre en évidence l'apport "classique" de la technique de photo-CIDNP dans ce domaine. Nous avons ainsi pu détecter l'existence de deux types de composés, non encore décrits jusqu'alors, au cours de la première étape de la dégradation d'une solution aqueuse de chlorhydrate de chlor-



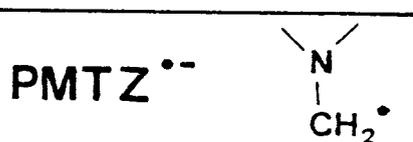
T,F



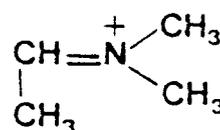
(PMTZ<sup>••</sup>)



(PMTZ<sup>•+</sup>)

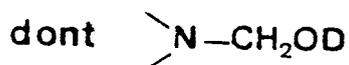


+



D<sub>2</sub>O

PRODUITS



(piégeage par D<sub>2</sub>O)

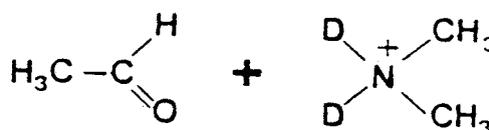


Schéma 2 bis

Mécanisme de formation du dérivé aldéhydique dans le cas de l'irradiation de la prométhazine (PMTZ).

promazine soumise à un rayonnement lumineux. D'une part, la formation d'un dérivé de substitution sur le carbone situé en  $\alpha$  de l'azote hétérocyclique montre la réactivité particulière de cette position par rapport aux autres. D'autre part, la dégradation de la chaîne latérale conduit au formaldéhyde. La présence de ce dernier pourrait, au moins en partie, contribuer à la phototoxicité de CPZ. En effet, le rôle des aldéhydes dans les systèmes biologiques est important<sup>40</sup>. De plus, de récents travaux ont montré que le formaldéhyde se révélait cancérigène et mutagène chez l'animal<sup>41</sup>, pouvait se fixer au niveau des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques<sup>42</sup> et former des pontages interbrins au niveau de l'ADN<sup>43</sup>.

Notre étude révèle également, dans un deuxième temps, la particularité de CPZ par rapport aux autres dérivés que nous avons testés. La photoréactivité des phénothiazines semble donc influencée à la fois par la nature des substituants en position -2 et -10. La présence de chlore en -2 et d'une chaîne N-alkylaminée semble essentielle pour la formation du dérivé de substitution. Il était déjà admis que ces deux critères étaient prépondérants au niveau de la phototoxicité de ces médicaments (mais aussi malheureusement de leurs propriétés pharmacodynamiques). La généralisation est plus délicate quant aux facteurs déterminants pour l'observation de dérivés aldéhydiques. On observe en effet ceux-ci sur des composés tels que CPZ et PMTZ différant à la fois par le substituant en -2 (-Cl et -H) et par la taille du maillon carboné de la chaîne latérale (respectivement 3 et 2 atomes de carbone). Ceci est tout-à-fait inattendu et indique que les formations des dérivés de substitution et aldéhydiques sont deux phénomènes indépendants.

## C - ETUDE PAR PHOTO-CIDNP DE L'INTERACTION ENTRE DIFFERENTS

### PHENOTHIAZINES ET LES NUCLEOBASES.

De nombreux travaux ont montré que deux des cibles privilégiées concernées par les effets photobiologiques dus à CPZ sont les membranes cellulaires et l'ADN. S'ils s'accordent en général à reconnaître le rôle important tenu par le radical cation (CPZ<sup>•+</sup>) dans l'interaction de CPZ avec l'ADN<sup>22,44</sup>, les résultats sont beaucoup plus obscurs quant au mécanisme moléculaire conduisant à la formation de complexes entre

l'ADN et CPZ, à la réactivité des ADN simple et double brin<sup>45,46</sup> ainsi qu'aux sites d'attaque sur l'ADN, donc les nucléobases concernées<sup>47, 48,49</sup> par la photoréaction. Nous avons donc poursuivi notre étude dans ce domaine et utilisé différentes bases puriques et pyrimidiques constitutives des acides nucléiques ainsi que leurs nucléotides monophosphatés. Leurs formules ont été regroupées sur la figure 8.

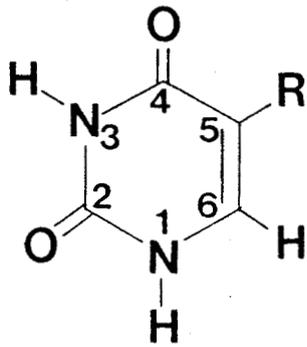
Nous avons ainsi constaté que CPZ (comme la plupart des autres phénothiazines) induisait des effets de CIDNP plus ou moins intenses sur certaines des bases et leurs dérivés. Nous allons exposer ici les informations que nous avons pu extraire des différents spectres obtenus.

## I - RESULTATS

### 1 - Réaction de CPZ en présence de purines et pyrimidines

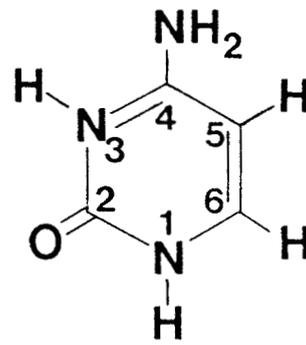
La figure 9 montre le spectre <sup>1</sup>H obtenu avec la cytosine. En plus des signaux dus à la photoréaction de CPZ avec D<sub>2</sub>O (cf paragraphe précédent), on observe de l'absorption exaltée (A) pour le proton H-6 (doublet à  $\delta = 7,38$  ppm) et de l'émission (E) pour le proton H-5 (doublet à  $\delta = 5,80$  ppm) du noyau cytosine. On remarque que ces signaux ne sont pas visibles sur le spectre avant irradiation (fig. 9a), la cytosine se trouvant en trop faible concentration (3 à 5 mM). On obtient des polarisations identiques : A pour H-6 et E pour H-5 (A pour -CH<sub>3</sub> avec la thymine) avec les autres bases pyrimidiques : uracile et thymine et leurs différents nucléotides. Par contre, si les dérivés de l'adénine sont également polarisés, ceux de la guanine ne montrent aucun effet, ou du moins très faible. Le tableau III résume tous ces résultats. Les nucléotides sont portés en abrégé sur ce tableau : la première lettre étant celle de la base correspondante (C, U, T, A, G) les deux suivantes (MP) indiquant qu'il s'agit des nucléotides monophosphatés (cf Chap. V).

Les spectres de CIDNP <sup>13</sup>C montrent également des polarisations dans tous les cas, excepté à nouveau pour la guanine et ses dérivés (tableau IV). Il faut néanmoins souligner que seuls C-4 et C-6 montrent des signaux exaltés pour les pyrimidines (fig. 10, par exemple) et C-6 (résonance au champ le plus élevé) et C-2 pour l'adénine. On retrouve également les composés (fig 10, raies marquées d'un astérisque) déjà obtenus lorsque CPZ était irradiée seule dans D<sub>2</sub>O.

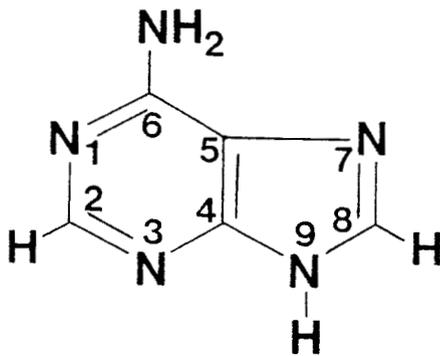


uracile :  $R=H$

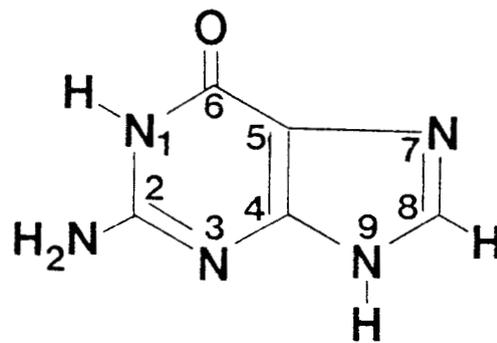
thymine :  $R=CH_3$



cytosine



adenine



guanine

ribose - phosphate \*

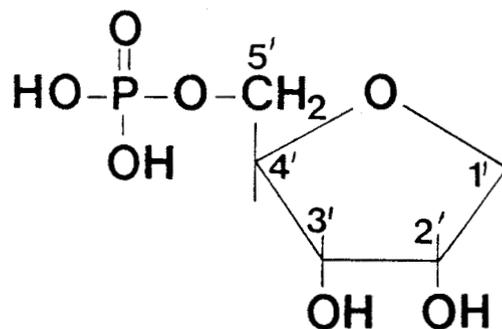


Figure 8

Formules des bases pyrimidiques et puriques.

\* Le groupement ribose-phosphate est respectivement lié à N-1 et N-9 sur les nucléotides pyrimidiques et puriques.

**Figure 9**

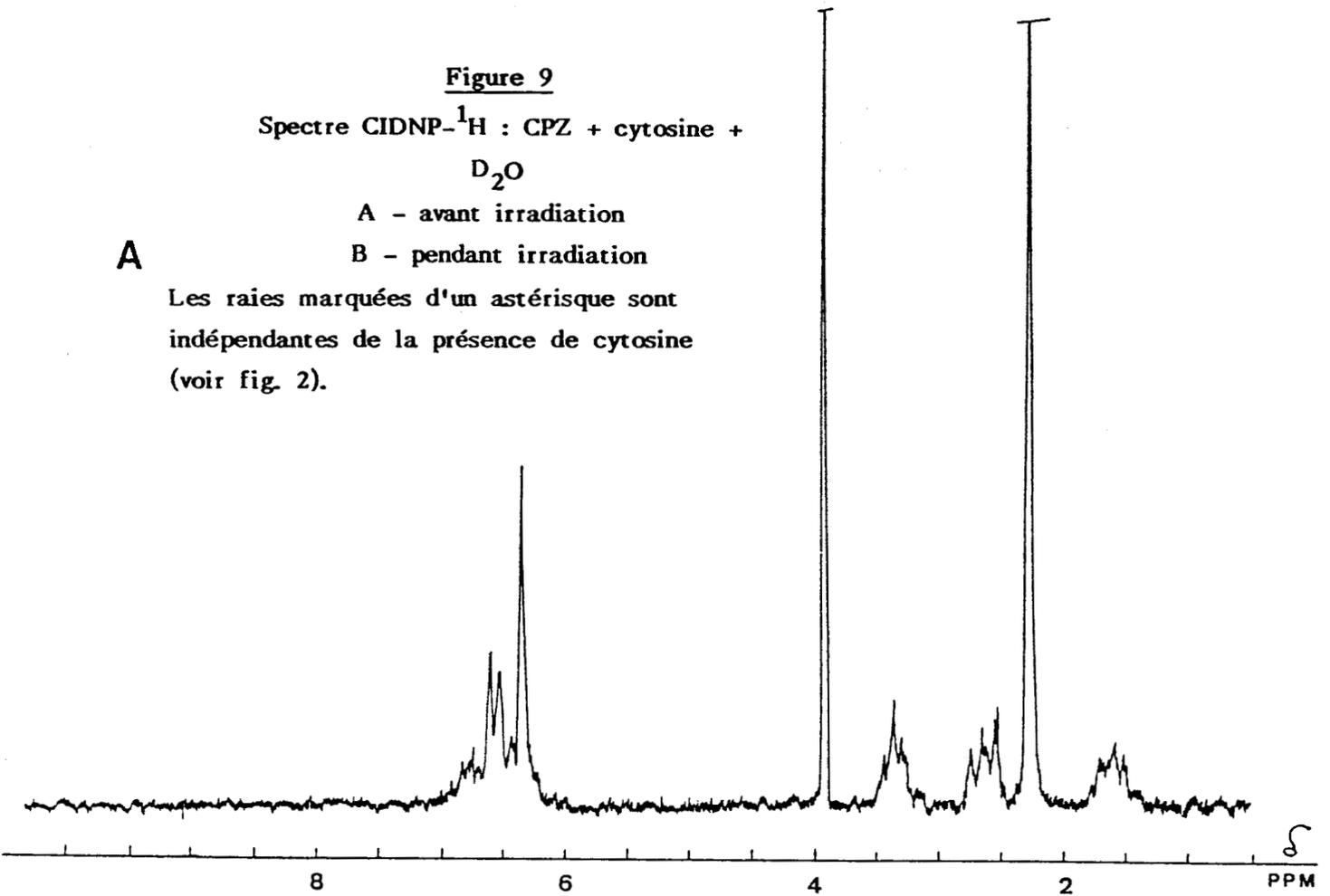
Spectre CIDNP- $^1\text{H}$  : CPZ + cytosine +  
 $\text{D}_2\text{O}$

A - avant irradiation

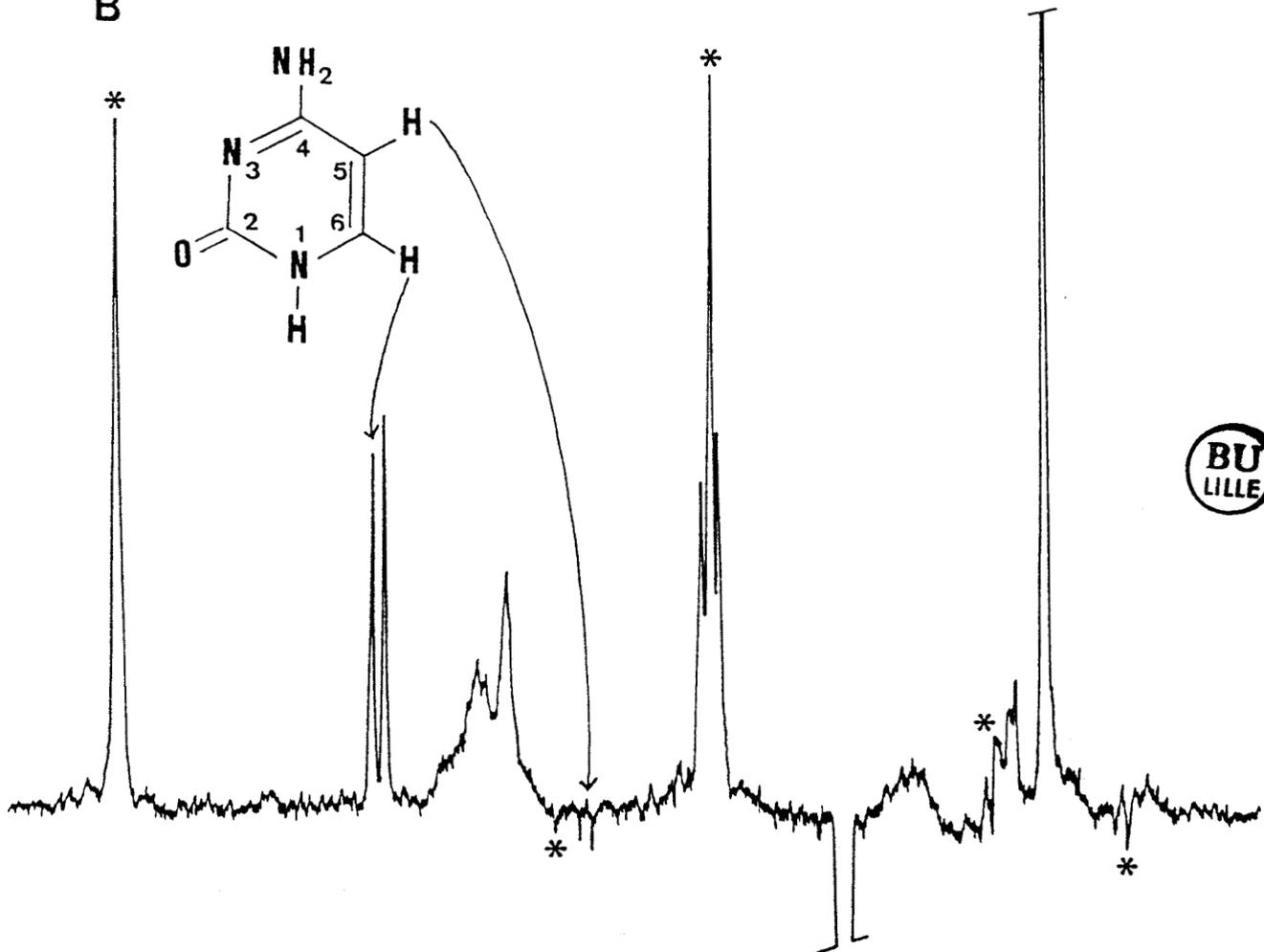
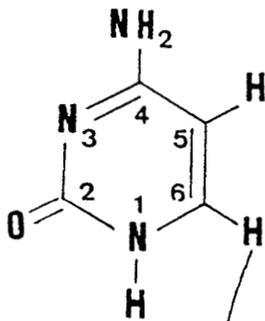
B - pendant irradiation

**A**

Les raies marquées d'un astérisque sont  
indépendantes de la présence de cytosine  
(voir fig. 2).



**B**



BASE OU NUCLEOTIDE	$\delta$ (ppm)	MULTIPLICITE	ATTRIBUTION	POLARISATION
Cytosine	7,38	d	H-6	A
	5,80	d	H-5	E
CMP	7,78	d	H-6	A
	5,98	d	H-5	E
Uracile	7,16	d	H-6	A
	5,43	d	H-5	E
UMP	7,47	d	H-6	A
	5,39	d	H-5	E
Thymine	6,95	s	H-6	A
	1,55	s	CH <sub>3</sub>	A
TMP	7,20	s	H-6	A
	1,55	s	CH <sub>3</sub>	A
Adénine	8,13	s	H-8	A
	8,08	s	H-2	A
AMP	8,20	s	H-8	A
	8,00	s	H-2	A

TABLEAU III : Polarisation observées (RMN-<sup>1</sup>H)- lors de l'irradiation de différentes bases des acides nucléiques et de leurs mononucléotides dans une solution aqueuse de CPZ.

d : doublet ; s : singulet ; A : absorption exaltée ; E : émission.



BASE OU NUCLEOTIDE	$\delta$ (ppm)	ATTRIBUTION	POLARISATION
Cytosine	162,25	C-4	E
	148,35	C-6	E (faible)
CMP	161,26	C-4	E
	146,24	C-6	E (faible)
Uracile	168,67	C-4	E
UMP	166,67	C-4	E
	142,00	C-6	E (faible)
Thymine	168,49	C-4	E
	150,88	non attribué	E
TMP	167,04	C-4	E
Adénine	151,99	C-6	E
AMP	151,31	C-6	E
	145,92	C-2	E (faible)

TABLEAU IV : Polarisations observées (R.M.N. -  $^{13}\text{C}$ ) lors de l'irradiation de différentes bases des acides nucléiques et de leurs mononucléotides dans une solution aqueuse de CPZ.



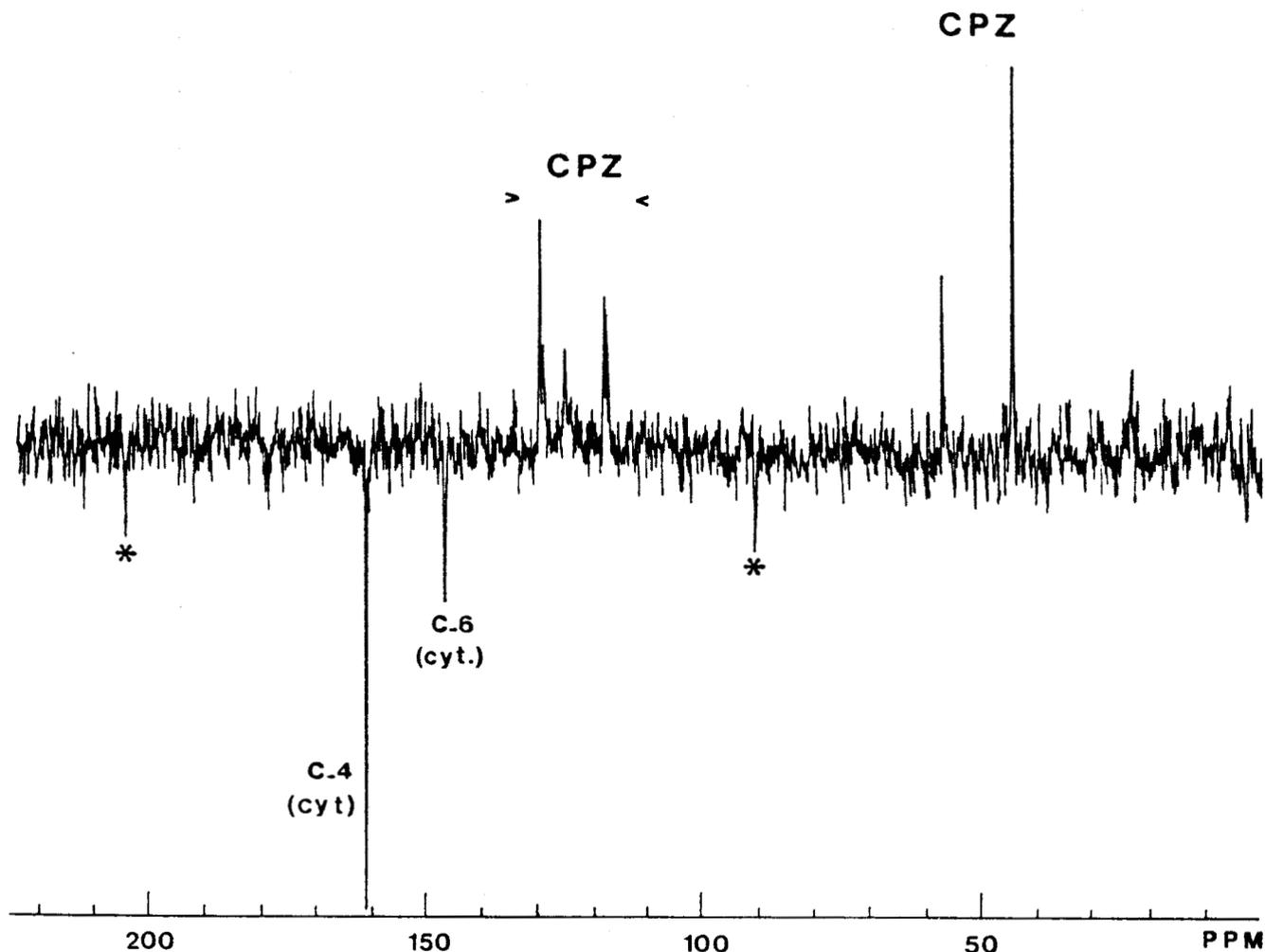


Figure 10

Spectre CIDNP -  $^{13}\text{C}$  (découplage large bande) pendant irradiation d'une solution aqueuse de CPZ en présence de cytosine. Les raies marquées d'un astérisque sont visibles indépendamment de la présence de cytosine.



## 2 - Les autres phénothiazines

La plupart des phénothiazines du tableau I provoquent, dans les mêmes conditions que CPZ, des polarisations sur les bases des acides nucléiques et leurs nucléotides, à l'exception de la guanine. Le signe de ces polarisations est identique à celui observé avec CPZ. De même, les polarisations sur les phénothiazines ne sont pas affectées par la présence des nucléobases et sont les mêmes que celles qu'elles présentent, le cas échéant, lorsqu'elles sont irradiées seules (voir discussion). Néanmoins, l'intensité des polarisations sur les nucléobases dépend fortement de la nature du dérivé phénothiazinique.

Afin d'étudier ce phénomène, nous avons choisi un modèle, en l'occurrence un dinucléotide : la guanylyl-3' → 5' cytidine (GpC), dont la formule est représentée sur la figure 11, pour comparer le comportement de chaque phénothiazine. Nous les avons ainsi toutes irradiées en présence de ce modèle dans les mêmes conditions expérimentales (concentrations, intensité lumineuse, ...). Un exemple du type de spectre ainsi obtenu est donné sur la figure 12 dans le cas de CPZ. Ce spectre (ainsi que son équivalent  $^{13}\text{C}$ ) est similaire à celui de la fig. 9. Les protons H-6 (doublet à  $\delta = 7,78$  ppm ; A) et H-5 (doublet à  $\delta = 5,88$  ppm ; E) du fragment cytidyle de GpC sont fortement polarisés comme dans le cas de la cytosine. La seule différence provient de la raie en émission à  $\delta = 5,55$  ppm qui correspond au proton H-1' de la partie glucidique qui ne peut évidemment pas être visible sur la base libre. De même, en accord avec nos résultats précédents, nous ne pouvons déceler aucune polarisation (ni en  $^1\text{H}$ , ni en  $^{13}\text{C}$ ) sur le fragment guanylyle du dinucléotide.

Nous avons donc mesuré l'intensité des polarisations obtenues sur le fragment cytidyle avec les diverses phénothiazines (cf Chap. V) et tenté de corrélérer cette intensité avec leur indice de phototoxicité tel qu'il a été évalué par d'autres méthodes.

## II - DISCUSSION

La nature de l'interaction d'origine photochimique entre CPZ et les acides nucléiques est encore très mal comprise. On a mis en évidence des espèces fluorescentes<sup>45,47,48</sup> ainsi que la faculté de CPZ à se lier à l'ADN<sup>50,51,52</sup>.

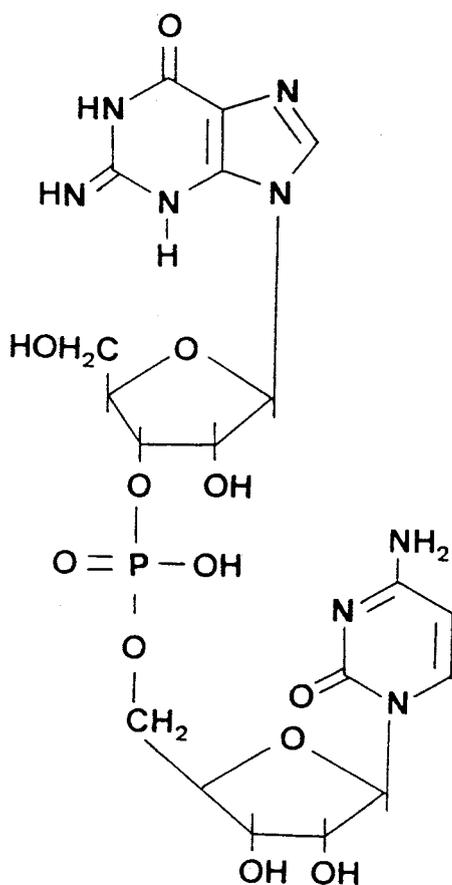
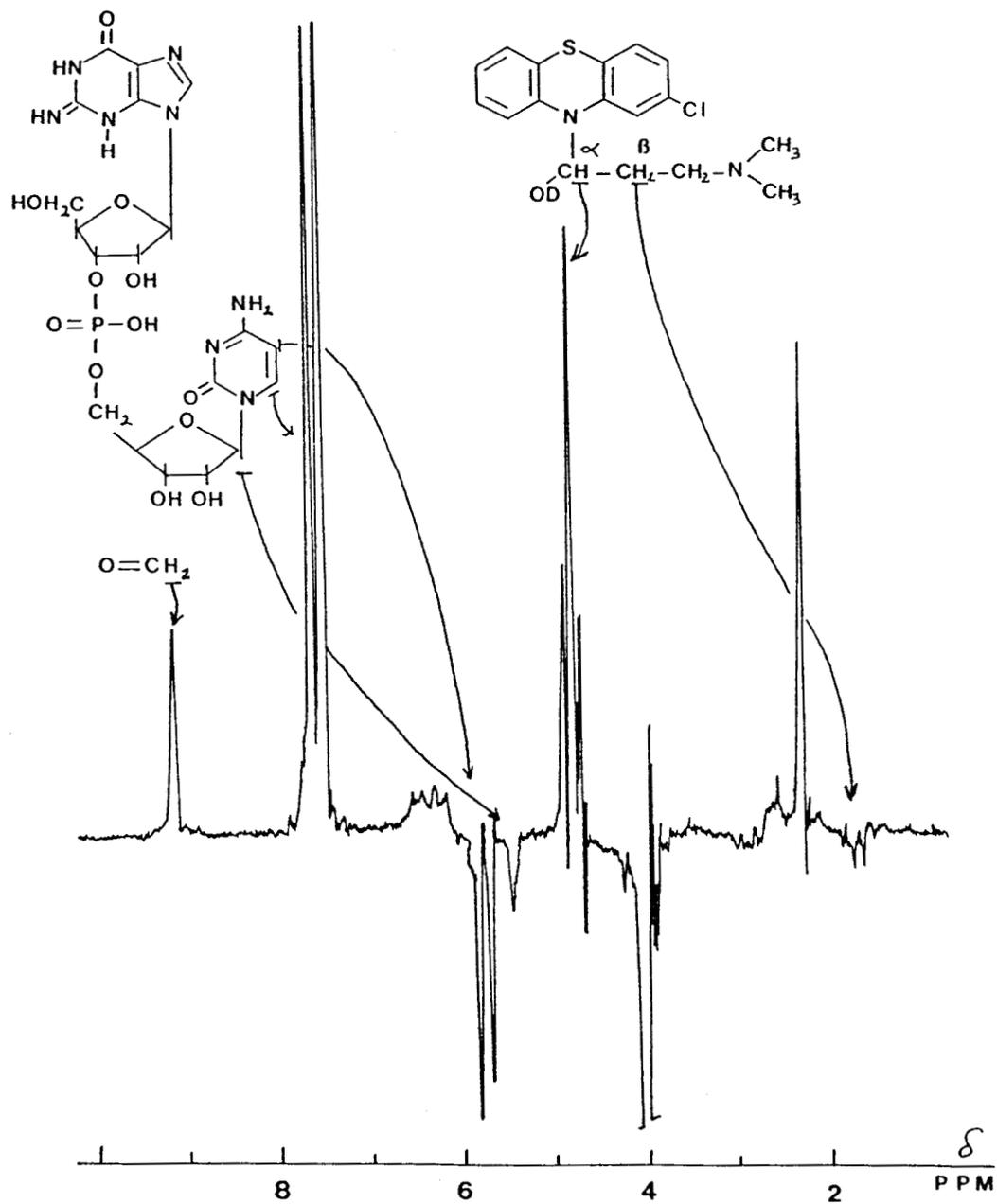


Figure 11

Formule de la guanylyl -3' → 5' cytidine (GpC).



**Figure 12**

Spectre CIDNP -  $^1\text{H}$  : CPZ +  $\text{D}_2\text{O}$  + GpC

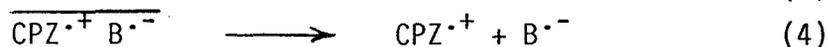
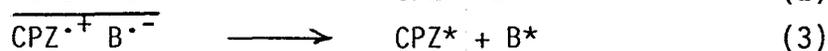
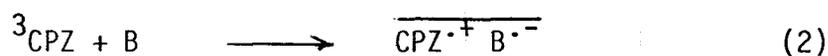
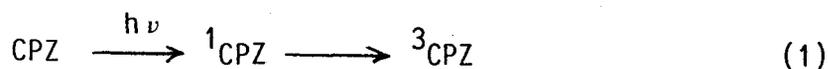
Dans nos conditions expérimentales, nous n'observons que des polarisations sur les nucléobases (B). Les phénothiazines, indépendamment de celles qui réagissent avec le solvant, ne montrent pas d'effets de CIDNP résultant de leur interaction avec B. De plus, aucun adduit CPZ-B n'est décelable. Ceci suggère que la réaction conduisant aux polarisations sur B doit être fortement réversible.

Récemment Mc CORD et coll.<sup>53</sup> ont étudié par CIDNP la réaction entre des flavines photoexcitées et les bases des acides nucléiques ainsi qu'une variété de nucléosides, dont la guanosine en particulier. L'explication du mécanisme de cette réaction repose sur la double possibilité envisageable en tant qu'étape initiale : le transfert électronique ou l'arrachement d'un atome d'hydrogène. KAPTEIN et coll.<sup>54</sup> avaient déjà évoqué ce dualisme lorsque ces flavines étaient irradiées en présence de nucléotides\*. Nos résultats diffèrent cependant sur au moins deux points importants :

- avec les phénothiazines, les bases sont polarisées ; aussi bien leurs formes libres que leurs nucléotides pour lesquels le proton de la position réactive (N-1 pour les pyrimidines, N-9 pour les purines) est remplacé par un pont ribose-phosphate.
- La guanine et GMP sont polarisés en présence de flavines mais ne le sont pas en présence des phénothiazines. Or il a été montré que les flavines étaient capables d'arracher des électrons aux bases. D'autre part, parmi les bases utilisées, la guanine est celle qui cède le plus facilement des électrons (voir ci-dessous).

Ces considérations nous amènent à proposer un mécanisme réactionnel mettant vraisemblablement en jeu un transfert d'électron (réversible) de CPZ vers les bases des acides nucléiques, selon le schéma suivant :

\* Ces auteurs avaient étudié l'effet de la concentration en ion phosphate  $\text{HPO}_4^{2-}$  sur les polarisations de H-2 et H-8 de AMP et avaient constaté un changement de signe de la polarisation de H-8. Ils l'attribuaient à une déprotonation du radical cation  $\text{AMP}^{\cdot+}$  initialement formé, modifiant ainsi la nature de la paire radicalaire. La nouvelle paire provoquerait une polarisation opposée pour H-8, la différence de facteurs g changeant de signe. Nous n'avons pas observé un tel effet quant à nous, mais ceci peut être dû à la valeur élevée du facteur g de  $\text{CPZ}^{\cdot+}$ .



La polarisation de spin nucléaire\* est créée par le retour aux entités neutres. Cependant, l'absence de polarisations provenant de ce schéma sur CPZ est due à la superposition des processus de recombinaison (3) et de fuite (5). Par contre, pour les bases, ce dernier serait probablement atténué par le phénomène de relaxation<sup>55,56</sup> (cf Chap. II).

Plusieurs considérations plaident en faveur de ce type de mécanisme. Comme nous l'avons déjà mentionné, le rendement quantique de passage intersystème est très élevé pour les phénothiazines. La désactivation de ces dérivés intervient donc principalement à partir de leur état triplet de plus basse énergie ( $\simeq 60$  kcal/mole). Or les états triplets des bases des acides nucléiques possèdent en général des énergies relativement élevées, autour de 75 kcal/mole. Il est donc peu probable qu'un transfert triplet-triplet ait lieu entre les deux entités.

Dans une réaction de transfert d'électron, l'énergie libre de la paire de radicaux ions  $\overline{\text{CPZ}^{\cdot+} \text{B}^{\cdot-}}$  peut être estimée à partir des potentiels rédox du donneur et de l'accepteur et d'un facteur tenant compte à la fois de la distance de séparation ( $r$ ) des partenaires de la paire et de la constante diélectrique du solvant ( $\epsilon$ ) (interaction coulombienne). Elle est traduite par la relation proposée par REHM et WELLER<sup>57</sup> :

$$E(\overline{\text{CPZ}^{\cdot+} \text{B}^{\cdot-}}) = E_{\text{ox}}(\text{CPZ}) - E_{\text{red}}(\text{B}) - \frac{e^2}{\epsilon \cdot r} \quad (6)$$

Quand  $r = 7 \text{ \AA}$  (valeur moyenne généralement admise en solution) et que l'eau est utilisée comme solvant, le dernier terme a une valeur d'environ 0,03 eV. D'après les données de la littérature, le potentiel d'oxydation de CPZ en son radical cation a été mesuré à 0,68 V<sup>58</sup>. Il n'est pas trop affecté par le pH, au moins pour des valeurs acides de celui-ci (entre 2 et 6). Ce n'est pas le cas des différentes pyrimidines et purines, dont la valeur du potentiel de réduction est beaucoup plus

sensible à ce paramètre dans le même domaine<sup>59</sup>. Pour la cytosine par exemple entre pH = 2,5 et pH = 6, ce potentiel passe de - 1,07 V à - 1,57 V. Ainsi, pour le système CPZ/cytosine, l'énergie de la paire de radicaux ions  $\text{CPZ}^{\cdot+} \text{Cyt}^{\cdot-}$  se situerait entre 39,7 kcal/mole et 51,4 kcal/mole. Ceci est inférieur au niveau d'énergie de l'état triplet de CPZ valant 58,9 kcal. Le mécanisme de transfert électronique proposé est donc envisageable d'un point de vue énergétique. Il en va de même avec CMP, l'adénine ou AMP dont les potentiels de réduction sont assez voisins de celui de la cytosine<sup>59</sup>. L'uracile, UMP, la thymine et TMP sont apparemment plus difficilement réductibles électrochimiquement<sup>60</sup> et les mesures sont moins accessibles. Il est à noter que les polarisations que nous avons observées sur ces dérivés sont nettement moins intenses que celles obtenues avec la cytosine ou l'adénine.

La réduction de la guanine et de GMP est également peu aisée et nous ne possédons pas de données chiffrées à ce sujet. De plus, il est bien connu que l'affinité électronique de la guanine est la plus faible parmi celle des bases de l'ADN<sup>61</sup>. Ceci pourrait être une des raisons pour lesquelles on n'observe pas d'effet de CIDNP sur ce composé sur les bases du schéma réactionnel proposé. D'autre part, il a été récemment montré<sup>49</sup> que les résidus guanine étaient la cible principale pour la dégradation de l'ADN simple brin quand celui-ci est exposé à un rayonnement U.V. proche en présence de promazines. L'action de ces dernières se traduirait par la formation d'un complexe covalent. Cette voie non radicalaire (non détectable par CIDNP) expliquerait pourquoi la guanine serait la seule base à ne pas être polarisée selon le mécanisme de transfert électronique des réactions 1 à 5. Ce transfert étant de plus réversible, le mécanisme serait en accord avec l'absence de tout adduit détectable ou isolable au niveau des autres bases que la guanine.

Analysons à présent les données fournies par nos spectres CIDNP <sup>13</sup>C et, principalement, les positions des atomes polarisés. Les calculs théoriques de densité de spin montrent que cette densité est la plus élevée sur C-6 ( $\approx 50\%$ ) et C-4 ( $\approx 20\%$ ) pour les radicaux anions des pyrimidines et sur C-6 ( $\approx 40\%$ ) C-8 ( $\approx 20\%$ ) et C-2 ( $\approx 20\%$ ) pour celui de l'adénine (en ne reconsidérant que les atomes de carbone)<sup>62</sup>. En ce qui concerne les radicaux cations, elle est essentiellement localisée sur C-5 ( $\approx 40\%$ ) pour les pyrimidines et elle est beaucoup plus régulièrement répartie sur les différents atomes ( $\approx 10\%$ ) pour l'adénine<sup>62</sup>. Or d'après nos résultats pour les pyrimidines, seuls C-4 et à un degré moindre C-6

sont considérablement exaltés, suggérant que ces 2 positions possèdent les densités de spin les plus élevées. En particulier, le signal correspondant à C-5 n'est pas polarisé. De même pour l'adénine, seuls C-6 (fortement) et C-2 sont polarisés. Il semblerait donc que les espèces à l'origine des effets de CIDNP correspondent à un radical anion de la base. Celle-ci jouerait donc bien le rôle de l'accepteur d'électrons au cours de la réaction. Il faut toutefois signaler à ce stade que deux points restent à élucider : tout d'abord, l'absence de polarisation sur C-8 dans le cas de l'adénine, qui, théoriquement, possède une densité de spin équivalente et un temps de relaxation  $T_1$  identique et aussi court que C-2<sup>63</sup>. L'autre point concerne les intensités relatives des polarisations de C-6 et C-4 pour les pyrimidines. Ici encore, les temps de relaxation ne peuvent justifier cet écart puisqu'à priori C-4 voisin d'un atome d'azote devrait posséder un  $T_1$  plus long que celui de C-6.

Par contre, les spectres  $^1\text{H}$  des pyrimidines corroborent également l'hypothèse de la formation d'un radical anion de la base. L'intensité plus importante de l'absorption exaltée de H-6 par rapport à l'émission de H-5 suggèrent en effet que l'électron libre du radical précurseur serait préférentiellement localisé sur la position 6.

Le schéma réactionnel (réactions 1 à 5) proposé permet également de rendre compte des signes des polarisations observées conformément à la règle de KAPTEIN concernant l'effet net (Chap. I). Les radicaux anions des pyrimidines et des purines possèdent des valeurs de  $g$  respectivement de 2,0030<sup>64</sup> et 2,0034<sup>65</sup>. Celle de  $\text{CPZ}^{\cdot-}$  est par contre relativement élevée (2,0056 en solution à température ambiante<sup>66</sup>). En prenant ainsi le cas de la cytosine, par exemple, les effets de CIDNP pour H-5 ( $\Gamma_n < 0$ , E) et H-6 ( $\Gamma_n > 0$ , A) vérifient simultanément :

- l'état triplet précurseur de la paire radicalaire ( $\mu > 0$ )
- l'origine des polarisations à partir d'une réaction de recombinaison de cage ( $\epsilon > 0$ )
- une différence de facteurs  $g$  négative ( $\Delta g = 2,0030 - 2,0054 < 0$ )
- une constante de couplage positive pour H-5 ( $a_{\text{H-5}} > 0$ ) et négative pour H-6 ( $a_{\text{H-6}} < 0$ ) dans l'hypothèse de la localisation préférentielle de l'électron libre sur C-6 comme nous l'avons mentionné ci-dessus.

### III - ETUDE COMPAREE DE DIFFERENTES PHENOTHIAZINES : CORRELATION ENTRE EFFETS DE CIDNP ET PHOTOTOXICITE

L'analogie entre les polarisations induites sur les nucléobases par les autres phénothiazines et celles obtenues avec CPZ indique que le même mécanisme de transfert électronique intervient dans tous les cas. La seule différence se situe au niveau des intensités. Nous avons reporté sur le tableau V (3ème colonne) l'intensité du doublet correspondant à H-6 du fragment cytidyle de GpC (voir fig. 12) pendant l'irradiation du dinucléotide en présence de la phénothiazine. La valeur 100 a été arbitrairement attribuée pour le signal le plus intense.

#### 1 - Analyse des résultats

Nous n'avons pas reporté sur le tableau V les valeurs obtenues avec CPZ et CPEtZ, à cause du comportement très particulier de ces deux dérivés vis-à-vis du solvant utilisé. Elles se situeraient aux environs de 50. Nous constatons ainsi que deux dérivés seulement n'induisent aucune polarisation sur GpC : MPZ et AMPZ. Nous avons ensuite un groupe de 4 dérivés pour lesquels cette polarisation est faible (5) : TFPZ, FPZ, TRDZ et CMPTZ. Elle est un peu plus élevée pour PRO (10), l'équivalent non chloré de CPZ. Puis elle augmente fortement pour ALMZ (40) et atteint son maximum (100) avec PMTZ.

Il faut rester très prudent quant à l'interprétation de ces différences, étant donné le grand nombre de facteurs pouvant influencer l'intensité des signaux de CIDNP<sup>68</sup>. En dehors des précautions expérimentales élémentaires (concentrations, durée et puissance d'irradiation, solutions fraîchement préparées, ...), on peut tout d'abord constater que les phénothiazines comparées ont toutes des spectres d'absorption similaires présentant deux bandes dans l'U.V. proche situées respectivement à 260 et 310-320 nm (voir tableau II). Les durées de vie de leur état triplet ont le même ordre de grandeur (45 à 55 ms). Elles ont toutes des taux de rendement quantique de phosphorescence élevés (à l'exception de CMPTZ) et de fluorescence faibles. Il semble également que les valeurs des facteurs  $g$  de leurs radicaux cations soient toujours situées aux alentours de 2,0050 : celui de la phénothiazine vaut 2,0052<sup>71</sup> proche des autres valeurs mesurées (tableau II). Donc tous ces paramètres ne devraient pas (ou peu) affecter les intensités des polarisations observées.

COMPOSE	ABBREVIATION	Intensité de POLARISATION GpC	Indice de PHOTOTOXICITE in vivo*	Indice de PHOTOTOXICITE in vitro*
: Chlorpromazine	: CPZ	: —	: 10	: 1,0
: Chlorproéthazine	: CPETZ	: —	: —	: —
: Promazine	: PRO	: 10	: 0,6	: 3,0
: Prométhazine	: PMTZ	: 100	: 0,3	: 4,6
: Triflupromazine	: TFPZ	: 5	: —	: —
: Fluphénazine	: FPZ	: 5	: 1,7	: 0,9
: Thioridazine	: TRDZ	: 5	: 2,9	: 0,6
: Chloro-2 N-Méthyl Phénothiazine	: CMPTZ	: 5	: —	: —
: Méthopromazine	: MPZ	: 0	: —	: —
: Alimémazine	: ALMZ	: 40	: 0,4	: 0,9
: Aminopromazine	: AMPZ	: 0	: —	: —

**TABLEAU V** : Intensité de la polarisation observée sur GpC en présence de différentes phénothiazines (3<sup>ème</sup> colonne - la valeur 100 est attribuée arbitrairement à la polarisation la plus intense).

\* Indices de phototoxicité reportés d'après Ljunggren et Möller<sup>67</sup>.



En ce qui concerne les potentiels d'oxydation, l'insuffisance des données en notre possession (voir tableau II) ne nous permet pas d'exclure le fait que les différences d'intensité soient liées à des considérations énergétiques. Néanmoins, il faut remarquer que les quatre valeurs mentionnées (pour CPZ, PMZ, TFPZ et MPZ) sont, d'après l'équation 6, toutes favorables pour un mécanisme de transfert électronique avec les nucléobases. Mais paradoxalement, a priori, MPZ dont le potentiel est le plus faible n'induit aucune polarisation sur GpC. Ceci n'est pas forcément en contradiction avec nos hypothèses. SACKETT et Mc CREERY<sup>58</sup> ont en effet montré que MPZ réagissait probablement selon une voie différente de celle des 3 autres dérivés considérés, ce qui pourrait expliquer l'absence de signaux en CIDNP.

Si nous considérons à présent les structures des phénothiazines étudiées, il est remarquable de constater que les polarisations les plus intenses sont obtenues avec PMTZ et ALMZ qui possèdent chacune une chaîne latérale ramifiée. Ceci traduirait donc la capacité de ce type de dérivés à conduire plus facilement à la formation de leur radical cation pour des raisons d'ordre stéréochimique<sup>72</sup>.

Ainsi les différences que nous avons observées pourraient être principalement reliées à des raisons cinétiques et structurales plus qu'à des valeurs de paramètres physiques. Il faut également mentionner la polarisation de H-1' (E) de la partie glucidique reliée au fragment cytidyle de GpC. Cette polarisation n'est pas visible sur les mononucléotides (CMP par exemple). Ce phénomène a déjà été observé par Mc CORD et coll.<sup>53</sup> sur le fragment guanylyle de dinucléotides ou d'homologues supérieurs. Ce type de polarisation peut s'expliquer soit par une interaction de nature hyperfine entre H-1' et l'électron libre du radical intermédiaire, soit par un transfert de polarisation (relaxation dipolaire transverse) entre un proton polarisé et H-1' dans le produit diamagnétique. Ces possibilités sont parfaitement analysées dans le travail de Mc CORD et Coll. précédemment évoqué. Nous ne les détaillerons pas ici puisqu'elles ne sont pas essentielles dans la compréhension et le but de notre travail.

## 2 - Corrélation avec les indices de phototoxicité

LJUNGGREN et MÖLLER<sup>67</sup> ont précédemment décrit des tests in vitro et in vivo pour l'évaluation du potentiel phototoxique de différents

médicaments à structure phénothiazinique ou apparentée. Les tests *in vivo* ont ainsi révélé que les dérivés chlorés du type CPZ étaient de loin les agents les plus phototoxiques, comme il l'est communément admis (tableau V, 4ème colonne). Les tests *in vitro* présentent quelques écarts sensibles et particulièrement ceux concernant PMTZ et PMZ dont les indices deviennent les plus élevés (tableau V, 5ème colonne). Les valeurs des autres composés sont sensiblement voisines. Si nous comparons les résultats obtenus d'une part par notre méthode (photo-CIDNP) et d'autre part par celle *in vitro* de LJUNGGREN (inhibition de la croissance de *Candida Albicans*) nous constatons qu'ils sont très similaires. Dans la série étudiée, il semble donc possible de corrélérer l'intensité des effets de CIDNP obtenus sur une molécule convenablement choisie (ici GpC) avec la phototoxicité d'un composé donné. Le résultat peut paraître surprenant quand on considère que la réaction étudiée dans notre cas n'est pas de nature à provoquer une quelconque photodégradation du substrat (bases de l'ADN) puisqu'elle serait hautement réversible. Elle traduit simplement une photosensibilité (photoréactivité) plus marquée pour certains composés. Celle-ci paraît se manifester au niveau de leur toxicité, conférant ainsi son intérêt à la méthode.

#### IV - CONCLUSION

La photo-CIDNP nous a permis de montrer l'existence en solution aqueuse d'une réaction de transfert électronique réversible entre plusieurs phénothiazines et les bases constitutives des acides nucléiques conduisant intermédiairement au radical cation de la phénothiazine et au radical anion de la base. Seule la guanine ne réagit pas par un tel processus de nature radicalaire.

Cette hypothèse est renforcée par une étude similaire que nous avons débutée avec une autre famille de molécules à propriétés photosensibilisantes : les porphyrines<sup>74</sup>. Celle-ci nous conduit à des résultats tout-à-fait complémentaires. En effet dans ce cas, la guanine seule est polarisée en présence de porphyrine alors que l'adénine et les bases pyrimidiques ne le sont pas. Des considérations énergétiques, basées sur l'équation de REHM et WELLER mentionnée dans ce chapitre, nous permettent d'expliquer ce phénomène par une réaction de transfert

électronique inverse de celle décrite avec les phénothiazines. C'est le radical cation de la base qui serait ainsi obtenu, sa formation n'intervenant logiquement qu'avec la guanine qui est la base la plus facilement oxydable.

Dans un deuxième temps, en comparant le comportement des phénothiazines entre elles (à l'exclusion de CPZ) nous avons pu mettre en évidence l'influence de la présence d'une chaîne latérale ramifiée (comme dans PMTZ ou ALMZ) sur les intensités des effets de CIDNP obtenus sur les bases. La réaction serait facilitée dans ce cas grâce à la formation plus aisée de radicaux cations. Nous observons enfin une bonne corrélation entre les propriétés phototoxiques des phénothiazines et l'intensité des polarisations qu'elles induisent sur un dinucléotide (GpC) que nous avons choisi comme molécule test. Nos résultats montrent que la CIDNP pourrait s'avérer être un moyen d'investigation simple et rapide de la phototoxicité in vitro des médicaments de cette série. Cette technique serait aussi valable et moins contraignante que les méthodes généralement utilisées dans ce domaine et constituerait une bonne estimation préalable à des tests in vivo plus poussés.

--oooOooo--

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

--0000000--

- 1) C.L. HUANG et F.L. SANDS - *J. Chromatog.* 13, 246 (1964)
- 2) A. FELMEISTER et C.A. DISHER - *J. Pharm. Sci.* 53, 756 (1964)
- 3) T. IWAOKA et M. KONDO - *Bull. Chem. Soc. Jpn* 47, 980 (1974)
- 4) M. SAUCIN - *Arch. Internat. Physiol. Bioch.* 87, 1051 (1979)
- 5) N. PILPEL, M. NEJMEH et W.H.K. SANNIEZ - *Int. J. Pharm.* 5, 273 (1980)
- 6) S. ATES et G. SOMER - *J. Chem. Soc. Faraday I* 77, 859 (1981)
- 7) I.E. KOICHEVAR et J. HOM - *Photochem. Photobiol.* 37, 163 (1983)
- 8) C.L. HUANG et F.L. SANDS - *J. Pharm. Sci.* 56, 259 (1967)
- 9) F.W. GRANT et J. GREENE - *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 23, 71 (1972)
- 10) S. NAVARATNAM, B.J. PARSONS, G.O. PHILLIPS et A.K. DAVIES - *J. Chem. Soc. Faraday I* 74, 1811 (1978)
- 11) N.J. BUNCE, V. KUMAR et L. RAVANAL - *J. Med. Chem.* 22, 202 (1979)
- 12) G.A. EPLING, C. BLACK et V. RAWAL - *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1313 (1983)
- 13) V. LION, J. DECUYPER, A. VANDEVORST et J. PIETTE - *J. Photochem.* 20, 169 (1982)
- 14) A.K. DAVIES, E.J. LAND, S. NAVARATNAM, B.J. PARSONS et G.O. PHILLIPS - *J. Chem. Soc. Faraday I* 75, 22 (1979)
- 15) T. IWAOKA et M. KONDO - *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 50, 1 (1977)
- 16) J. DECUYPER, J. PIETTE, M.P. MERVILLE, C.M. CALBERG-BACQ et A. VAN DE VORST - *Arch. Int. Physiol. Biochim.* 90, B15 (1982)
- 17) A.K. DAVIES, S. NAVARATNAM et G.O. PHILLIPS - *J. Chem. Soc. Perkin II*, 25 (1976)
- 18) I. ROSENTHAL, T. BERCOVICI et A. FRIMER - *J. Het. Chem.* 14, 355 (1977)
- 19) I. ROSENTHAL, E. BEN-HUR, A. PRAGER et E. RIKLIS - *Photochem. Photobiol.* 28, 591 (1978)
- 20) D.V. DUNG, J. MARIEN, E. DE PAUW et J. DECUYPER - *Org. Mass Spectr.* 19, 276 (1984)

- 21) I.E. KOICHEVAR - *J. Invest. Dermatol.* 77, 59 (1981)
- 22) a) N.J. DE MOL, R.M. POSTHUMA et G.R. MOHN - *Chem.-Biol. Interact.* 47, 223 (1983) - b) S. OHNISHI, H.M. Mc CONNELL - *J. Amer. Chem. Soc.* 87, 2293 (1965)
- 23) a) G. TESTYLIER, D. DAVELOOSE, F. LETERRIER, O. BUCHMANN et M. SHIMONI - *Photochem. Photobiol.* 39, 273 (1984) - b) K. HASEI, M. ICHIHASHI et M. MOJAMDAR - *Photochem. Photobiol.* 40, 273 (1984)
- 24) a) Y. KURODA et K. KITAMURA - *J. Amer. Chem. Soc.* 106, 1 (1984) - b) G. TESTYLIER, G. CLEMENT et F. LETERRIER - *Photochem. Photobiol.* 39, 277 (1984)
- 25) D.S. HULL, S. CSUKAS et K. GREEN - *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 22, 502 (1984)
- 26) E. BEN-HUR, A. PRÄGER, M. GREEN et I. ROSENTHAL - *Chem.-Biol. Interact.* 29, 223 (1980)
- 27) B. KREVENBÜHL, R.K. JOSHI et X. PERLIA - *Pharm. Acta Helv.* 54, 197 (1979)
- 28) S. SARAF, M.A. KHAN et S. AL-MOUSAWI - *Heterocycles* 19, 935 (1982)
- 29) M. SAUCIN et A. VAN DE VORST - *Radiat. Environ. Biophys.* 17, 159 (1980)
- 30) J. MARKO, G. VERMEERSCH, N. FEBVAY-GAROT, S. CAPLAIN et A. LABLACHE-COMBIER - *Photochem. Photobiol.* 38, 169 (1983)
- 31) M. AZZARO, A. CAMBON, F. GOUZO et R. GUEJ - *Bull. Soc. Chim.* 6, 1977 (1967)
- 32) J.C. CRAIG, D.E. GREEN, S.K. ROY, L.H. PIETTE et K.O. LOEFFLER - *J. Med. Chem.* 8, 392 (1965)
- 33) J.K. SUZUKI, A. ZIRNIS et A.A. MANIAN - *J. Het. Chem.* 16, 1227 (1979)
- 34) a) N.J. BUNCE - *J. Org. Chem.* 47, 1948 (1982) - b) R.S. DAVIDSON et J.W. GOODIN - *Tetrahedron Lett.* 22, 163 (1981)
- 35) A.J. DOBBS - *Electron Spin Resonance, The Chemical Society, Londres, Vol. 2, Ch. 10, pp 281 à 294 (1974)*
- 36) T. WAALER - *Pharm. Acta Helv.* 35, 168 (1960)
- 37) C. BODEA et I. SILBERG - *Advances in Heterocyclic Chemistry*. Ed. A.R. Katritzky et A.J. Boulton. - *Acad. Press, N.Y.*, Vol. 9 Sect VI, A, pp 436-439 (1968)
- 38) H.D. ROTH et A.A. LAMOLA - *J. Amer. Chem. Soc.* 96, 6270 (1974)

- 39) G.L. CLOSS - "Chemically Induced Magnetic Polarization", Ed. L.T. Muus et al., D. Reidel Publishing Company, Ch. XX (1977)
- 40) E. SCHAUENSTEIN, H. ESTERBAUER et H. ZOLLNER - "Aldehydes in Biological Systems. Their natural occurrence and biological activities" Pion, London. Ed. J.R. Lagnado. N°5, pp 1 à 201 (1977).
- 41) F. PERERA et C. PETITO - *Science* 216, 1285 (1982)
- 42) N.A. NAULET et D.J. LE BOTLAN - *Nouv. J. Chimie* 8, 741 (1984)
- 43) R.C. GRAFSTROM, A.J. FORNACE Jr., H. AUTRUP, J.F. LECHNER et C.C. HARRIS - *Science* 220, 216 (1983)
- 44) N.J. DE MOL et R.W. BUSKER - *Chem.-Biol. Interact.* 52, 79 (1984)
- 45) G. KAHN et B.P. DAVIS - *J. Invest. Dermatol.* 55, 47 (1970)
- 46) I.E. KOICHEVAR, F.L. CHUNG et A.M. JEFFREY - *Chem. Biol. Interact.* 51, 273 (1984)
- 47) P. KANTESARIA et P. MARFEY - *Physiol. Chem. Phys.* 7, 53 (1975)
- 48) H. FUJITA, H. HAYASCHI et K. SUZUKI - *Photochem. Photobiol.* 34, 101 (1981)
- 49) M.P. MERVILLE, J. PIETTE, M. LOPEZ, J. DECUYPER et A. VAN DE VORST - *Photochem. Photobiol.* 39 S, 57 S (1984)
- 50) H. FUJITA, F. YANAGISAWA, A. ENDO et K. SUZUKI - *J. Radiat. Res.* 21, 279 (1980)
- 51) E. BEN-HUR, A. PRAGER, M. GREEN et I. ROSENTHAL - *Chem.-Biol. Interact.* 29, 223 (1980)
- 52) R.S. DAY et M. DIMATTINA - *Chem. Biol. Interact.* 17, 89 (1977)
- 53) E.F. Mc CORD, K.M. MORDEN, A. PARDI, I. TINOCCO Jr. et S.G. BOXER - *Biochem.* 23, 1926 (1984)
- 54) R.M. SCHEEK, S. STOB, T. SCHLEICH, N.C.M. ALMA, C.W. HILBERS et R. KAPTEIN - *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 5930 (1981)
- 55) R. KAPTEIN, K. DIJKSTRA, F. MÜLLER, C.G. VAN SCHAGEN et A.J. W.G. VISSER - *J. Magn. Reson.* 31, 171 (1978)
- 56) E.F. Mc CORD, R.R. BUCKS et S.G. BOXER - *Biochem.* 20, 2880 (1981)
- 57) D. REHM et A. WELLER - *Isr. J. Chem.* 8, 259 (1970)
- 58) P.H. SACKETT et R.L. Mc CREERY - *J. Med. Chem.* 22, 1447 (1979)
- 59) B. JANIK et P.J. ELVING - *Chem. Reviews* 68, 295 (1968)
- 60) P.J. ELVING, J.E. O'REILLY et C.O. SCHMAKEL - *Methods in Biochemical Analysis*. Ed D. GLICK. Interscience Pub. John Wiley and Sons, New York, London, Sydney, Toronto. Vol. 21, pp 380 à 413 (1973)
- 61) S. GREGOLI, M. OLAST et A. BERTINCHAMPS - *Radiat. Res.* 77, 417

(1979)

- 62) S. ADAMS et H. BOX - *J. Chem. Phys.* 63, 1185 (1975)
- 63) A. ALLERHAND, D. DODDREL et R. KOMOROSKI - *J. Chem. Phys.* 55, 189 (1971)
- 64) M.D. SEVILLA et C. VAN PAEMEL - *Photochem. Photobiol.* 15, 407 (1972)
- 65) M.D. SEVILLA et P.A. MOHAN - *Int. J. Radiat. Biol.* 25, 635 (1974)
- 66) F. LOPEZ-RUPEREZ, J.C. CONESA, J. SORIA, M.C. APREDA, F.H. CANO et C. FOCES-FOCES - *J. Phys. Chem.* 89, 1178 (1985)
- 67) B. LJUNGGREN et H. MÖLLER - *Acta Dermatovener* 57, 325 (1977)
- 68) H.J. VOGEL et B.D. SYKES - *J. Magn. Reson.* 59, 197 (1984)
- 69) F. LOPEZ-RUPEREZ, J.C. CONESA et J. SORIA - *J. Mol. Struct.* 98, 165 (1983)
- 70) F. LOPEZ-RUPEREZ, J.C. CONESA et J. SORIA - *J. Chem. Soc. Perkin II*, 1517 (1982)
- 71) F. LOPEZ-RUPEREZ, J.C. CONESA et J. SORIA - *Spect. Acta* 40A, 1021 (1984)
- 72) H. FENNER - "The Phenothiazines and Structurally Related Drugs" Ed I.S. Forrest, C.J. Carr et E. Usdin. Raven Press, New York, pp 5 à 13 (1974)
- 73) a) M. TOMKIEWICZ, R.D. Mc ALPINE et M. COCIVERA - *Can. J. Chem.* 50, 3849 (1972) - b) H.E. CHEN, M. COCIVERA et S.P. VAISH - *Can. J. Chem.* 53, 2548 (1975) - c) P.J. HORE, A. VOLBEDA, K. DIJKSTRA et R. KAPTEIN - *J. Amer. Chem. Soc.* 104, 6262 (1982)
- 74) D. LE NOUËN, J. MARKO, G. VERMEERSCH, N. FEBVAY-GAROT, A. LABLACHE-COMBIER et A. GAUDEMER - Réunion sur la photosensibilisation. Société Française de Photobiologie. Institut Curie-ORSAY - 10-11-12 octobre 1985.

--0000--

--0000000--

## CHAPITRE IV

--0000000--

## LES FUROCOUMARINES

--0000000--

### I - INTRODUCTION

Les furocoumarines sont des composés hétérocycliques oxygénés d'origine naturelle, que l'on rencontre principalement dans deux familles de plantes : les ombellifères (céleri, persil, angélique, ...) et les rutacées ( oranger, citronnier, ...).

Certaines de ces plantes étaient utilisées pour le traitement du vitiligo<sup>4</sup> (dépigmentation partielle de la peau) il y a déjà plus de 3000 ans en Inde, ainsi qu'un peu plus tard en Egypte (graines d'Ammi Majus). On a également reconnu très tôt que cette action était photobiologique et qu'elle nécessitait l'exposition du patient à la lumière solaire.

Néanmoins, les recherches biologiques sur les furocoumarines sont assez récentes. La première furocoumarine isolée à partir de l'essence et des fruits de bergamote est le méthoxy-5 psoralène (5-MOP) ou bergaptène en 1834<sup>1</sup>. L'importance de la lumière dans la chimie des furocoumarines n'est mentionnée qu'à partir de 1931<sup>2</sup>. L'utilisation du méthoxy-8 psoralène (8-MOP) dans le traitement du vitiligo est reconnue depuis 1947, quand fut établie sa présence dans les graines d'Ammi Majus<sup>3</sup>. Enfin, depuis 1974 et l'introduction de la PUVAthérapie, l'intérêt photochimique et photobiologique de ces molécules a pris un essor considérable.

La PUVAthérapie combine l'ingestion de psoralènes par le patient (ou leur application locale externe) et son exposition (1 à 2 heures plus tard) aux rayons ultra-violets (PUVA = Psoralène + lumière UVA). Elle sert principalement au traitement de deux maladies répandues de la peau : le vitiligo<sup>4</sup> (apparition de plaques blanchâtres sur la peau) et le

psoriasis<sup>5</sup> (prolifération de l'épiderme en plaques rougeâtres). En outre, l'essence de bergamote est utilisée comme additif dans de nombreux produits à usage cosmétologique : crèmes solaires et parfums (eau de Cologne) par exemple.

Cependant, il est rapidement apparu que ces différentes utilisations présentaient certains risques. On a ainsi relevé l'apparition d'érythèmes, d'une hyperpigmentation de la peau, de complications oculaires, d'effets mutagènes, cancérigènes ou tératogènes. Ces risques sont d'autant plus élevés, qu'étant donné que la PUVAthérapie ne guérit pas le psoriasis, mais en supprime seulement les symptômes pour des périodes de temps variables, les séances doivent être régulièrement répétées pour une durée indéfinie. C'est cependant actuellement le traitement le plus efficace de cette maladie très invalidante. Il est à noter que, même en l'absence de la lumière, les furocoumarines révèlent des effets mutagènes et bactéricides.

Ces quelques observations suffisent pour justifier l'abondante littérature publiée ces dernières années sur la photochimie et la photobiologie des furocoumarines (pour une revue, voir réf. 6). Dans cette littérature, on peut remarquer que les recherches se sont également orientées vers la synthèse de nouvelles molécules à structure furocoumarique, dans l'espoir que, tout en conservant les propriétés pharmacodynamiques des psoralènes actuellement sur le marché (5-MOP, 8-MOP et TMP : triméthyl-4,5',8 psoralène), elles n'en présentent pas les dangers.

Nous avons tenté pour notre part de mettre en évidence par photo-CIDNP le comportement photochimique de plusieurs d'entre elles et sur la base des résultats obtenus avec les phénothiazines, de procéder à leur "classement" selon un indice de "photoréactivité".

## II - LA PHOTOCHEMIE DES FUROCOUMARINES

Les travaux relatifs à l'aspect moléculaire de la photosensibilisation par les psoralènes concernent principalement les points suivants :

- luminescence et durée de vie des états excités.
- désactivation et réactivité de ces états excités vis-à-vis des bases des acides nucléiques, de l'ADN, de l'ARN, des acides

aminés, des protéines.

- nature des photoproduits : dimères, adduits, produits de dégradation.
- effets de l'oxygène ( $^1\text{O}_2$ ).
- formation de monoadduits et de produits de réticulation avec l'ADN.
- destruction des cellules.
- mutagénèse et réparation de l'ADN.

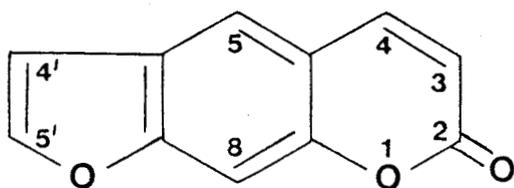
Nous allons en rappeler brièvement les principaux résultats.

### 1 - Différents types de furocoumarines (FC)

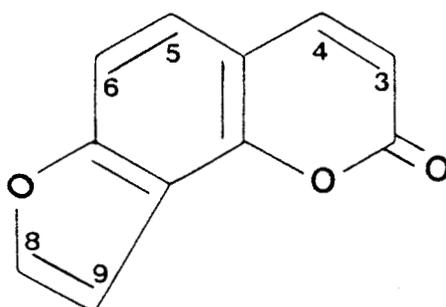
Une furocoumarine résulte de la condensation d'un cycle furannique avec le noyau coumarine. Il existe plusieurs types d'isomères parmi lesquels trois familles de dérivés présentent un intérêt. Elles sont représentées sur la figure 1. La plus importante est celle des furocoumarines linéaires ou psoralènes. On trouve ensuite deux types de furocoumarines angulaires : les isopsoralènes ou angélicines et les allopsoralènes. Ces derniers sont les seuls à ne pas être des produits naturels.

### 2 - Les états excités des furocoumarines<sup>7</sup>

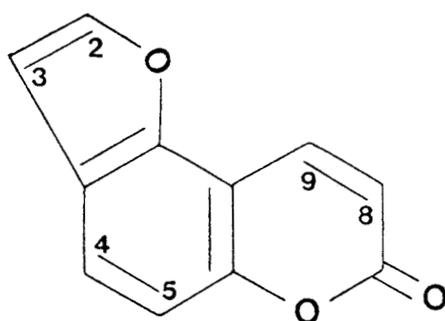
La figure 2 représente les niveaux d'énergie des plus bas états excités des psoralènes. Les spectres d'absorption de la plupart des FC possèdent une bande vers 300 nm ( $\epsilon$  compris entre 1 et  $1,5 \cdot 10^{-4} \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ) et un épaulement vers 330 nm ( $\epsilon \simeq 7000 \text{ dm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ). L'état singulet a une durée de vie très courte (1 à 4 ns). Le rendement quantique de passage intersystème est très élevé ( $\simeq 0,5$ ) et l'état triplet de plus basse énergie a une durée de vie beaucoup plus longue ( $\simeq 10 \mu\text{s}$ ). Il semblerait que l'excitation y soit plutôt localisée sur la double liaison 3,4<sup>6d</sup>. Le rendement quantique de phosphorescence est en général 10 fois plus élevé que celui de fluorescence. Toutes ces considérations expliquent la participation préférentielle de l'état triplet des FC au cours des réactions photochimiques de ces composés.



PSORALENE



ISOPSORALENE  
ou ANGELICINE  
ou FURO[2,3-h]COUMARINE



ALLOPSORALENE  
ou FURO[2,3-f]COUMARINE



Figure 1

Structure des principales furocoumarines .

\* Pour la suite, nous adopterons pour l'angélicine la numérotation des psoralènes .

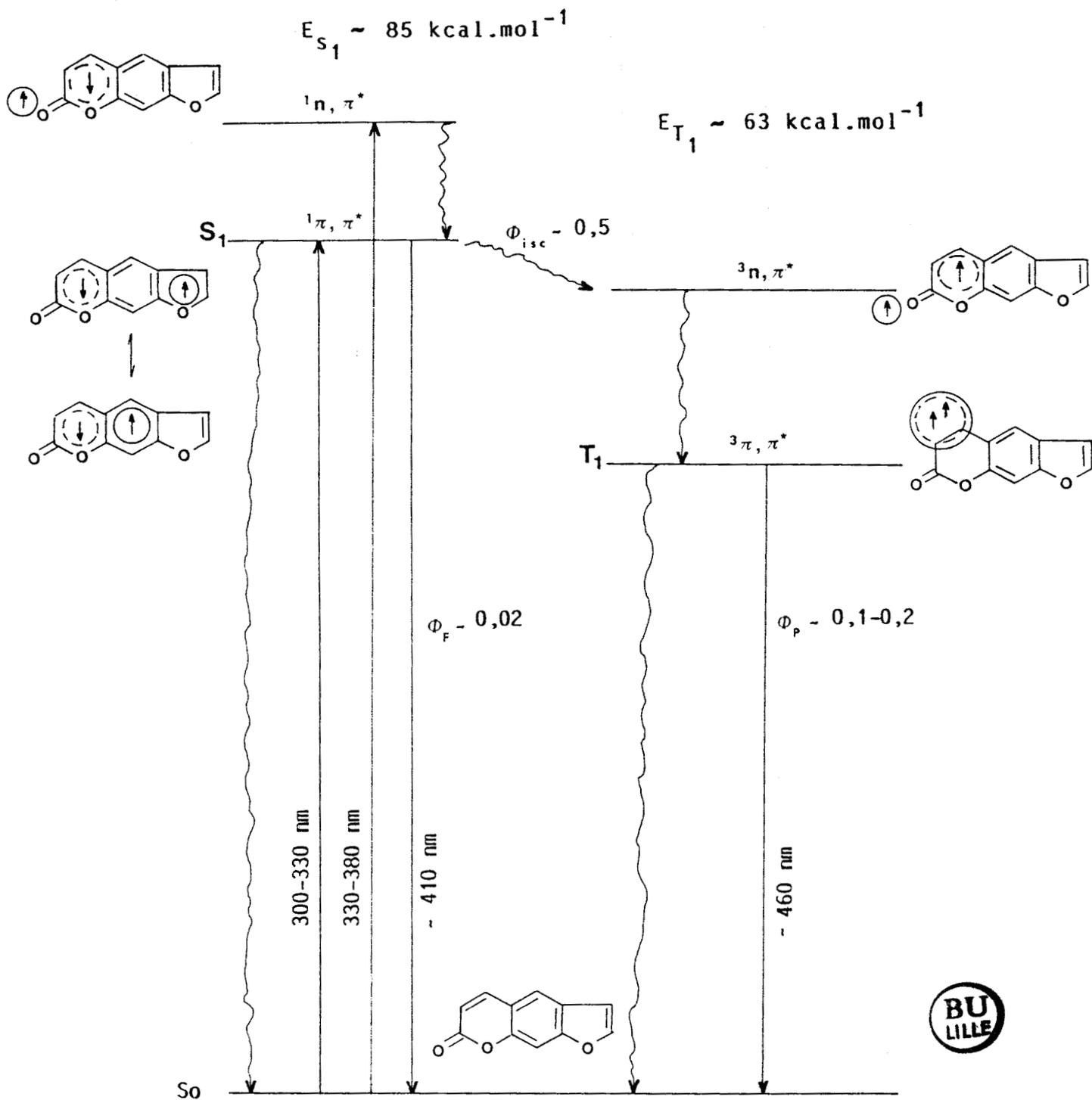


Figure 2

D'après W.W. MANTULIN et P.S. SONG, J. Amer. Chem. Soc. 95, 5122 (1973) - Niveaux d'énergie des plus bas états excités des psoralènes. Configurations électroniques (représentées par des flèches - spins) et contributions majoritaires des orbitales moléculaires pour les plus bas états singlets et triplets (cercle plein : orbitale occupée de plus haute énergie - cercle pointillé : orbitale libre de plus basse énergie).



Il faut également remarquer que les propriétés de cet état triplet sont fortement affectées par la nature du solvant quand on passe du benzène à l'eau par exemple (en particulier pour les 8-MOP, 5-MOP et 3-CPs : carbéthoxy-3 psoralène). Ce phénomène remarquable a suscité différentes interprétations :

- une inversion des états  $^3_n, \pi^*$  et  $^1_{\pi, \pi^*}$ <sup>8</sup>.
- efficacité de la conversion interne  $S_1 \rightsquigarrow S_0$ <sup>9</sup>.
- formation d'un exciplexe triplet dans l'eau ( $FC^{\delta-} \cdot H_2O^{\delta+}$ )<sup>10</sup> : le spectre d'absorption du radical anion de FC est en effet semblable à celui de son état triplet.
- existence de deux états triplets de plus basse énergie, séparés de seulement 0,3 eV ; l'un localisé sur la double liaison 3,4 et l'autre sur la double liaison 4',5'<sup>10</sup>.

### 3 - Les photoréactions des furocoumarines

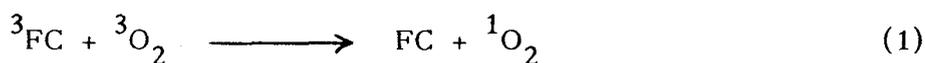
#### a) Les photoproduits

La nature et la quantité des photoproduits obtenus par irradiation UV des FC sont très diversifiées. La formation de dimères de type cyclobutanique à partir de la liaison 3,4 est très fréquente. De plus, en solution et en présence d'oxygène, on obtient de nombreux produits d'oxydation qui, pour la plupart, n'ont pas été identifiés. Seuls des composés d'ouverture du cycle furannique ont été décrits<sup>11</sup>. Néanmoins, les rendements, bien que très variables d'une FC à l'autre, restent faibles. Ces réactions sont en général liées à la réactivité de l'état excité triplet de la FC bien que dans certains cas (en particulier avec les dihydro-4',5' FC) on ne puisse exclure la participation de l'état singulet<sup>12</sup>.

On a noté une réactivité particulière du 3-CPs<sup>13</sup>. En solution aqueuse ou alcoolique, on a ainsi évoqué la possibilité de former (i) des adduits avec le solvant sur la liaison 4',5' (ii) des dimères cyclobutaniques par réaction entre les liaisons 3,4 d'une molécule et 4',5' d'une autre, et enfin (iii) des produits d'ouverture du cycle furannique.

### b) L'oxygène singulet

Il semble probable que la formation d'oxygène singulet contribue, au moins en partie, aux effets des FC sur les systèmes biologiques (mécanisme de type II). Ce sera une des voies de désactivation de l'état triplet ( $^3\text{FC}$ ) selon le schéma :



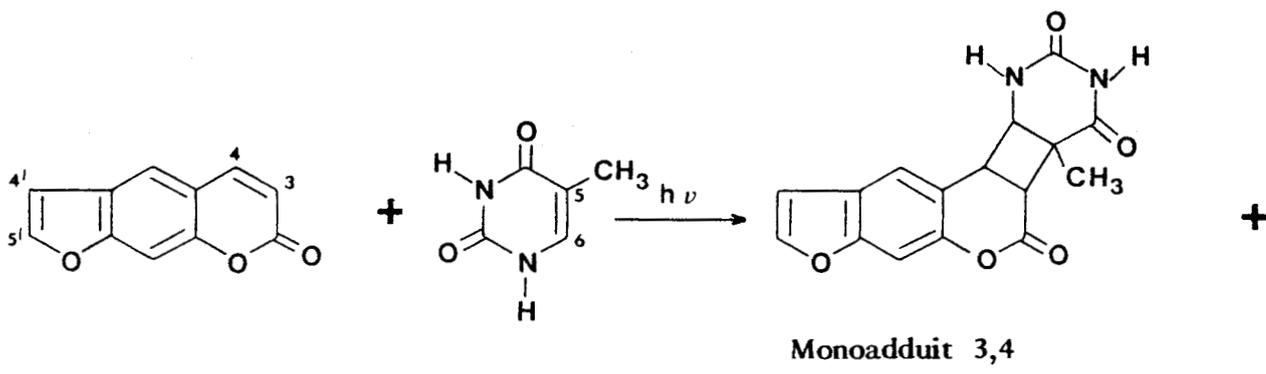
Cependant, les FC pourront également réagir directement avec  $^1\text{O}_2$  et l'éliminer du système d'après :



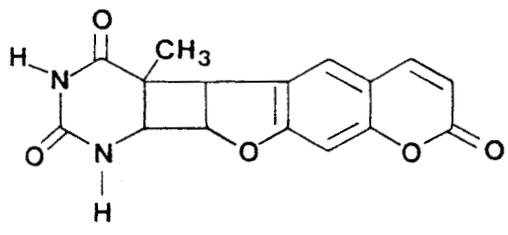
### c) Les bases des acides nucléiques et l'ADN

Les photoréactions des FC avec les bases des acides nucléiques (les pyrimidines en particulier) sont bien connues<sup>6e,15</sup>. On pense généralement qu'elles ont lieu en plusieurs étapes. Dans un premier temps, les FC sont capables de s'insérer entre deux paires de bases de l'ADN, même en absence de lumière, pour former un complexe dit d'intercalation. L'absorption de la lumière par la FC conduit ensuite à une addition entre les liaisons 3,4 ou 4',5' et la liaison 5,6 de la base pyrimidique se traduisant par l'établissement d'un premier pont cyclobutane. Deux types de monocycloadduits sont ainsi obtenus : 3,4 et 4',5'. Dans un deuxième temps, et selon la structure de la FC utilisée, une nouvelle addition peut se produire entre la double liaison restante et une autre molécule de base. Celle-ci résulte de l'absorption de la lumière par le monoadduit. Le bisadduit formé alors provoque la réticulation de l'ADN : les deux brins sont liés de façon covalente. La figure 3 résume la formation des mono et bisadduits dans le cas de la thymine et du psoralène.

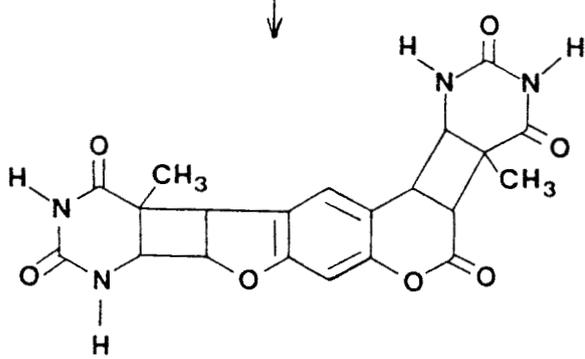
Les spectres d'absorption de ces adduits sont différents de celui de la FC de départ. Ainsi, l'adduit 3,4 n'absorbe pas au-delà de 300 nm, alors que l'adduit 4',5' absorbe jusqu'à 380 nm. La longueur d'onde utilisée en PUVAthérapie étant généralement de 365 nm, il est logique de penser que la formation du bisadduit se fera préférentiellement à



Monoadduit 4',5'



$h\nu$



Bisadduit 3,4,4',5'



Figure 3

Structure des principaux adduits obtenus lors de la photoréaction entre le psoralène et la thymine.

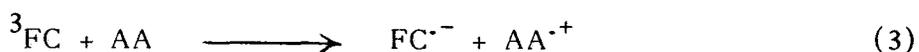
partir d'un monoadduit 4',5'.

La réaction est identique quand on remplace les bases par leurs nucléosides ou leurs nucléotides.

Le précurseur de la cycloaddition semble être majoritairement l'état triplet de la FC. Dans certains cas, l'état singulet ainsi que des réactions de transfert de charge conduisant au radical anion de la FC ont également été suggérées<sup>6d</sup>. Mais le mécanisme de la cycloaddition reste encore mal connu et l'isolement et la caractérisation des photo-adduits n'ont fait l'objet que de travaux très récents<sup>15,16</sup>.

#### d) Les amino-acides et les protéines

L'action des FC sur les acides aminés est considérablement moins étudiée. Il a cependant été montré que leur état excité triplet était efficacement inhibé par les amino-acides aromatiques en particulier<sup>17</sup> : tryptophane, tyrosine, histidine. Il est généralement admis que cette désactivation se fait selon une réaction de transfert de charge du type :



Cette réaction a lieu aussi bien avec le psoralène, le dihydro-4',5' psoralène ou le cycloadduit 4',5' du psoralène avec la thymine. En plus de ce processus, on a également mis en évidence la possibilité de formation d'adduits et de complexes de type covalent des FC avec les protéines<sup>18</sup>.

#### 4 - Conclusion

Bien que l'ADN ne soit pas la seule cible de l'activité photo-sensibilisante des FC au niveau des constituants cellulaires, une place privilégiée lui est accordée. En effet, les FC sont en général classées vis-à-vis de leur réactivité avec l'ADN. Celles qui sont capables de former à la fois des mono et bisadduits sont ainsi dites "bifonctionnelles". Les autres, pour lesquelles seule une monoaddition est possible soit pour des raisons d'ordre stérique, soit à cause de la présence de

substituants sur l'un des sites réactifs (double liaison 3,4 ou 4',5'), sont dites "monofonctionnelles". Comme les monoadduits sont beaucoup plus facilement détruits par les mécanismes de réparation cellulaire que les bisadduits, les pouvoirs mutagène et cancérigène des dérivés monofonctionnels seront réduits<sup>19</sup>.

Dans la recherche de nouvelles molécules utilisables en PUVA-thérapie avec des risques limités, ce critère est prépondérant. On s'oriente ainsi vers la synthèse de molécules monofonctionnelles pour essayer de remplacer les dérivés actuellement utilisés qui sont bifonctionnels : 8-MOP, 5-MOP ou TMP. Deux types de composés sont ainsi principalement étudiés : les psoralènes substitués sur les sites 3,4 et (ou) 4',5' (Institut Curie, Paris et Orsay) et les angélicines (Université de Padoue, Italie). Plus récemment, de nouvelles voies se sont ouvertes vers des molécules possédant d'autres structures : les pyranocoumarines et les naphthofurannes<sup>20</sup>.

Il semblerait cependant que les effets photobiologiques des FC ne puissent pas être uniquement reliés à leur faculté d'induire des lésions spécifiques sur la molécule d'ADN. Il est clairement établi que les FC qu'elles soient mono ou bifonctionnelles provoquent la formation d'oxygène singulet et interagissent également avec certaines protéines. Les conséquences de ces deux dernières propriétés photochimiques sur le plan de l'activité photobiologique de la FC restent cependant très discutées. D'après certains travaux, leur corrélation avec des effets secondaires néfastes n'est pas évidente<sup>21</sup>, tandis que d'autres semblent prouver le contraire<sup>22</sup>.

Nous avons mis en présence différentes FC et des acides aminés aromatiques et par l'étude des effets de photo-CIDNP ainsi obtenus nous avons comparé leur réactivité et essayé de la corréler aux résultats que nous venons d'exposer.

### III - ETUDE COMPAREE DE L'ACTIVITE PHOTOCHEMIQUE DE DIFFERENTES FUROCOUMARINES PAR CIDNP

La liste et les formules des FC que nous avons utilisées sont indiquées sur le tableau I. Leurs spectres d'absorption sont donnés sur le tableau II. Nous présenterons nos résultats en donnant une description plus détaillée de spectres obtenus avec des molécules que nous avons choisies comme modèles, puis en indiquant les principales différences (ou similitudes) existant entre chacune d'elles.

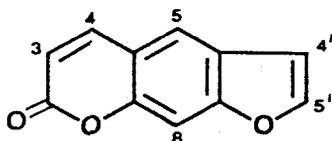
#### 1 - Le choix du solvant

Il nous a été suggéré par les considérations suivantes. La trop faible solubilité des FC utilisées dans l'eau pure ne nous a malheureusement pas permis le choix de ce solvant "biologique". Nous nous sommes donc reportés vers les solvants ayant généralement servi dans les autres études de nature physico-chimique sur ce type de composés. Dans l'acétonitrile, nous avons ainsi remarqué que les principales polarisations provenaient des psoralènes de départ et que, dans nos conditions d'irradiation et d'enregistrement des spectres, des signaux provenant d'adduits ou de dimères de la photoréaction restaient peu ou pas visibles. Ceci n'est pas le cas dans le méthanol où les intensités des polarisations correspondant à des produits de dimérisation sont bien plus importantes. Néanmoins, dans ce dernier solvant, les polarisations sur les psoralènes et les substrats utilisés sont comparables à celles obtenues dans l'acétonitrile.

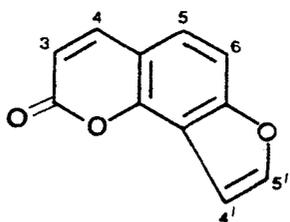
D'autre part, l'intensité des polarisations obtenues dans des solvants de faible constante diélectrique (benzène, chloroforme) est considérablement réduite. Nous rapporterons donc ici, de façon plus détaillée, l'étude effectuée dans l'acétonitrile où la réaction semble plus "propre" et nous mentionnerons toutefois quelques particularités liées à l'utilisation du méthanol.

#### 2 - Les conditions expérimentales

Hormis les applications "classiques" de la CIDNP, le but de notre

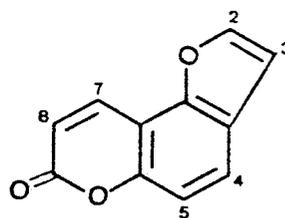


PSORALENES	ABBREVIATION	SUBSTITUANTS
Psoralène	PSO	$R_3=R_4=R_5=R_8=R_{4'}=R_{5'}=H$
Méthoxy-5 Psoralène (Bergaptène)	5-MOP	$R_5=OCH_3$
Méthoxy-8 Psoralène (Xanthotoxine)	8-MOP	$R_8=OCH_3$
Triméthyl -4,5',8 Psoralène	TMP	$R_4=R_{5'}=R_8=CH_3$
Hydroxy-5 Psoralène (Bergaptol)	5-OHPs	$R_5=OH$
Bromo-5 Méthoxy-8 Psoralène	5-Br 8-MOP	$R_5=Br ; R_8=OCH_3$
Dihydro-4',5' Psoralène	dHPs	
<b>SUBSTITUES EN 3</b>		
Carbéthoxy-3 Psoralène	3-CPs	$R_3=CO_2C_2H_5$
Cyano-3 Psoralène	3-CNPs	$R_3=CN$
Acétyl -3 Psoralène	3-AcePs	$R_3=Ace$
Carbéthoxy-3 Méthyl-8 Psoralène	8-Me 3-CPs	$R_3=CO_2C_2H_5 ; R_8=Me$
Butyroyl-3 Psoralène	3-ButPs	$R_3=COCH_2CH_2CH_3$
Dicarbéthoxy-3,5' Méthyl-8 Psoralène	8-Me diCPs	$R_3=R_{5'}=CO_2C_2H_5 ; R_8=Me$
Dihydro-4',5' Carbéthoxy-3 Psoralène	dH3-CPs	$R_3=CO_2C_2H_5$



#### ISOPSORALENES

- Angélicine : ANG



#### ALLOPSORALENES

- Carbéthoxy-8 Furo(2,3-f)coumarine

3i-CPs :  $R_8 = CO_2C_2H_5$

- Carbométhoxy-2 furo(2,3-f)coumarine

5'-MeOiPs :  $R_2 = CO_2CH_3$



**TABLEAU I : NOMS ET FORMULES DES FUROCOUMARINES UTILISEES.**

	Masse Molaire	Spectres d'absorption	
FUROCOUMARINE	M	$\lambda_{max}$ (nm) ( )épaulement	D.O. (365 nm)
PSO	186	244/295/(335)	0,07
5-MOP	216	313/325	
8-MOP	216	246/302	0,07
TMP	228	250/295/(340)	> 0,1
5-OHPs	202		
5-Br 8-MOP	295		
dHPs	188	247/295/324	0,12
3-CPs	258	247/318/(365)	0,32
3-CNPs	211	247/321/(365)	0,33
3-AcePs	228	248/324/(365)	0,43
8-Me 3-CPs	272	247/324	0,04
3-ButPs	256	247/322/(365)	0,16
8-MediCPs	344	276,5/322/365	0,03
dH3-CPs	260	251/307/(365)	1,29
ANG	186	246/301/(325)	0,01
3-iCPs	258	245/320/(370)	0,06
5'-MeOiPs	244	264/326	0,09

**TABLEAU II** : SPECTRES D'ABSORPTION DES FUROCOUMARINES UTILISEES  
(ESSENTIELLEMENT D'APRES AVERBECK ET AL.)<sup>23</sup>



travail était de mettre au point un protocole expérimental permettant d'évaluer de façon simple et rapide la photoactivité (toxicité) de furocoumarines comme nous l'avons fait précédemment pour les phénothiazines. Nous n'avons pas pu réutiliser un système eau/nucléobases à cause du double problème du solvant (vide supra) et du substrat. L'irradiation des psoralènes en présence de nucléobases (ou nucléosides et nucléotides ne provoque pas d'effet de CIDNP sur ces derniers, que ce soit dans l'acétonitrile ou le méthanol\*. Par contre, nous avons remarqué qu'en présence d'acides aminés aromatiques, et en particulier de la tyrosine (TyrOH), de fortes polarisations sont visibles sur le substrat biologique. Il est à noter que cette étude préliminaire a été principalement menée avec le carbéthoxy-3 psoralène (3-CPs) qui nous a servi de molécule de référence. Ce composé avait en effet suscité beaucoup d'espoir au début de son utilisation. Tout en possédant une remarquable photoréactivité, il ne semblait pas devoir provoquer les effets secondaires néfastes observés avec les molécules alors sur le marché : 5-MOP, 8-MOP ou TMP. Ses propriétés physico-chimiques, chimiques, biologiques, thérapeutiques ont donc été bien décrites<sup>24</sup>. Parallèlement au 3-CPs, nous avons testé, pour notre méthode, les 5-MOP et 8-MOP afin de pouvoir détecter des différences de comportement vis-à-vis des substrats choisis. Nous avons ainsi remarqué que l'intensité des polarisations sur la tyrosine dépendait fortement du dérivé furocoumarinique utilisé. Un nouveau problème s'est alors posé car il s'est avéré, qu'irradiée par tout le spectre d'émission de la lampe nous servant de source excitatrice, la tyrosine présentait des effets de CIDNP indépendamment de la présence du psoralène. L'utilisation d'un filtre coupant les longueurs d'onde situées en dessous de 330 nm (au-delà desquelles la TyrOH et les autres acides aminés utilisés n'absorbent pas)<sup>25</sup> s'est donc avérée nécessaire. Ce filtre transmet plus de 60% de la radiation lumineuse à 365 nm (cf partie expérimentale, Chap. V) couramment utilisée en PUVAthérapie. Nous avons constaté que dans ces conditions, les effets de CIDNP sur la TyrOH n'existaient plus quand elle était irradiée seule et subsistaient en présence de FC. Des résultats semblables sont obtenus avec la L-dihydroxy-3,4 phénylalanine (L-Dopa, analogue de la TyrOH) hormis certains problèmes de solubilité.

\* A de faibles concentrations, situées au seuil de la limite de détection de notre spectromètre, nous observons des polarisations peu intenses pouvant être dues à d'éventuels adduits. Les spectres sont souvent complexes. Lors de l'addition de plusieurs FID consécutifs, nous nous heurtons au problème de l'accumulation de dimères susceptibles eux-mêmes de provoquer des effets de CIDNP.

Nous avons donc retenu le système filtre/acétonitrile/TyrOH/FC pour notre étude comparative. Le choix de la TyrOH présente, en plus, deux autres points d'intérêt : (i) ce dérivé (ainsi que la L-Dopa) est considéré comme un précurseur de la mélanine qui est le pigment de la peau et (ii) il semblerait constituer la cible privilégiée d'attaque des FC au niveau des protéines<sup>18a</sup>. Mais avant de passer à l'exposé de ces résultats, nous considérerons auparavant brièvement l'irradiation des FC seules et leur réactivité vis-à-vis de quelques autres acides aminés aromatiques.

### 3 - Résultats

#### a) Psoralènes seuls

Nous rappellerons tout d'abord, les résultats obtenus dans ce domaine par ANDERS et al<sup>26</sup>. Ces auteurs ont montré, qu'irradiés dans des solutions de DMSO ou des mélanges DMSO-eau, le psoralène, son dérivé dihydro-4',5', le 8-MOP et la coumarine conduisaient à des effets de CIDNP. Ces effets résultent essentiellement de la formation de dimères du type cyclobutanique au niveau de la liaison 3,4 des psoralènes. Ils ont également constaté que l'intensité de ces effets diminuait en passant du DMSO, au DMF, à l'acétonitrile et au méthanol, pour devenir nulle dans le dioxanne ou le chloroforme. D'après eux, cette intensité n'est cependant pas affectée par la durée des périodes d'irradiation et les spectres décrits sont ceux obtenus après addition de 100 à 200 FID (5 à 10 mn d'irradiation). D'autre part, les dimères ainsi formés donnent également des spectres polarisés lorsqu'ils sont irradiés dans les mêmes conditions. Ces polarisations correspondent à la reformation du monomère. Après irradiation, ces auteurs observent encore l'apparition de nouveaux signaux (non polarisés) dus à la formation de photoproduits. Ces phénomènes peuvent s'avérer gênants lorsque les psoralènes sont irradiés soit trop longtemps soit en présence de substrats. Il deviendra alors très délicat d'identifier les entités responsables des signaux polarisés. C'est pourquoi nous avons essayé de réduire au maximum les durées d'irradiation (1 mn 30 à 2 mn) afin d'éviter l'accumulation de photoproduits et d'enregistrer les spectres à l'aide d'un seul FID.

Dans ces conditions, en comparant les différents systèmes

FC/acétonitrile/filtre, nous pouvons faire les constatations générales suivantes. Les intensités des effets de CIDNP observés sont très sensibles à la concentration des dérivés furocoumariniques. Les polarisations lorsqu'elles existent ne sont plus visibles, ou deviennent très faibles, au delà du seuil de  $50 \cdot 10^{-3}$  M ( $5 \cdot 10^{-3}$  M même dans certains cas, tel le 5-MOP). Nous utilisons donc généralement des concentrations comprises entre  $10^{-3}$  et  $5 \cdot 10^{-3}$  M. Le tableau III regroupe les valeurs des déplacements chimiques en RMN des protons des FC étudiées, alors que le tableau IV précise les effets de CIDNP montrés par chacun d'eux.

Toutes les FC ne sont pas polarisées quand elles sont irradiées seules dans l'acétonitrile, et cela indépendamment de leur caractère mono ou bifonctionnel. Cependant, les polarisations les plus importantes sont toujours obtenues au niveau de la double liaison du cycle pyrone (3,4) : E pour H-3, A pour H-4. Les polarisations de signaux provenant d'éventuels photoproduits (dimères, adduits, dégradation, ...) sont faibles dans la plupart des cas, au moins avec des temps d'irradiation courts, tels que ceux que nous avons choisis. Les plus importantes concernent le 5-MOP (entre 9 et 10 ppm), le 3-iCPs (vers 8,5 ppm) et le 3-AcePs (2,5 ppm) et se manifestent toujours sous forme de singulets.

D'un point de vue plus ponctuel, nous pouvons remarquer que :

- parmi les dérivés bifonctionnels d'usage courant, seul le 5-MOP est polarisé (exclusivement sur les protons 3 et 4 - fig. 4),
- le bergaptol, a priori inactif, montre de l'absorption exaltée pour H-4' ou H-8 (les glissements chimiques de ces deux protons sont trop voisins pour les distinguer pendant l'irradiation),
- la présence de brome en -5 modifie la non-réactivité du 8-MOP,
- le 3-CPs (très faiblement polarisé) et le 3-CNPs (pas du tout) ont un comportement différent des autres dérivés substitués en position -3 étudiés. La présence d'un groupement méthyle en position -8, ou celle d'un second groupement carbethoxy en -5', ne modifie pas ce comportement,
- les FC possédant une fonction carbonyle en  $\alpha$  du substituant placé en -3 sur le cycle FC (3-AcePs et 3-ButPs) sont fortement polarisées à la fois sur le cycle (3,4, 4',5' et même 8) et sur les protons de la chaîne latérale portés par les carbones adjacents à la fonction carbonyle (cf fig. 5 par exemple),

FC	$\delta$ H	3	4	5	8	4'	5'	DIVERS
PSO		6,31(d)	7,93(d)	7,82	7,48	6,94(d)	7,79(d)	
5-MOP		6,22(d)	8,18(d)		7,16	7,17(d)	7,72(d)	OCH <sub>3</sub> 4,26
8-MOP		6,32(d)	7,91(d)	7,51		6,92(d)	7,80(d)	OCH <sub>3</sub> 4,20
TMP		6,20		7,68		6,53		CH <sub>3</sub> à 2,52 ; 2,47 et 2,46
5-OH Ps		6,19(d)	8,19(d)		7,04	7,05(d)	7,67(d)	
5-Br 8-MOP		6,43(d)	8,17(d)			6,95(d)	7,89(d)	COCH <sub>3</sub> 4,22
dHPs		6,13(d)	7,74(d)	7,37	6,69	3,24(t)	4,67(t)	
3-CPs			8,69	7,99	7,52	6,98(d)	7,84(d)	CH <sub>3</sub> 1,36(t) - OCH <sub>2</sub> 4,34(q)
3-CNPs			8,61	7,98	7,60	7,01(d)	7,88(d)	
3-AcePs			8,61	8,04	7,54	6,98(d)	7,84(d)	COCH <sub>3</sub> 2,61
8-Me 3-CPs			8,67	7,84		6,96(d)	7,85(d)	CH <sub>3</sub> 1,36(t) - 8-CH <sub>3</sub> 2,55 OCH <sub>2</sub> 4,33(q)
3-ButPs			8,59	8,03	7,54	6,98(d)	7,84(d)	CH <sub>3</sub> 0,97(t) - CH <sub>2</sub> - $\beta$ 1,60 (m) - CH <sub>2</sub> - $\alpha$ 3,03 <sup>2</sup> (t)
8-MediCPs			8,67	7,97		7,65		CH <sub>3</sub> 1,39 et 1,36(t) OCH <sub>2</sub> 4,35 et 4,41 (q) 8-CH <sub>3</sub> 2,57
dH3-CPs			8,50	7,50	6,71	3,26(t)	4,72(t)	CH <sub>3</sub> 1,33(t) OCH <sub>2</sub> 4,30(q)
ANG	H	3	4	5	6	4'	5'	
		6,34(d)	7,95(d)	7,51	7,51	7,05(d)	7,67(d)	
	H	8	9	4	5	3	2	
3-iCPs			8,88	7,93(d)	7,27(d)	6,99(d)	7,89(d)	CH <sub>3</sub> 1,37(t) OCH <sub>2</sub> 4,36(q)
5'-MeOiPs		6,52(d)	8,26(d)	7,90(d)	7,33(d)	7,65		OCH <sub>3</sub> 3,93



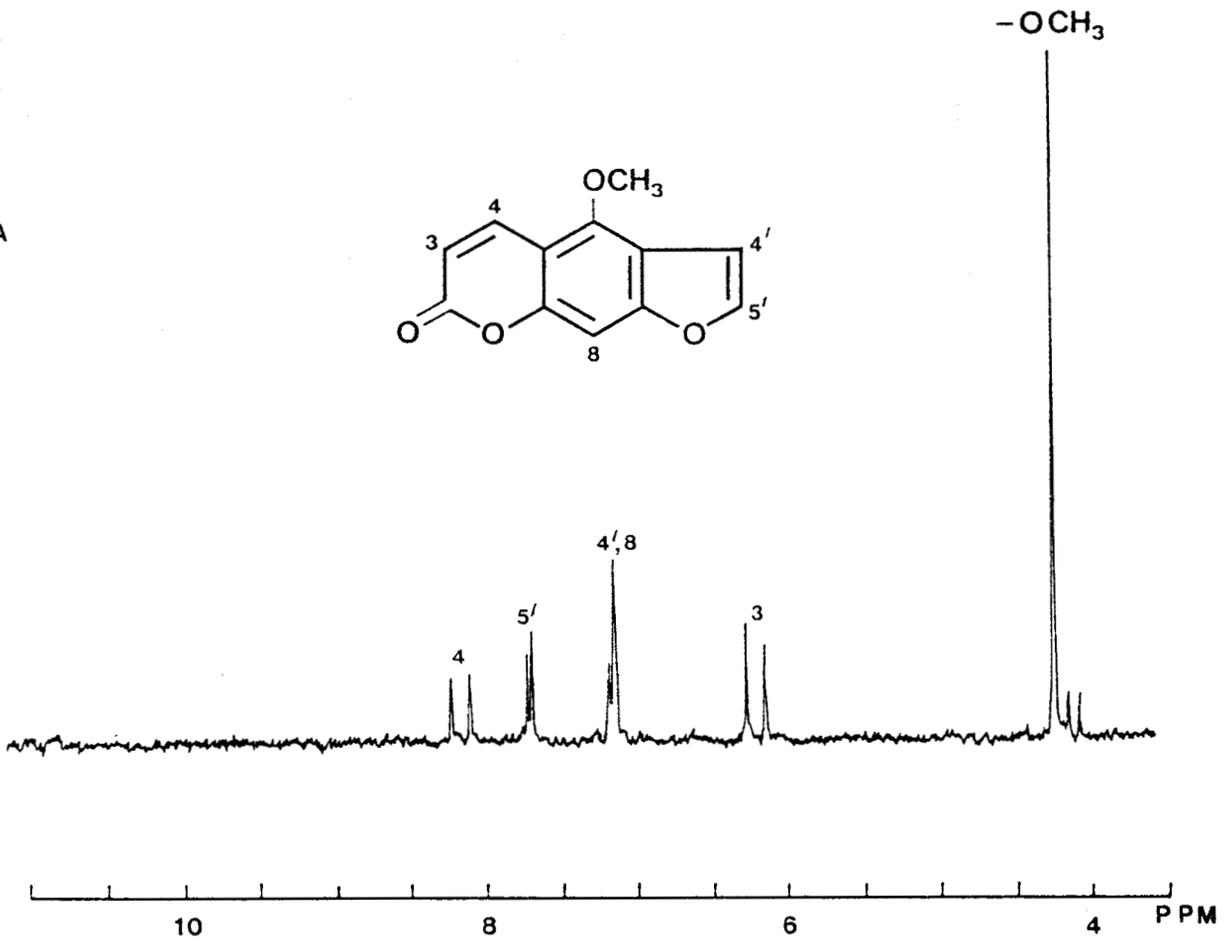
TABLEAU III : SPECTRES RMN-<sup>1</sup>H DES FUROCOUMARINES UTILISEES (Solvant : CD<sub>3</sub>CN -  $\delta$  : ppm/TMS)  
d : doublet ; t : triplet ; q : quadruplet ; m : multiplet

FC	H	3	4	5	8	4'	5'	
								D I V E R S E S
PSO		-	-	-	-	-	-	
5-MOP		E	a		-	-	-	Nouveaux singulets entre 9 et 10 ppm
8-MOP		-	-	-	-	-	-	
TMP		-		-		-		
5-OHPs		-	-		?	?	-	- Consommation du produit pendant hν ? - Superposition des signaux de 4' et 8 (A)
5-Br8-MOP		E	a?			-	-	
dHPs		-	-	-	-	-	-	
3-CPs			-	-	-	e	e	
3-CNPs			-	-	-	-	-	
3-AcePs			A	e	E	E	e	COCH <sub>3</sub> -E Nouveau pic vers 2,5 ppm
8-Me 3-CPs			-	-		-	-	
3-ButPs			A	-	e?	e?	e	CH <sub>2</sub> -α: E
8-MediCPs			-	-		-		
dH3-CPs			A	e	e	-	-	Accumulation d'un nouveau produit
	H	3	4	5	6	4'	5'	
ANG		-	-	-	-	-	-	
	H	8	9	4	5	3	2	
3-iCPs			A	E?	e?	E	e?	Nouveaux singulets à 8,3 et 8,5 ppm
5'-MeOiPs		-	-	-	-	-		



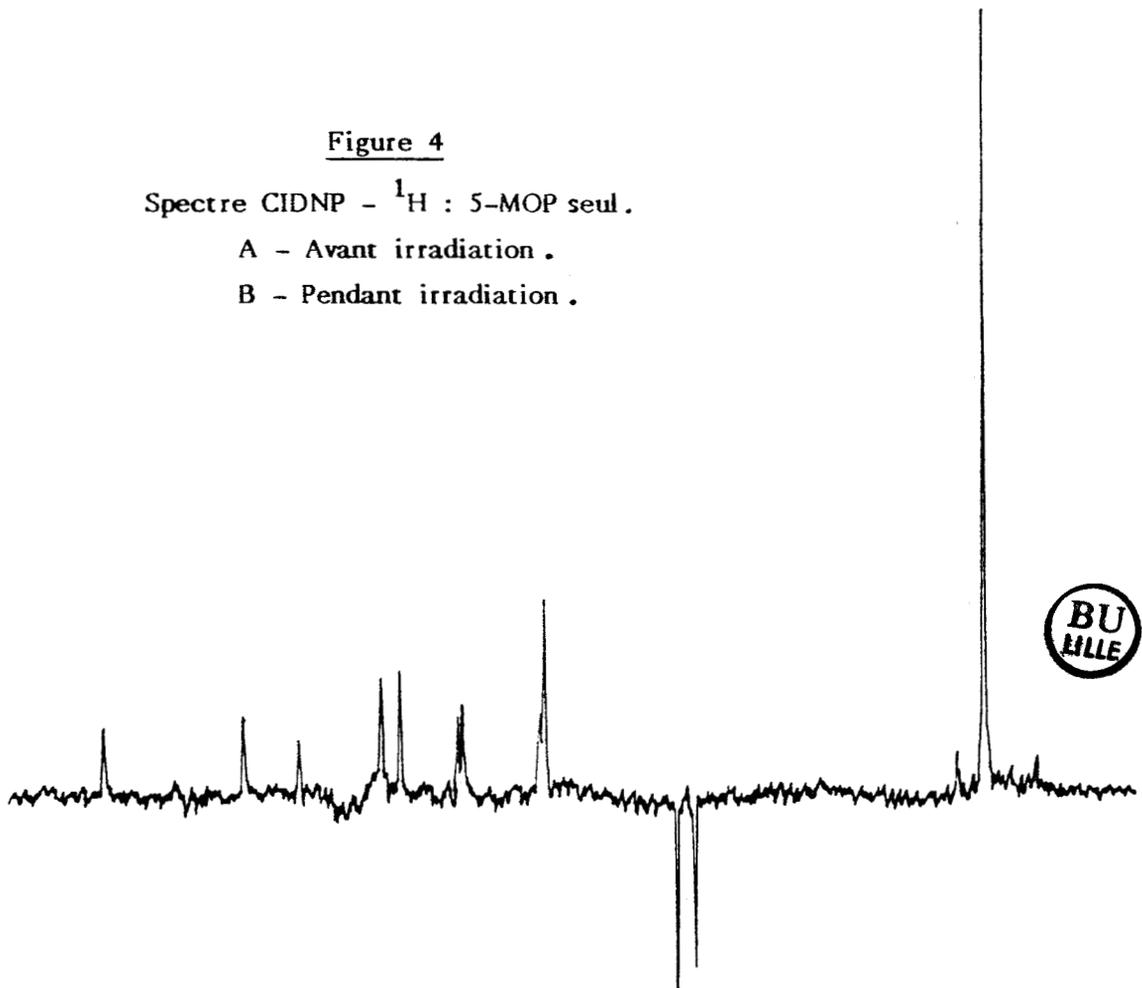
**TABLEAU IV** : POLARISATIONS OBSERVEES LORS DE L'IRRADIATION DES FC DANS CD<sub>3</sub>CN, avec filtre  
 E,e : Emission forte, faible  
 A,a : Absorption exaltée forte, faible  
 - : pas de polarisation.

A



B

Figure 4  
Spectre CIDNP -  $^1\text{H}$  : 5-MOP seul.  
A - Avant irradiation .  
B - Pendant irradiation .



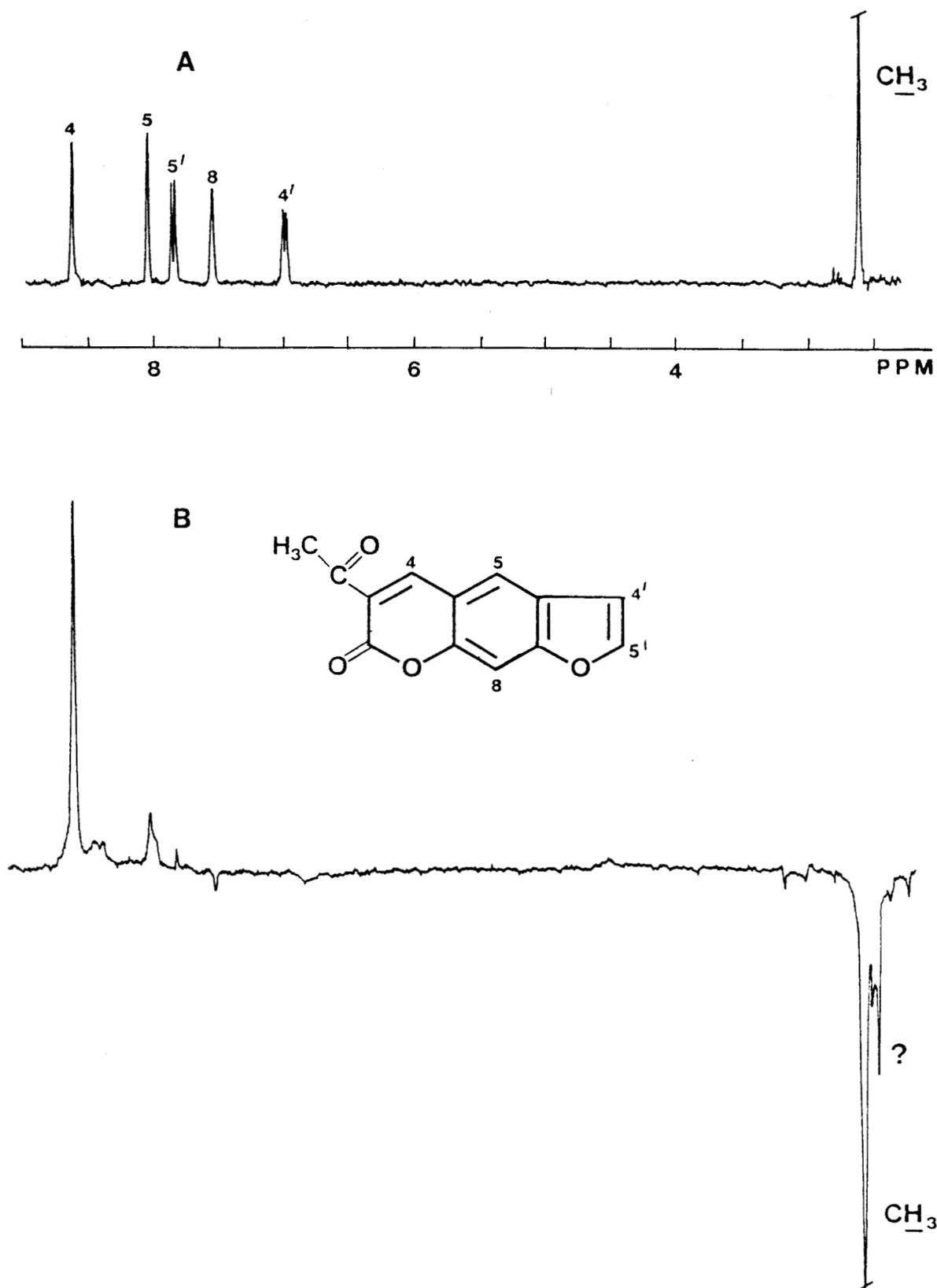


Figure 5

Spectre CIDNP - <sup>1</sup>H : 3-AcePs seul .

A - avant irradiation .

B - pendant irradiation .



- dans le cas du dérivé dihydro-4',5' du 3-CPs, les polarisations observées ne sont pas forcément imputables à ce dérivé seul. En effet, celles-ci augmentent au cours du temps et deviennent beaucoup plus importantes dès le début d'une seconde irradiation. Or, on observe très distinctement l'accumulation rapide d'un photoproduit qui pourrait être alors responsable de ces effets de CIDNP. Ce photoproduit est présent en quantité non négligeable au moment de la seconde irradiation.

- l'angélicine, comme le psoralène, n'est pas polarisée alors qu'au contraire, l'analogue angulaire de 3-CPs, l'est fortement.

Tous les effets de CIDNP décrits ci-dessus résultent d'un effet net. Les spectres obtenus sont en effet identiques lorsqu'ils sont enregistrés avec un angle de flip de  $90^\circ$  ou inférieur à  $20^\circ$  (cf Chap. I). Il n'y a donc pas d'effets de multiplet.

Lorsque les composés sont irradiés avec tout le spectre d'émission de la lampe Xe-Hg, les effets de CIDNP deviennent d'une manière générale plus intenses. L'accumulation de photoproduits est également plus fréquente et plus rapide. Néanmoins, PSO, 8-MOP et dHPs continuent de ne présenter aucun effet, alors que de faibles polarisations sont visibles avec 8-Me 3-CPs, 5'-MeOIPs et 3-CPs.

De notre étude préliminaire dans le méthanol comme solvant<sup>27</sup>, nous retiendrons principalement que pour les FC irradiées seules, les résultats que nous avons obtenus sont dans l'ensemble comparables à ceux que nous venons de décrire.

D'autre part, lorsque nous additionnons plusieurs FID au cours d'une irradiation prolongée (10 à 20 minutes), de nouveaux signaux polarisés ou pas, apparaissent sur le spectre. Ceux-ci sont vraisemblablement dus à la formation de dimères qui peut se révéler très importante. La figure 6a nous montre par exemple le spectre RMN normal obtenu après 20 minutes d'irradiation d'une solution de 3-CPs dans  $CD_3OD$ . On constate ainsi que certains des nouveaux signaux sont aussi intenses que ceux du 3-CPs restant. Dans l'acétonitrile, le phénomène est assez comparable (fig. 6b). Ces nouveaux signaux ne sont pas visibles pour des périodes d'irradiation n'excédant pas 2 minutes. Cependant, si la présence de ces photoproduits ne semble pas trop

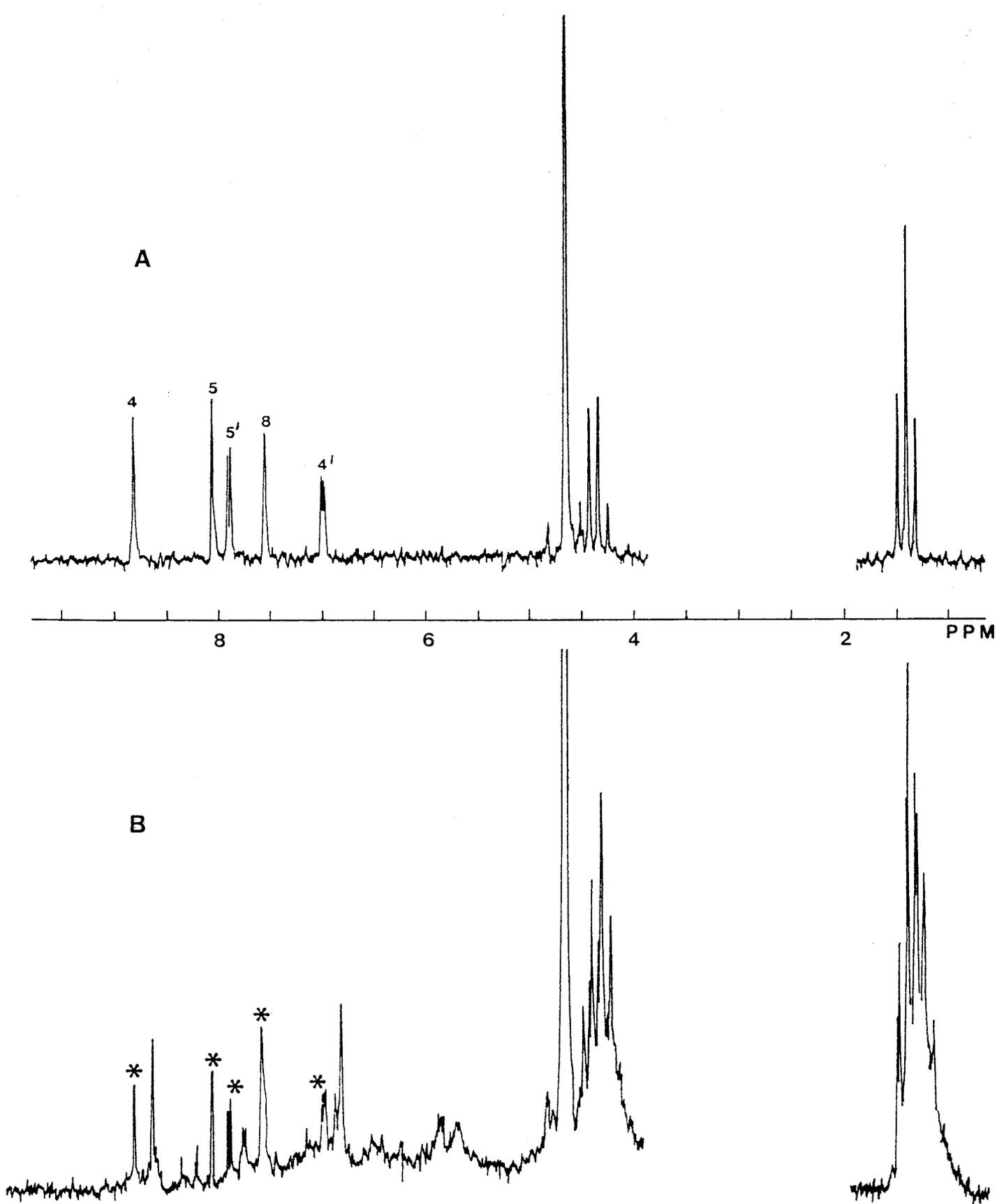


Figure 6a

Comparaison des spectres RMN - <sup>1</sup>H du 3-CPs dans CD<sub>3</sub>OD.

A - avant irradiation .

B - après irradiation .

Les signaux marqués d'un astérisque sur le spectre B sont ceux du 3-CPs .



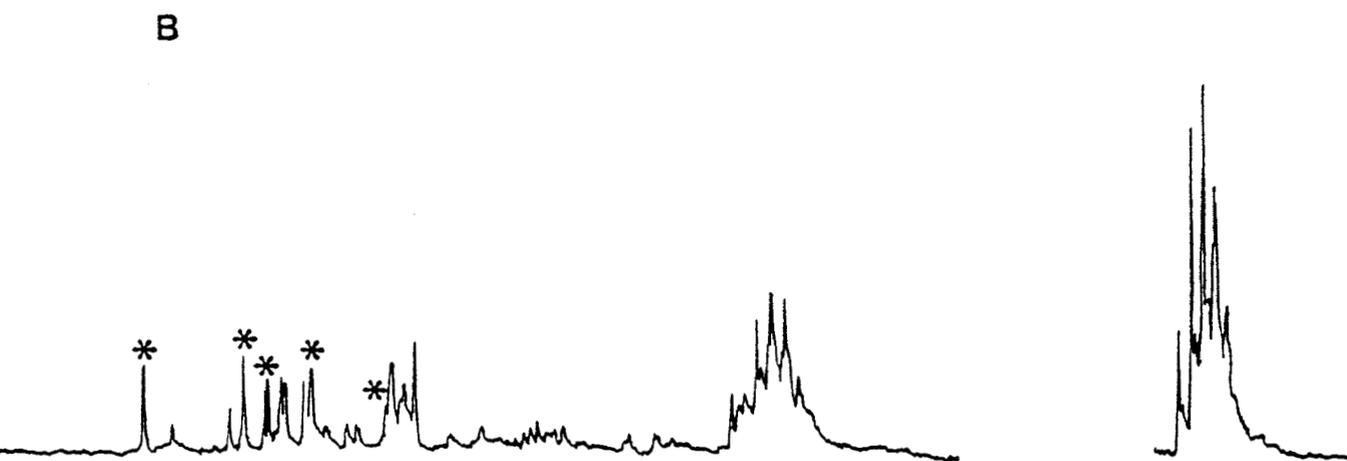
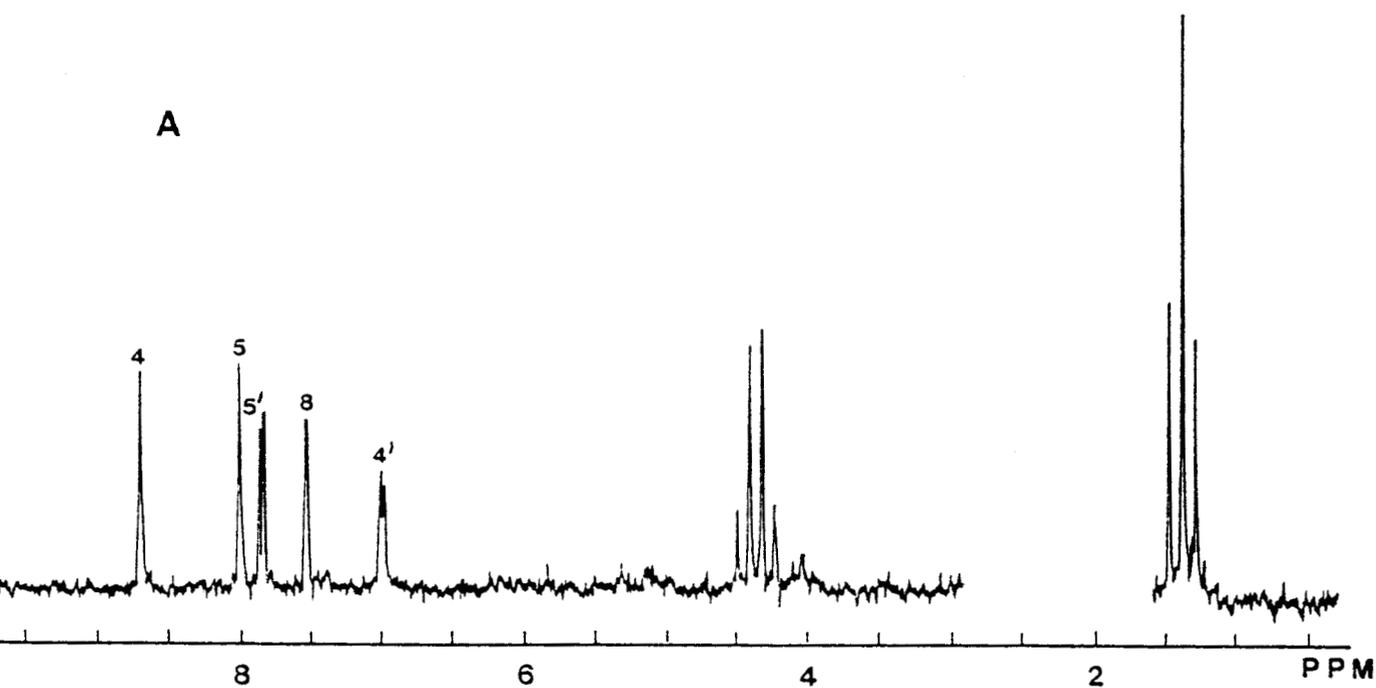


Figure 6b

Comparaison des spectres RMN -  $^1\text{H}$  du 3-CPs dans  $\text{CD}_3\text{CN}$  .

A - avant irradiation .

B - après une irradiation prolongée .

Les signaux marqués d'un astérisque sur le spectre B sont ceux du 3-CPs .



influencer les spectres obtenus avec les FC seules en solution, nous verrons dans le paragraphe suivant qu'elle peut s'avérer plus gênante en présence de substrats biologiques.

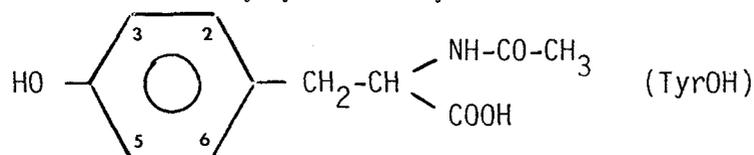
Notons, pour terminer, que les spectres ne sont pas sensibles à la présence ou non d'oxygène dans les solutions.

### b) Psoralènes en présence d'acides aminés

L'utilisation des acides aminés aromatiques en photo-CIDNP a été largement décrite dans la deuxième partie du chapitre II. Nous en montrerons ici une nouvelle application.

Parmi les acides aminés aromatiques les plus usuels, seuls la tyrosine, et à un degré moindre, le tryptophane montrent des effets de CIDNP plus ou moins importants lorsqu'ils sont irradiés dans l'acétonitrile en présence de FC. S'il était prévisible que la phénylalanine ne soit pas polarisée, le résultat est moins attendu avec l'histidine ou la dihydroxy-3,4 phénylalanine (L-Dopa). Mais cela est vraisemblablement dû (vide infra) à la trop faible solubilité de ces deux composés dans ce solvant.

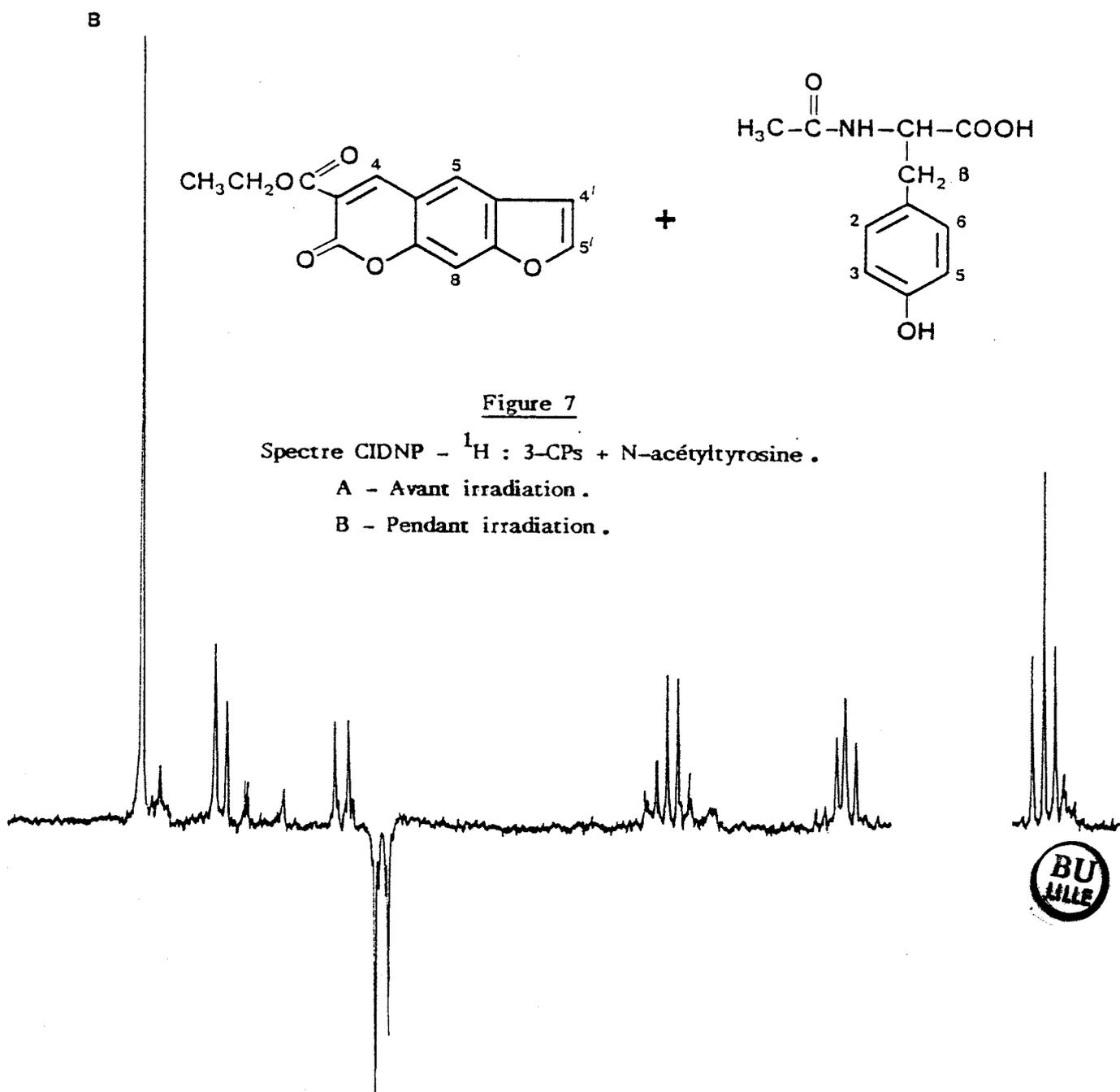
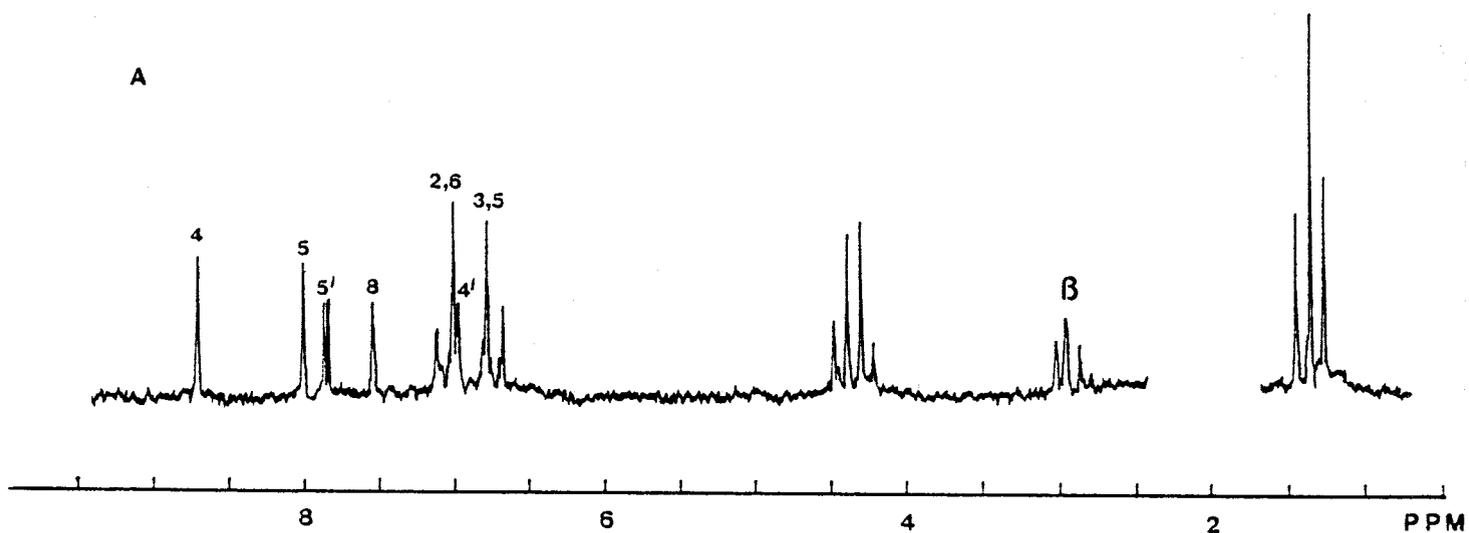
La figure 7 montre un exemple de spectre de CIDNP obtenu avec le 3-CPs et la N-acétyltyrosine (TyrOH) dont la formule est la suivante



Si l'on compare ce spectre avec ceux obtenus avec les autres FC, on constate que les polarisations observées sur TyrOH (quand elles apparaissent) sont toujours les mêmes, à savoir :

- Emission pour les protons 3,5 du cycle aromatique (doublet à 6,71 ppm).
- Absorption exaltée pour les protons méthyléniques  $\beta$  -CH<sub>2</sub> (multiplet vers 3 ppm).
- Faible absorption pour les protons 2,6 du cycle aromatique (doublet à 7,05 ppm).

Seule l'intensité de ces polarisations varie avec la FC utilisée. Ce phénomène est beaucoup moins sensible avec le tryptophane, dont le



spectre RMN est d'autre part plus compliqué. Nous avons donc retenu TyrOH comme cible test et avons reporté sur le tableau V (i) la nature des polarisations sur la FC, (ii) les particularités observées sur certains spectres et (iii) l'intensité des polarisations du doublet correspondant aux protons 3,5 de TyrOH (pour la mesure, cf Chap. V). Il est remarquable de constater que ce dernier paramètre dépend fortement de la nature de la FC utilisée. Ainsi, pour les FC bifonctionnelles, l'intensité des polarisations est généralement nulle (PSO, 8-MOP) ou relativement faible (5-MOP, fig. 8 ou TMP). Par contre, elle devient très importante pour les FC monofonctionnelles (3-CPs, fig. 7 ; 3-AcePs, fig. 9 par exemple).

D'autre part, quand TyrOH est polarisée, la FC l'est également. La nature de ces polarisations est identique à celles observées, lorsqu'elles existent, quand la FC est irradiée seule. H-4 montre toujours de l'absorption exaltée, souvent intense ; H-3 de l'émission, intense également ; H-8 de l'émission faible alors que H-5, 4' et 5' ne sont polarisés que dans certains cas particuliers. De nouvelles raies, correspondant vraisemblablement plus à des dimères qu'à des adduits (visibles déjà avec la FC seule - Tableau IV) apparaissent également entre 8 et 9 ppm. On peut enfin relever quatre cas intéressants :

- 3-CPs et 3-CNPs non polarisés quand ils sont irradiés seuls, induisent pratiquement les plus fortes polarisations sur TyrOH.
- Il en va de même, à un degré beaucoup moindre toutefois, avec les analogues méthylé et disubstitué de 3-CPs : 8-Me 3-CPs et 8-MediCPs.
- Le comportement de l'angélicine est toujours identique à celui du psoralène.
- La formation rapide d'un photoproduit pour dH3-CPs (cf paragraphe précédent) provoque au cours d'une seconde irradiation des effets de CIDNP sur TyrOH d'intensité faible à intermédiaire.

Nous obtenons les mêmes résultats en remplaçant la N-acétyltyrosine par son ester éthylé. Par contre, nous n'observons plus de polarisation (ou du moins elles sont très considérablement réduites) avec la N-acétyl méthoxy-4 phénylalanine. Il faut remarquer toutefois la faible solubilité de ce dernier dérivé dans l'acétonitrile.

Nous retrouvons également pour ces systèmes FC/TyrOH, l'influence

FC	H	3	4	5	8	4'	5'	REMARQUES	I <sub>p</sub>
PSO	-	-	-	-	-	-	-		- 0,4
5-MOP	E	a		-	-	-		Nouveaux pics à 8,8-9,2 et 10,1	- 1,6
8-MOP	-	-	-		-	-			0
TMP	-		-		-			Léger "broadening" des signaux du TMP	- 1,2
5-OHPs	-	-		A	A	A			0
5-Br 8-MOP	E	a?			-	-			0
dHPs	-	-	-	-	-	-			0
3-CPs		A	e	e	e	e		Nouveaux pics à 8,2-8,6 et 8,7	-18
3-CNPs		A	-	e	?	e		Nouveaux pics à 8,2-8,3-10 et 10,2 (?)	-30
3-AcePs		A		e	E	e	COCH <sub>3</sub> E	Nouveaux pics faibles.	-25
8-Me 3-CPs		A	-		-	-		Nouveau pic à 8,1	- 6
3-ButPs		A	a?	E	E	e?	CH <sub>2</sub> -α E	Nouveaux pics à ≈ 9 et ≈ 8,5	-22
8-MediCps		a	-		-				- 1
dH 3-CPs		A	E	?	-	-		Accumulation d'un produit	0
ANG	-	-	-	-	-	-			0
3-iCPs		A	E	-	?	-		Nouveaux pics à 8,4 et 8,6	-30
5'-MeOiPs	-	-	-	-	-				0

TABLEAU V : POLARISATIONS OBSERVEES LORS DE L'IRRADIATION DES FC EN PRESENCE DE TyrOH.

I<sub>p</sub> : Intensité de la polarisation des protons H-3 et H-5 du noyau aromatique de la TyrOH (voir tableau VI - durée de l'irradiation : 1 mm 50s).

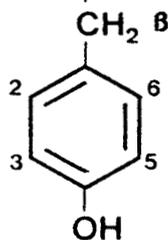
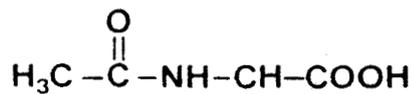
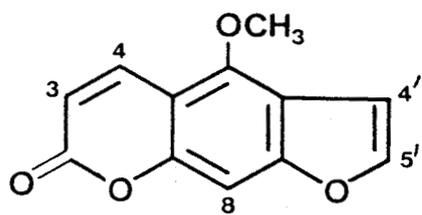
? : Un point d'interrogation désigne soit un signal masqué par TyrOH, soit un signal dont la polarisation n'est pas évidente.

E,e : Emission forte, faible.

A,a : Absorption exaltée forte, faible

- : pas de polarisation.





A

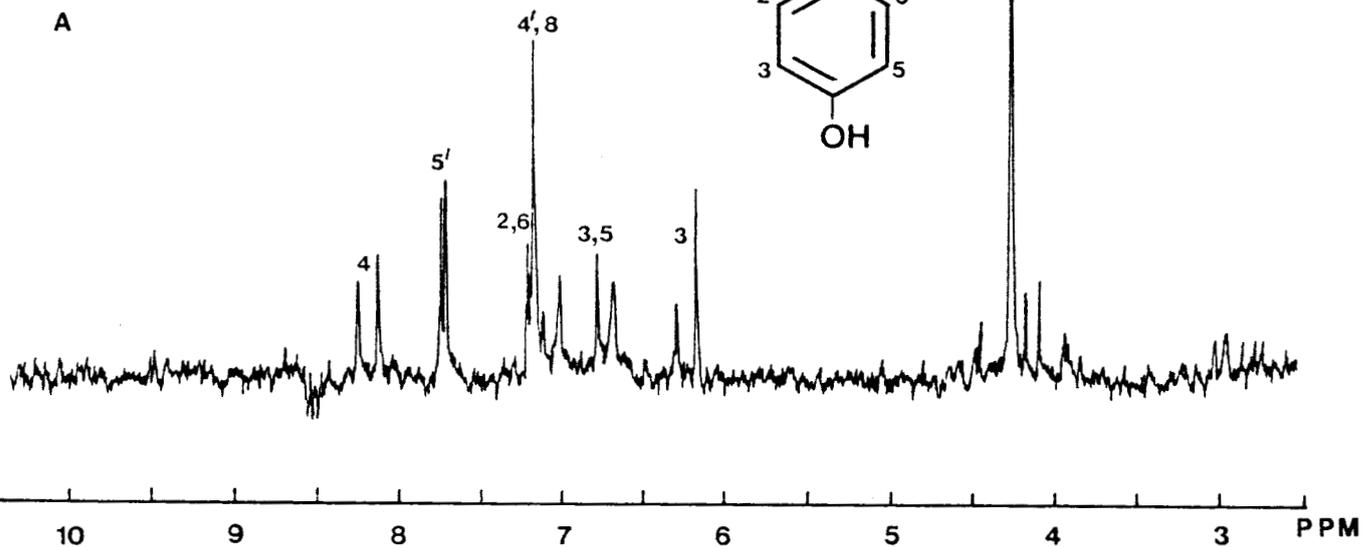


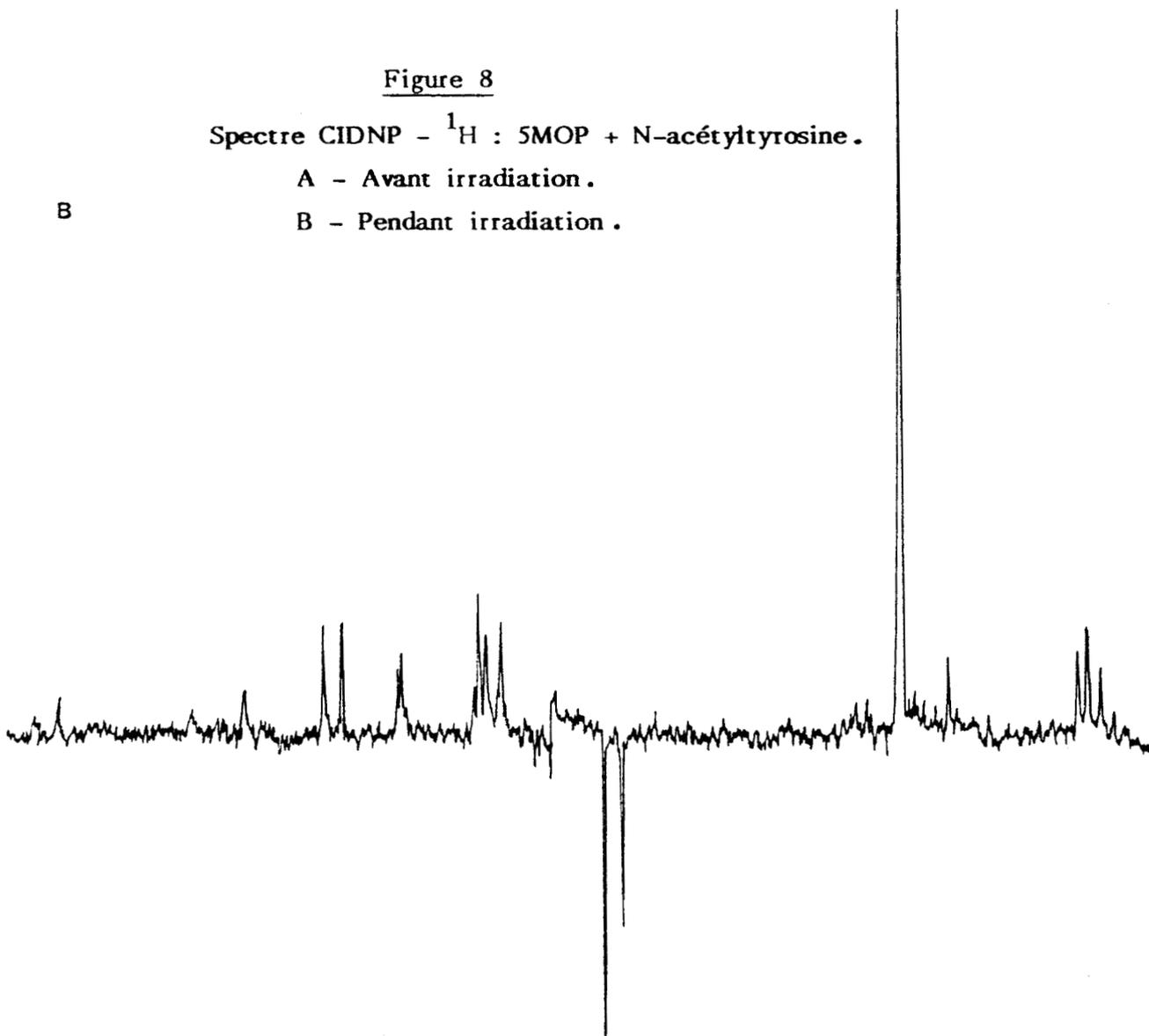
Figure 8

Spectre CIDNP -  $^1\text{H}$  : 5MOP + N-acétyltyrosine.

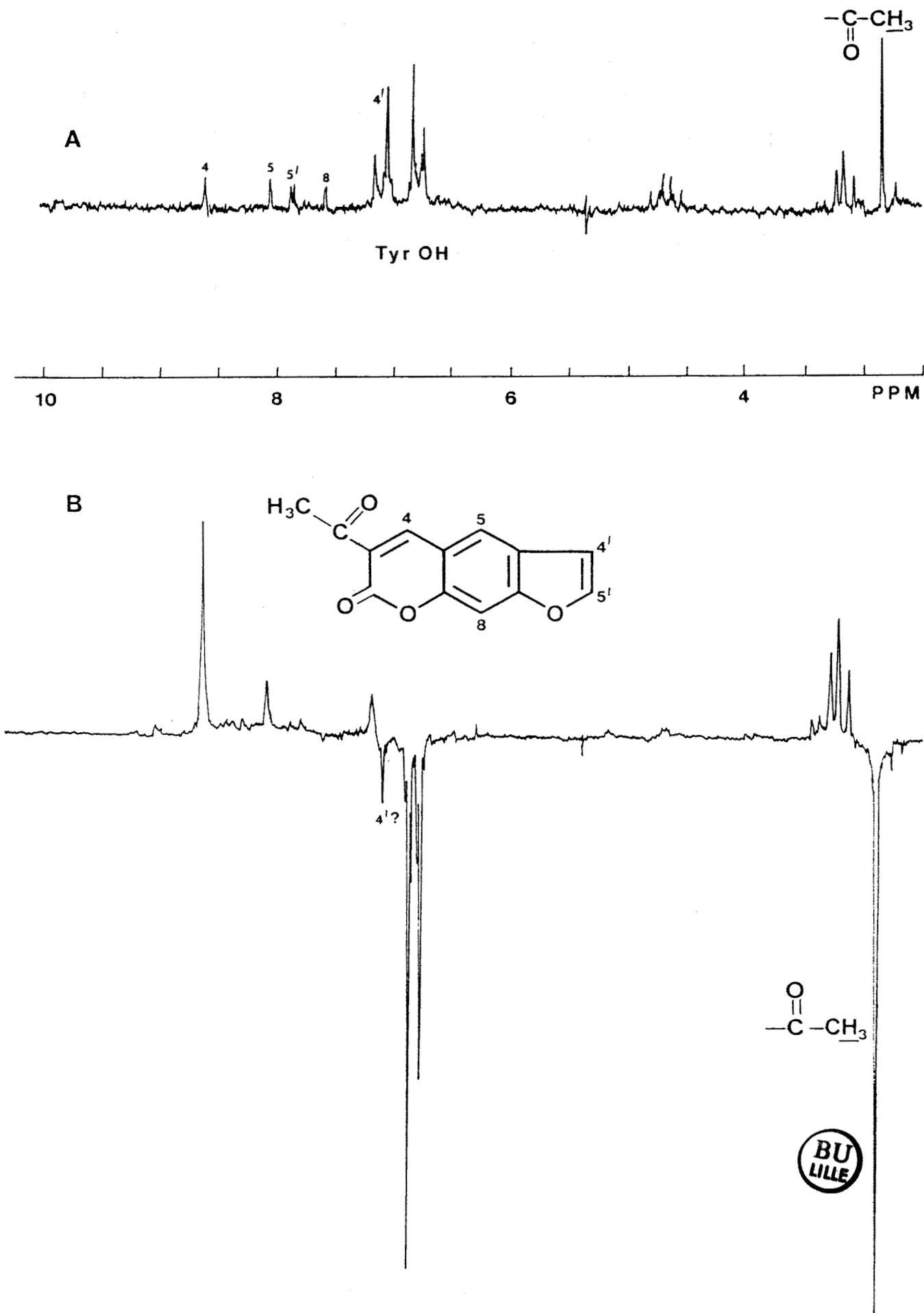
A - Avant irradiation.

B

B - Pendant irradiation.



BU  
LILLE



**Figure 9**

Spectre CIDNP -  $^1\text{H}$  : acétyl-3 psoralène + N-acétyltyrosine .

A - avant irradiation .

B - pendant irradiation .

de la durée de l'irradiation. Elle se manifeste ici, non seulement au niveau de l'accumulation de photoproduits, mais également à celui de la nature des polarisations obtenues. Ceci est vrai en particulier sur le proton H-4 des FC substituées en position -3. Ce proton montre donc de l'absorption exaltée très intense au début de l'irradiation. Mais progressivement, on constate un élargissement de son signal (phénomène de "broadening") pouvant conduire jusqu'à sa disparition totale (consommation du produit).

D'autre part, si généralement la nature des spectres obtenus avec les différentes FC dans le méthanol<sup>27</sup> rappelle celle de ceux obtenus dans l'acétonitrile, on pourra quand même en retenir quelques éléments :

- les signaux provenant de nouveaux photoproduits y sont plus intenses et dans certains cas plus nombreux,
- le solvant peut également être lui-même polarisé (proton alcoolique en émission),
- les meilleures solubilités de l'histidine et de la L-Dopa permettent d'étudier le comportement de ces deux amino-acides.

Les spectres obtenus avec le 3-CP<sub>s</sub> en présence de L-Dopa ou de TyrOH sont ainsi en tous points analogues, avec des polarisations équivalentes sur la L-Dopa et TyrOH. Par contre, l'histidine n'est pas polarisée bien qu'en sa présence 3-CP<sub>s</sub> montre d'importants effets de CIDNP avec la particularité pour H-4 de présenter un "broadening" (et de l'émission ?) dès le début de l'irradiation.

#### 4 - Discussion

Nous pouvons dégager trois aspects importants de nos résultats dans l'acétonitrile :

- La réactivité prépondérante des FC au niveau de la double liaison pyrone 3,4 par rapport à celle de la double liaison furannique 4',5'.
- Les effets de CIDNP sont principalement observés sur les réactifs et peu ou pas sur des photoproduits.

• La corrélation possible entre la nature de la FC (mono- ou bifonctionnelle) et l'intensité des effets de CIDNP qu'elle provoque sur un acide aminé aromatique : la tyrosine. De plus, l'intensité de ces effets ne paraît pas dépendre des polarisations que peut montrer la FC quand elle est irradiée seule dans le solvant.

Nous allons commenter à présent l'origine de ces différentes polarisations et l'intérêt de l'étude comparative des FC en présence de TyrOH.

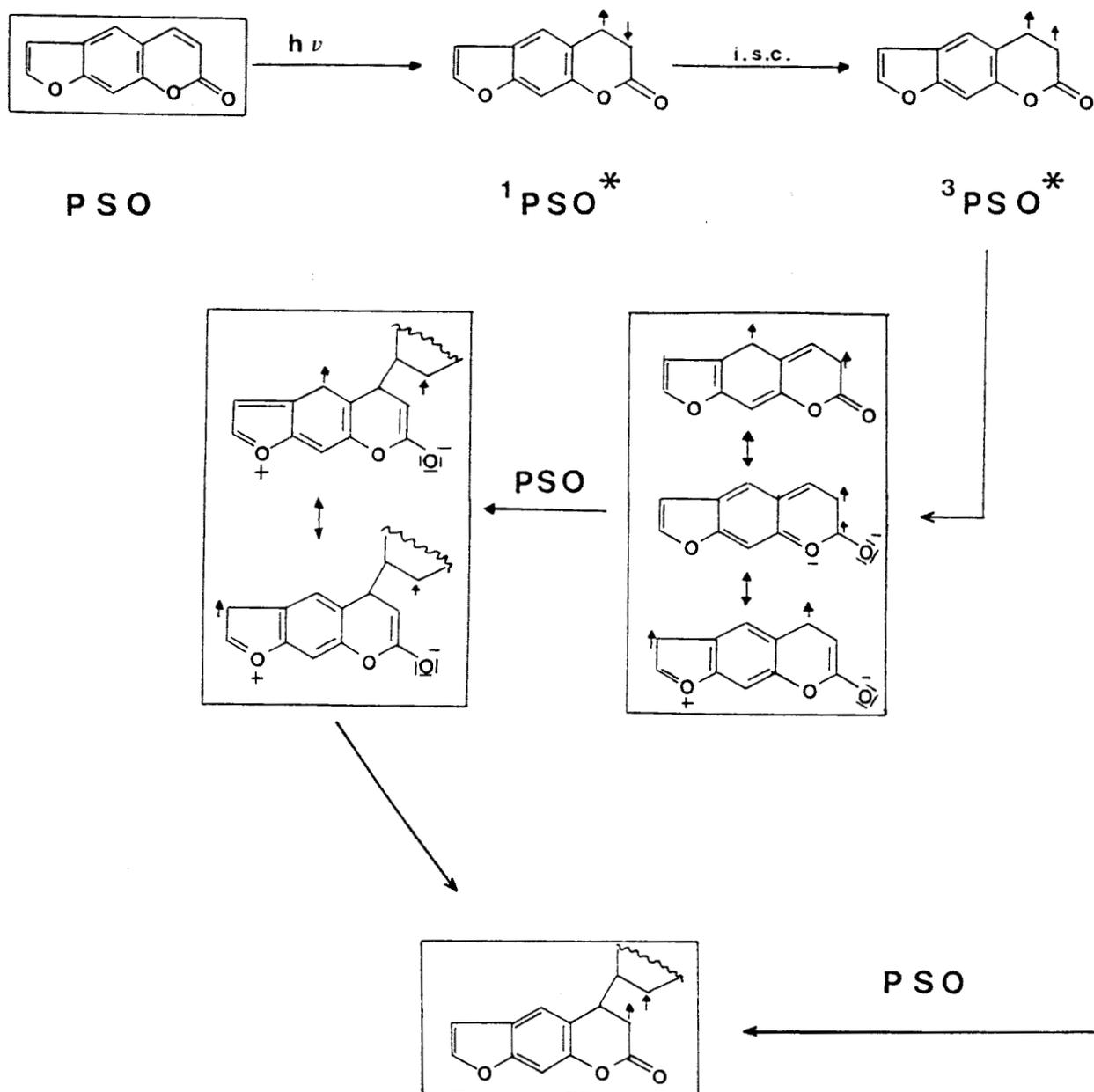
### a) Psoralènes seuls

ANDERS et al.<sup>26</sup> suggèrent que les effets de CIDNP qu'ils observent dans le DMSO avec différentes FC proviendraient d'un précurseur biradicalaire (fig. 10). Celui-ci serait un dimère non cyclique résultant de l'interaction de deux molécules de FC : l'une à l'état excité (triplet) et l'autre à l'état fondamental. Cette interaction se situerait au niveau de la double liaison 3,4. Ces positions possèdent en effet les intensités de spin les plus élevées pour l'état triplet des FC comme l'ont démontré des calculs théoriques de ces mêmes auteurs (méthodes SCF-MO et CNDO) ou d'autres (voir réf. 6d par exemple).

Le biradical conduirait alors soit à la reformation du monomère, soit à un dimère de nature cyclobutanique, ces deux composés étant alors polarisés. L'analyse des signes de ces polarisations n'est cependant pas abordée.

Dans notre cas, l'hypothèse biradicalaire semble difficile à retenir. La plupart des spectres de CIDNP à haut champ concernant un intermédiaire biradicalaire montrent généralement des signaux qui sont tous polarisés dans le même sens. Ce phénomène s'explique parfaitement, d'un point de vue théorique, sur les bases d'un mélange  $S-T_-$  (ou  $S-T_+$ ) intervenant à la place du mélange  $S-T_0$  qui a lieu ordinairement (voir Chap. I §7 et les références qui y sont citées).

Les spectres que nous obtenons dans l'acétonitrile sont des spectres "classiques", i.e. présentant à la fois des raies en émission et d'autres en absorption exaltée. Les polarisations sont donc essentiellement du type  $S-T_0$ . Ceci n'exclut cependant pas totalement l'éventualité d'un biradical. En effet, le mélange  $S-T_0$  peut, dans certaines



**Figure 10**

Intermédiaires biradicalaires postulés par ANDERS et al.<sup>26</sup>  
 pour expliquer les effets de CIDNP observés lors de l'irradiation  
 du psoralène dans le diméthylsulfoxyde.

conditions, redevenir prépondérant dans les réactions biradicalaires<sup>28,29</sup>. Cependant, ce mécanisme, qui est un mécanisme de sélection de spin par lequel aucune polarisation nucléaire n'est créée, nécessite une voie réactive indépendante du spin nucléaire. Dans le cas des paires radicalaires, cette condition est facilement réalisée lors de la séparation diffusive des deux partenaires hors de la cage initiale, ou par des réactions de piégeage par exemple. Pour les biradicaux, la voie de fuite est beaucoup moins évidente. L'hypothèse la plus vraisemblable implique que la réactivité du biradical ne concerne pas seulement son état singulet, mais également son état triplet. La réactivité de l'état triplet serait provoquée par le couplage spin-orbite, permettant la transition de certaines conformations spécifiques de l'état triplet du biradical vers l'état singulet des produits. Le croisement intersystème via le couplage spin-orbite s'ajouterait donc dans ce cas à celui habituellement induit par les valeurs des constantes de couplage hyperfin. Il en diffère à la fois par le fait, qu'il dépend de la conformation du biradical, qu'il convertit directement l'état triplet du biradical en produit et qu'il intervient à de très courtes distances donc, en général, pour des biradicaux à courte chaîne.

Enfin, les effets de CIDNP provenant de biradicaux 1,4 ou 1,3 ne seront en général pas visibles. En effet, pour ces espèces, le couplage spin-orbite est souvent trop important par rapport aux valeurs des constantes de couplage hyperfin (ce dernier doit au moins contribuer au croisement intersystème pour que les effets de CIDNP soient observables). Il faudrait alors que le biradical ait une durée de vie suffisamment longue (1 à 10 ns) et en outre, qu'il passe une fraction appréciable de ce temps dans des conformations pour lesquelles la valeur de l'intégrale d'échange soit comparable à l'énergie Zeeman ou aux interactions de nature hyperfine.

Il semblerait également que pour les biradicaux de taille supérieure (à partir de 1,7) le mélange S-To ne puisse se manifester qu'à des champs bien plus élevés que 20 kG, à moins que des réactions de piégeage rapide du biradical n'aient lieu. Notre spectromètre opère à un champ magnétique inférieur à 20 kG et nous n'observons que de très faibles polarisations (quand elles existent) provenant de composés différents de la FC de départ.

Nous ne pouvons pas non plus envisager l'hypothèse d'un biradical symétrique pour lequel la différence de facteurs  $g$  serait nulle. Dans ce cas, seuls des effets de multiplet seraient visibles. Or, sur tous les spectres que nous avons enregistrés, les effets nets ( $\Delta g \neq 0$ ) sont largement prépondérants.

Dans ces conditions, il semblerait que ce soit plutôt une paire de radicaux (neutres ou ions) qui soit à l'origine des polarisations observées lors de l'irradiation de solutions de FC dans l'acétonitrile. Nous devons alors remarquer que les effets de CIDNP sont fortement influencés :

- par la concentration de la FC. Ils diminuent quand la concentration de la FC augmente.
- par la polarité du solvant. Ils sont intenses dans des solvants polaires comme l'acétonitrile ou le méthanol et disparaissent dans les solvants peu polaires comme le benzène ou le chloroforme.

Ces deux phénomènes sont en général caractéristiques d'une part, de réactions de transfert d'électron<sup>30</sup> et d'autre part, de la formation de radicaux ions. On constate également que pour les FC substituées en -3 et qui sont polarisées (3-AcePs et 3 ButPs) le signal du proton H-4, qui en début d'irradiation montre une très forte absorption, s'élargit progressivement ("broadening").

Nous proposons alors le mécanisme décrit sur le schéma 1 pour expliquer nos résultats expérimentaux. La molécule de FC passe dans un état excité singulet qui, par croisement intersystème, conduit à l'état triplet. Cette molécule, dans l'un de ces deux états excités, réagit ensuite avec une autre molécule à l'état fondamental pour former un (ou plusieurs ?) intermédiaire (s) métastable (s). D'après les remarques précédentes, cet intermédiaire pourrait être un complexe de transfert de charge à l'état excité. La nature (et le nombre) de ces intermédiaires est en effet très différemment interprétée dans des réactions semblables concernant l'irradiation en solution d'étones cycliques<sup>31</sup>, de coumarines<sup>32</sup> et même de furocoumarines<sup>33</sup>. Ces réactions conduisent généralement à des dimères et sont souvent stéréosélectives. Elles font intervenir les deux états excités du monomère (singulet et triplet) favorisant chacun une conformation du dimère. La réactivité de l'état singulet serait due à l'existence d'excimères singulets (complexes à l'état excité entre deux

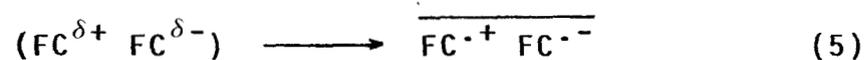
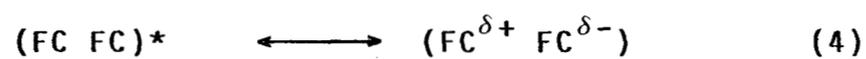
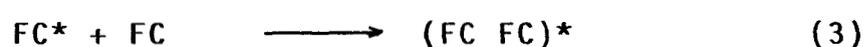
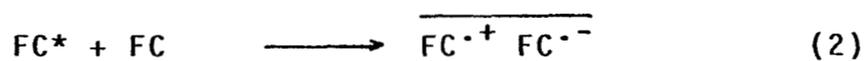
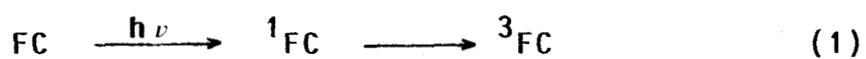


Schéma 1

Schéma réactionnel pouvant conduire aux effets de CIDNP observés lors de l'irradiation des FC seules dans l'acétonitrile. FC\* désigne une molécule de FC dans un état excité singulet ou triplet. FC<sup>Pi</sup> désigne une molécule polarisée.



molécules identiques<sup>34</sup>). Quant à celle de l'état triplet, elle est beaucoup plus controversée. La formation d'excimères triplets semble beaucoup plus rare. WAGNER et BUCHECK<sup>31</sup> ont proposé la formation d'un complexe de transfert de charge préalablement à celle d'un biradical. GERVAIS et al.<sup>33</sup> n'ont pas de preuves expérimentales de l'existence d'excimères lors de la photodimérisation de FC. Ils n'excluent cependant pas totalement cette éventualité.

Selon ces considérations, la paire radicalaire précurseur des effets de CIDNP observés pourrait donc être constituée de radicaux ions de la furocoumarine. Elle serait soit formée directement par un transfert d'électron entre une molécule de FC à l'état excité et une autre à l'état fondamental (schéma 1, équ. 2) ; soit précédée par la formation d'un excimère stabilisé ensuite par un complexe de transfert de charge ( $FC^{\delta+} FC^{\delta-} \longleftrightarrow FC^{\delta-} FC^{\delta+}$ ) conduisant à une paire de radicaux ions dans des solvants possédant une constante diélectrique élevée (équ. 3, 4 et 5)<sup>34</sup>. Dans les deux éventualités, la paire de radicaux ions finale est donc identique (équ. 2 et 5). L'absence de photoproduits et la faible intensité (le cas échéant) des signaux correspondant à des dimères suggèrent que la réaction conduisant aux radicaux ions est hautement réversible. Par transfert inverse au sein de la paire, on retourne aux deux molécules de départ (produits de cage, équ. 6). Chacune est alors polarisée et les effets de CIDNP obtenus résultent de la somme des polarisations  $P_1$  et  $P_2$ . D'après la règle de KAPTEIN relative à l'effet net,  $\mu$  et  $\epsilon$  sont identiques pour  $P_1$  et  $P_2$ ,  $\Delta g$  est de signe contraire,  $P_1$  et  $P_2$  s'annuleraient donc mutuellement. Il faut alors admettre que les valeurs des constantes de couplage hyperfin  $a_1$  sont également de signe opposé ou qu'elles ont au moins des valeurs absolues différentes pour expliquer la présence d'effets de CIDNP. Ceci revient à envisager une répartition des densités de spin différentes sur les radicaux cation et anion et n'est donc pas à exclure à priori.

Le retour à la FC de départ peut également se faire par une voie de fuite. Le transfert inverse ne se produira qu'après une séparation diffusive des radicaux (équ. 7 et 8). Les polarisations  $P_3$  et  $P_4$  ainsi engendrées seront donc rigoureusement opposées respectivement aux polarisations  $P_1$  et  $P_2$  et devraient annuler les effets de CIDNP. Si tel n'est pas le cas, c'est que ces polarisations  $P_3$  et  $P_4$  sont en partie atténuées par la relaxation au sein des espèces réactives, intervenant au cours de la phase diffusive (cf chap. II et III).

Le phénomène de "broadening" précédemment mentionné serait également en faveur de l'hypothèse d'une paire de radicaux ions (plutôt que neutres) d'après l'argument développé par ROTH et LAMOLA<sup>35</sup>. Il serait dû à une réaction d'échange entre une molécule chargée et une autre neutre. Le processus de photoionisation des FC en solution est bien connu. La formation simultanée des radicaux anion et cation du 8-MOP a été mise en évidence par LAND et al.<sup>36</sup> par photolyse éclair de solutions aqueuses de ce composé (processus biphotonique).

Il est certain que si, en photo-CIDNP, les exemples de réactions mettant en jeu une paire intermédiaire de radicaux ions se font de plus en plus nombreux dans la littérature, elles concernent essentiellement les cas où les deux partenaires de la paire sont des molécules différentes. L'une y joue le rôle d'accepteur d'électron, l'autre celle de donneur. Néanmoins, il est établi que pour certains photosensibilisateurs comme le bleu de méthylène, l'éosine ou la thionine par exemple, leur état excité (triplet le plus souvent) peut réagir avec une molécule à l'état fondamental, selon un mécanisme noté D-D<sup>37</sup>. Cette réaction conduit aux espèces semi-oxydée et semi-réduite du sensibilisateur selon l'équation :

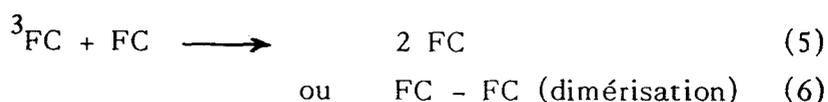


Elle a lieu aussi bien en milieu oxygéné que dégazé et elle est souvent prépondérante à des concentrations du sensibilisateur égales ou supérieures à  $10^{-3}$  M (qui sont celles que nous utilisons).

L'analyse des signes des polarisations obtenues par le schéma 1 ne nous permet malheureusement pas de définir la multiplicité de l'état excité réactif de la FC. Les valeurs absolues et les constantes de couplage hyperfin dans les radicaux ions des FC ne sont pas connues et de plus, d'après ce schéma, les polarisations résultent en fait de la somme de deux effets. On notera également que, si pour les protons 3 (E) et 4 (A) les effets de CIDNP sont inverses (Ex : 5-MOP et 5-Br 8-MOP), comme il est courant de le constater pour des protons portés par des carbones adjacents (signes des constantes de couplage hyperfin alternés), ce n'est pas le cas des protons 4' (E) et 5' (E) quand ceux-ci sont polarisés. L'explication peut en être soit la non-alternance des signes de  $a_i$  sur le cycle furannique, soit précisément le fait que les effets observés sont la somme de plusieurs polarisations.

Il est enfin difficile de donner une explication satisfaisante des différences de comportements remarquées sur les FC utilisées. Il serait fortuit que l'absence de CIDNP pour certaines d'entre elles soit due à une annulation exacte des effets provoqués respectivement par les polarisations  $P_1$  et  $P_2$  (traduisant alors une répartition des densités de spin exactement inverse dans les radicaux cation et anion de ces dérivés). Il est tout de même curieux de constater à cet égard que le  $3\text{-CP}_s$  est peu (pas) polarisé, alors que son homologue angulaire  $3\text{-iCP}_s$  l'est fortement ( $5\text{'-MeOIP}_s$  ne l'est plus). Les différences ne semblent pas non plus provenir des spectres d'absorption des FC (tableau II) ou de leurs rendements quantiques de passage intersystème singulet-triplet<sup>7</sup>.

L'absence de polarisations pourrait être due encore à d'autres processus non radicalaires qui se produiraient concurremment au mécanisme décrit sur le schéma 1. Ainsi, nous avons observé que l'irradiation prolongée du  $3\text{-CP}_s$ , par exemple, provoquait la formation d'un (de) nouveau(x) photoproduit(s) dont vraisemblablement le dimère en majorité (cf fig. 6). Ce(s) photoproduit(s) ne montre(nt) pas d'effets de CIDNP. Ce type de réactions serait alors "secondaire" dans le cas des FC polarisées, bien qu'ayant lieu également. Car il est effectivement possible (cf  $3\text{-CP}_s$ <sup>13b</sup>) que l'état excité triplet de certaines FC soit désactivé par interaction avec son état fondamental selon les équations 5 et 6 :



Ces voies, non radicalaires, n'engendreraient pas d'effets de CIDNP. Il est à noter que les dimères ainsi formés (équa. 6), ou d'autres photoproduits qui pourrait l'être également par des voies non radicalaires, seraient susceptibles de réagir à leur tour (comme l'ont observé ANDERS et al.<sup>26</sup> pour les dimères). Ils provoqueraient les polarisations qui n'apparaissent qu'après une certaine durée d'irradiation, ou que sur des spectres résultant de l'addition de plusieurs FID consécutifs nécessitant une irradiation prolongée.

#### b) Psoralènes en présence d'acides aminés

Comme l'ont montré des études de photolyse éclair par

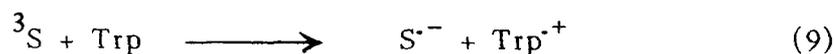
laser<sup>13b,17,38</sup>, l'état triplet des FC peut être efficacement inhibé par différentes bases des acides nucléiques et certains amino-acides. Les considérations énergétiques excluant la possibilité d'un transfert d'énergie triplet-triplet, il est généralement admis que ce phénomène serait dû à une réaction de transfert électronique conduisant à la réduction de l'état triplet de la FC selon la réaction :



D'autre part, les polarisations que nous obtenons avec la TyrOH sont semblables à celles observées par d'autres auteurs lors de l'irradiation de cet amino-acide en présence de différents sensibilisateurs (S). Nous ne reviendrons pas en détail sur ces résultats que nous avons déjà exposés dans la deuxième partie du chapitre II. Nous rappellerons simplement que ces polarisations sont attribuées à la formation d'un radical tyrosyle TyrO<sup>·</sup> obtenu par une réaction d'arrachement d'hydrogène :



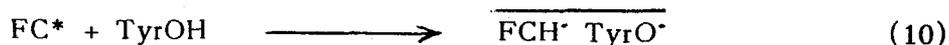
Une réaction analogue est observée avec l'histidine, alors que dans le cas du tryptophane (Trp), la première étape serait plutôt un transfert électronique :



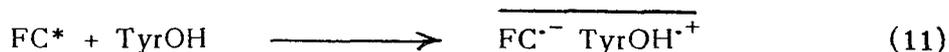
Les effets de CIDNP résultent alors de réactions cycliques. Les seuls composés polarisés étant les réactifs eux-mêmes, les réactions de transfert (8) et (9) sont donc hautement réversibles (cf chap. II, schémas 1 et 2).

D'après ces considérations, il est vraisemblable que l'intermédiaire responsable des polarisations de la TyrOH dans notre étude sera soit son radical neutre TyrO<sup>·</sup>, soit son radical cation TyrOH<sup>·+</sup>. Trois types de paires radicalaires sont alors envisageables :

- Celle obtenue par arrachement d'hydrogène par la FC excitée,



- Celle résultant d'un transfert d'électron,



- le radical cation pouvant ensuite se déprotoner,



Les paramètres magnétiques du radical tyrosyle ( $\text{TyrO}^*$ ) sont connus<sup>39</sup>. Son facteur g est supérieur à 2,004. Un travail récent indique 2,0046<sup>39b</sup> alors que précédemment il avait été mesuré à 2,0041<sup>39a</sup>. Les constantes de couplage hyperfin sont :  $a_{\text{H}-3} = a_{\text{H}-5} = -6,15 \text{ G}$  ;  $a_{\text{H}-2} = a_{\text{H}-6} = +1,5 \text{ G}$  ;  $a_{\text{H}-\beta} = +7,7 \text{ G}$ . Les autres radicaux invoqués dans les équations (10), (11) et (12) ne sont pas décrits. On peut néanmoins raisonnablement prévoir que la valeur du facteur g du radical cation  $\text{TyrOH}^{\cdot+}$  se situera aux alentours de 2,003 par comparaison entre les valeurs des facteurs g du radical neutre du p-crésol (2,0042) et celle de son radical cation (2,0032)<sup>40a</sup>. De même, on peut également supposer que les constantes de couplage hyperfin auront quant à elles, au moins des signes identiques<sup>40b</sup>. Par contre, pour les radicaux issus des FC, nous ne possédons malheureusement aucune donnée.

Afin de préciser l'étape initiale (transfert d'électron ou arrachement d'hydrogène) nous pouvons développer deux arguments apparemment contradictoires :

- l'influence de la polarité du solvant, les effets de CIDNP étant principalement visibles dans des solvants à forte constante diélectrique,
- l'absence (ou la faiblesse) des effets de CIDNP obtenus sur l'éther méthylé de TyrOH, la méthoxy-4 phénylalanine qui ne possède plus de proton phénolique échangeable.

Le premier plaide en faveur de la formation de radicaux ions, alors que le second semblerait favorable à l'arrachement d'hydrogène<sup>41</sup>.

D'après RIZZUTO et SPIKES<sup>42</sup>, la photooxydation des tyrosines en présence d'éosine est très influencée par la nature des substituants. Ainsi, les tyrosine, N-acétyltyrosine et son ester méthylé, ou la Dopa



par exemple, présentent des réactivités tout-à-fait comparables. La méthoxy-4 phénylalanine (comme la phénylalanine) est très difficilement oxydable. Ces auteurs mettent ainsi en évidence l'importance de la présence et de la position d'un substituant nucléophile sur le cycle benzénique, alors que la participation des groupements amino et carboxyles de la chaîne latérale n'est que très minoritaire. Nous observons les mêmes phénomènes en CIDNP. RIZZUTO et SPIKES concluent que probablement plusieurs mécanismes (oxygène singulet, transfert de charge, ...) sont responsables de cette photooxydation. Un arrachement d'hydrogène serait par contre vraisemblablement prépondérant en milieu basique.

On ne peut considérer que l'absence (ou la faiblesse) des effets de CIDNP avec  $\text{TyrOCH}_3$  soit nécessairement un argument favorable à l'hypothèse d'une réaction d'arrachement d'hydrogène. Le remplacement d'un groupement hydroxyle par un groupement méthoxyle dans un dérivé est en effet susceptible d'en modifier la valeur du potentiel d'oxydation. Il est souvent délicat d'établir d'après les données de la littérature, des comparaisons entre différentes valeurs concernant les potentiels d'oxydation des composés organiques en solution. Celles-ci sont souvent fortement influencées par la nature du milieu (solvant, pH, ...) ou du matériel (électrodes, support électrolytique, ...) servant à la mesure<sup>43</sup>. Néanmoins, dans l'acétonitrile avec l'électrode en platine, le potentiel d'oxydation de l'anisole est supérieur de 0,36 V à celui du phénol (1,65 V et 1,29 V respectivement par rapport à l'électrode au calomel saturé)<sup>44</sup>. Ce dernier peut être encore abaissé si le phénol se trouve sous la forme d'anion phénate<sup>45</sup> ce qui n'est plus possible pour l'anisole. VOGELMANN et al.<sup>46</sup> ont étudié d'autre part, la réduction des états triplets de la thionine et de la lumiflavine par différents donneurs d'électron. Ils ont ainsi montré que la constante de vitesse de cette réaction diminuait quand la valeur du potentiel d'oxydation de ces derniers augmentait. Ils n'ont ainsi observé aucune réaction avec l'anisole, contrairement à d'autres di- ou triméthoxybenzènes dont le potentiel était inférieur à 1,5 V par rapport à l'électrode au calomel saturé.

En admettant qu'il existe une différence du même ordre entre  $\text{TyrOCH}_3$  et  $\text{TyrOH}$ , nous ne pouvons donc exclure l'hypothèse d'une réaction de transfert électronique. De même que nous ne le pouvons sur la base de considération énergétiques. Il n'existe que peu de travaux sur

la détermination des potentiels rédox des FC et la plupart d'entre eux sont résumés dans un article de ORLOV<sup>48</sup>. D'après ceux-ci, les potentiels de réduction des FC se situent entre -1,4 V et -1,5 V par rapport à l'électrode au calomel saturé dans le méthanol aqueux (75%-25%). BRABEC et MORNSTEIN<sup>49</sup> ont montré que le potentiel d'oxydation de TyrOH variait entre +0,6 V et +1,0 V par rapport à cette même électrode en passant d'un pH basique à un pH acide. D'après ces données, l'énergie libre de formation de la paire de radicaux ions  $\text{FC}^{\cdot-}$   $\text{TyrOH}^{\cdot+}$  serait de l'ordre de  $59 \text{ kcal.mol}^{-1}$  dans le cas le plus défavorable (d'après l'équation de REHM et WELLER utilisée au chap. III, § C.II). L'énergie des états excités triplets des FC étant située autour de  $65$  à  $70 \text{ kcal.mol}^{-1}$  et celle des états singulets au-delà de  $80 \text{ kcal.mol}^{-1}$ , le transfert électronique est donc thermodynamiquement possible.

A ce stade, le choix de la voie réactive entre les équations (10), (11) et (12) s'avère délicat relativement à la méconnaissance de certains paramètres. Il est, de plus, compliqué par l'éventualité d'une compétition probable entre plusieurs mécanismes. Cette dernière est suggérée par l'évolution des signaux au cours de l'irradiation, particulièrement sensible dans le méthanol<sup>27b</sup>. Elle l'est encore par la comparaison entre certains spectres enregistrés avec un seul FID et ceux résultant de la somme de plusieurs FID (voir présentation des résultats).

Toutefois, pour la durée d'irradiation que nous avons choisie, nous constatons que les polarisations obtenues sur les FC en présence de TyrOH sont de même signe et dans leur ensemble plus intenses que lorsqu'elles existent sur les FC seules (voir tableaux IV et V). Ceci est particulièrement vérifié pour H-4 (A) des dérivés substitués en 3 (fig. 7 par ex.) et pour H-3 (E) du 5-MOP (fig 8) ou du 5-Br 8-MOP. La double liaison 3,4 reste donc la position réactive de la molécule de FC.

Discutons à présent le signe de chacun des paramètres intervenant dans la règle de KAPTEIN relative à l'effet net. Nous l'appliquerons par exemple aux protons  $\text{H}_{3,5}$  de la tyrosine dont les polarisations résultent de la présence de la FC.

•  $\epsilon$  . Quel que soit le type de réaction concerné (équa. 10 ou 11), ce paramètre sera positif. La reformation de la tyrosine qui résulte du transfert inverse (atome d'hydrogène ou électron), constitue un produit

de cage.

- $a_1$ . Pour  $H_{3,5}$  on a vu que la constante de couplage hyperfin est négative quel que soit le type de radical : TyrO $\cdot$  ou TyrOH $\cdot^+$ .

- $\Gamma_n$ . L'effet observé étant de l'émission, ce paramètre est donc négatif.

On peut donc en déduire, d'après  $\Gamma_n = \mu \cdot \epsilon \cdot \Delta g \cdot a_1$  :

$- = \mu \cdot + \cdot \Delta g$  -, c'est-à-dire  $\mu \cdot \Delta g = +$ , donc que  $\mu$  et  $\Delta g$  sont de même signe. Deux cas restent alors possibles :

**Ce signe est positif.** L'état triplet est donc l'état réactif et le facteur  $g$  du radical dérivé de la FC est inférieur à celui de TyrOH : 2,004 s'il s'agit de TyrO $\cdot$  et 2,003 s'il s'agit de TyrOH $\cdot^+$ .

D'après les travaux décrits au début de ce paragraphe, l'hypothèse d'un état triplet réactif est la plus couramment admise. D'ailleurs, une étude récente de ANDREONI et al.<sup>47</sup> indique que les acides aminés n'interagiraient pas avec l'état  $S_1$  des FC.

**Ce signe est négatif.** Dans ce cas, la réaction concerne l'état singulet de FC et le facteur  $g$  du radical dérivé de FC est supérieur soit à 2,004, soit à 2,003. La connaissance de ce paramètre nous permettrait donc de définir sans ambiguïté l'état réactif de la furocoumarine.

On remarquera cependant qu'aussi bien l'arrachement d'hydrogène que le transfert d'électron devraient conduire au radical neutre TyrO $\cdot$ . En effet, lors de la formation du radical cation du phénol, l'étape de déprotonation (équa. 12) a été observée même dans des conditions très acides<sup>45</sup>. Il reste donc à savoir si le facteur  $g$  manquant est supérieur ou inférieur à 2,004. La position de l'électron libre sur ce radical pourrait déjà constituer une première indication. Une forte valeur du facteur  $g$  (supérieure à 2,004) reflèterait, en effet, plutôt un radical centré sur un hétéroatome. Une valeur plus faible correspondrait à un radical carboné, si l'on se réfère aux radicaux du même type décrits dans la littérature.

Quoiqu'il en soit, les réactions schématisées par les équations (10), (11) et (12) ne sont que des étapes primaires, permettant au moins de justifier les polarisations observées sur TyrOH. L'ensemble du mécanisme est vraisemblablement encore plus complexe. On n'en retiendra pour preuve que certaines particularités des spectres obtenus avec l'histidine ou le tryptophane. L'histidine, par exemple, n'est pas polarisée quand elle est irradiée en présence d'une FC. Ce phénomène

peut éventuellement s'expliquer par la plus grande difficulté d'oxyder cet amino-acide<sup>49</sup>. Quant au tryptophane, s'il est lui-même polarisé (son potentiel d'oxydation est sensiblement le même que celui de TyrOH<sup>49</sup>), les effets de CIDNP qu'il provoque sur certaines FC sont inverses de ceux observés avec TyrOH. Il semble établi qu'avec cet AA, la réaction de transfert d'électron soit prépondérante<sup>50</sup> (cf chap. II). Cependant, le radical cation tryptophane possède un facteur  $g$  d'environ 2,0030 bien inférieur à celui du radical cation TyrOH<sup>+50</sup>. L'inversion des polarisations pourrait alors être due à une inversion du signe des facteurs  $g$  des radicaux de la paire principale en admettant que les autres paramètres des règles de KAPTEIN ne soient pas modifiés.

Enfin, nous ne commenterons pas ici en détail les spectres obtenus avec le méthanol (voir résultats). La formation très rapide dans ce solvant de photoproduits, eux-mêmes réactifs semble-t-il, modifie considérablement dans certains cas les polarisations.

### c) Comparaison entre les différentes furocoumarines

Considérons à présent le second aspect plus original de nos résultats. Il concerne la possibilité d'utiliser la technique de photo-CIDNP à l'évaluation de la photoactivité de médicaments d'une même famille, comme nous l'avions illustrée dans le chapitre précédent avec les phénothiazines. L'intensité des effets de CIDNP mesurés sur TyrOH (tableau V, dernière colonne) nous permet de classer les FC en trois groupes :

- le groupe 1 (intensité nulle ou très faible) : PSO, 8-MOP, 5-OHPs, 5-Br8-MOP, les deux dérivés dihydro (dHPS et dH3-CPs) et deux FC non linéaires (ANG et 5'-MeOiPs)
- le groupe 2 (intensité faible) : 5-MOP, TMP, 8-MediCPs.
- le groupe 3 (forte intensité) : 3-CPs, 3-ButPs, 3-AcePs, 3-CNPs, 8-Me3-CPs et plus curieusement, a priori, une FC non linéaire (3-iCPs).

En consultant cette classification ainsi établie, nous avons essayé de la corrélérer avec des propriétés connues et analysées par d'autres techniques.

MUSAJO et RODIGHIERO<sup>6e</sup> ont comparé l'activité photosensibilisante de différentes FC en calculant le temps d'irradiation nécessaire

pour qu'elles provoquent des érythèmes sur la peau humaine ou sur celle de cochons d'Inde. Leurs principales conclusions montrent que cette activité est une propriété globale de la molécule de furocoumarine :

- la coumarine et le benzofuranne sont séparément inactifs.
- la structure linéaire est plus active que la structure angulaire.
- la présence d'un groupement hydroxyle supprime l'activité du psoralène<sup>51</sup>, la méthylation de ce groupement la restaure.
- la présence d'un méthyle en position -5 renforce l'activité du psoralène.

AVERBECK et al.<sup>23</sup> ont étudié la réactivité photobiologique de la plupart des FC que nous avons testées. Leur méthode consiste à évaluer les effets à la fois sur la survie cellulaire et sur la mutation cytoplasmique "petites colonies" chez la levure de bière haploïde, tels qu'ils sont induits par ces composés sous l'influence d'une radiation lumineuse de 365 nm. Ils comparent ensuite leurs résultats à ceux qu'ils ont obtenu avec des composés connus pour être monofonctionnels (3-CPs, ANG ou diméthoxy -5,7 coumarine) ou bifonctionnels (PSO, 8-MOP). Nous avons regroupé leurs conclusions dans le tableau VI.

Ce dernier tableau nous permet de constater que les groupes 1 et 2 que nous avons établis correspondent dans l'ensemble à des dérivés bifonctionnels ou inactifs et que le groupe 3 rassemble les dérivés monofonctionnels. Notre classification rejoint ainsi celle qui est généralement adoptée pour les FC et qui tient compte de leur réactivité vis-à-vis de l'ADN.

Les groupes 1 et 2 correspondent donc à des FC pouvant soit présenter des risques phototoxiques, photomutagènes ou photocancérigènes soit se révéler inefficaces en photochimiothérapie. Dans le groupe 3, on trouvera par contre les FC dont l'utilisation entraînera des effets secondaires beaucoup moins néfastes pour le patient.

La composition de chacun des groupes que nous avons ainsi établis par photo-CIDNP nous indique cependant à la fois l'intérêt et les limitations de la technique qui sont évoqués par les constatations suivantes :

- La méthode de photo-CIDNP ne fait pas de distinction entre les dérivés photobiologiquement inactifs et les dérivés bifonctionnels (groupe

**GROUPE 1**

FC	$I_p^a$	Nature <sup>b</sup>
PSO	$-0,4 \pm 0,1$	Bi
8-MOP	$-0,2 \pm 0,2$	Bi
5'-MeO <sub>i</sub> Ps	$-0,3 \pm 0,1$	Bi
5-Br 8-MOP	$-0,5 \pm 0,2$	?
5-OHPs	$0,0 \pm 0,2$	INAC
dHPs	$-0,1 \pm 0,2$	INAC
dH3-CPs	$0,6 \pm 0,7$	INAC
ANG	$-0,1 \pm 0,1$	MONO

**GROUPE 2**

5-MOP	$-1,6 \pm 0,1$	Bi
TMP	$-1,2 \pm 0,6$	Bi
8-MediCPs	$-1,1 \pm 0,2$	INAC

**GROUPE 3**

8-Me 3-CPs	$-6 \pm 1$	MONO
3-CPs	$-18 \pm 3$	Mono
3-ButPs	$-22 \pm 9$	Bi?
3-AcePs	$-25 \pm 5$	MONO
3-CNPs	$-30 \pm 4$	Bi
3-CPs	$-30 \pm 9$	MONO



**TABLEAU VI : CLASSIFICATION DES DIFFERENTES FC SELON LA METHODE DE PHOTO-CIDNP**

a) Voir tableau V. La valeur calculée moyenne est donnée avec le plus grand écart à cette valeur.

b) Essentiellement d'après Averbeck et al.<sup>23</sup>

Bi : FC bifonctionnelle

MONO : FC monofonctionnelle

INAC : FC photobiologiquement inactive

1 et 2). Néanmoins, cette distinction deviendrait sans objet d'un point de vue pratique, si l'on considère que les uns ne sont d'aucune utilité thérapeutique, et que les autres sont susceptibles de présenter des dangers au cours de leur administration. Il resterait alors à montrer que les dérivés du groupe 3 sont aussi efficaces en PUVA que le 8-MOP par exemple, qui est encore actuellement le plus utilisé, pour pouvoir écarter systématiquement les dérivés des groupes 1 et 2.

- Nous constituons un groupe supplémentaire par rapport à la classification traditionnelle. En effet, pour le groupe 2, bien que les polarisations sur TyrOH restent faibles, elles n'en deviennent pas moins significatives. Nous établissons ainsi une différence entre les 5-MOP et 8-MOP par exemple. Or le 5-MOP a été introduit en PUVA-thérapie légèrement plus tard que le 8-MOP et présenté alors comme une alternative de traitement moins toxique<sup>52</sup>. La réponse érythémateuse est d'ailleurs plus lente avec le 5-MOP qu'avec le 8-MOP<sup>6e</sup>.

- Nous retrouvons aussi normalement dans le groupe 1, le dérivé hydroxylé (5-OHPs) et les deux dérivés dihydro -4',5'. AVERBECK et al.<sup>23</sup> ont montré que pour produire des effets biologiques comparables, les FC substituées en 4',5' nécessitent en général des doses de radiation bien plus fortes que celles substituées en 3,4. Nous avons signalé plus haut qu'une solution de dH3-CPs ( $I_p = 0$ ), pouvait provoquer des polarisations sur TyrOH quand elle était irradiée une seconde fois après la période de 1 mn 50 s que nous avons choisie pour nos mesures comparatives. Dans ce cas, nous pensons que, plutôt qu'un problème de dose lumineuse, c'est la formation préalable d'un photoproduit actif qui est responsable de la réactivité retardée de dH3-CPs.

- Notre technique classe l'angélicine dans le groupe 1. Or il s'agit d'un dérivé monofonctionnel. Ce résultat n'a cependant rien de surprenant bien qu'il constitue une limitation de notre technique dans le domaine des FC non linéaires. On pense généralement, en effet que la monofonctionnalité de ANG est liée à des raisons d'ordre géométrique. Au niveau de l'ADN, la molécule ne peut se placer de façon favorable à induire des additions à la fois sur la double liaison 3,4 et la double liaison 4',5' (pas de bisadduit). Ceci n'est évidemment pas sensible en solution et en présence de molécules de la taille de TyrOH. A ce niveau, on ne doit donc pas attendre de différences entre l'angélicine et le psoralène.

- Le groupe 3 contient tous les dérivés substitués en position 3. On retrouve un comportement identique du 3-CPs linéaire et de son homologue angulaire 3-iCPs.

Les polarisations sont atténuées par la présence d'un groupement méthyle en position 8 (8-Me 3-CPs). Le test de la levure haploïde<sup>23</sup> montrait qu'il possédait une activité photobiologique considérable mais qu'il se comportait comme une FC monofonctionnelle. Par contre, l'introduction d'un substituant supplémentaire en position 5' (8-MediCPs) ramène le dérivé dans le groupe 2.

Les résultats concernant le 3-CNPs sont contradictoires sans que l'on possède d'explications satisfaisantes à cet égard.

La présence d'un substituant sur la position 3 modifie donc considérablement les effets de CIDNP obtenus. Quand ce substituant possède un groupement carbonyle, on constate une participation de la chaîne latérale, en particulier du groupement alkyle, en  $\alpha$  de la fonction, à la réactivité du noyau furocoumarinique (3-AcePs et 3-ButPs). D'autre part, bien que la double liaison 3,4 semble posséder une réactivité prépondérante, l'intensité des polarisations obtenues dépend également en grande partie de la disponibilité de la double liaison 4',5'.

- Enfin, si l'appartenance au groupe 3 indiquera un certain caractère monofonctionnel du dérivé, elle ne présagera cependant rien de son degré d'activité thérapeutique.

En conclusion, il apparaît donc que le mécanisme des photo-réactions primaires des FC en solution, seules ou en présence de substrats biologiques soit relativement complexe à cause probablement de plusieurs processus compétitifs. Par photo-CIDNP, nous avons pu établir qu'un de ces processus, en solvant polaire, était constitué de réactions de transfert de charge hautement réversibles entre ces FC et différents acides aminés aromatiques dont la tyrosine en particulier. L'accumulation rapide de dimères et de photoproduits et la méconnaissance des paramètres magnétiques des radicaux ions ou libres des dérivés furocoumariniques, ne nous permettent pas d'identifier avec certitude leur état excité réactif ni les intermédiaires réactionnels. Nous pouvons néanmoins analyser certaines des hypothèses généralement énoncées à ce sujet et en discuter la validité. Les polarisations que nous observons lorsque certaines des FC sont irradiées seules dans l'acétonitrile

pourraient ainsi provenir d'un mécanisme de type D-D conduisant à la formation d'un complexe de transfert de charge entre deux molécules de FC. En présence de tyrosine, il est tout-à-fait vraisemblable que l'état excité de la FC soit réduit par l'acide-amino.

Cependant, l'originalité de notre étude réside dans la classification des FC que l'on peut établir en fonction de l'intensité des effets de CIDNP qu'elles provoquent sur TyrOH. Cette classification est très proche de celle qui distingue les FC monofonctionnelles des FC bifonctionnelles ou inactives. C'est donc le second exemple (faisant suite à nos travaux sur les phénothiazines) où la technique de photo-CIDNP apparaît comme une méthode d'essai à l'évaluation de la photoréactivité d'un médicament au sein d'une même famille. Elle constitue ainsi une approche préalable à la poursuite éventuelle d'études plus approfondies sur des modèles plus élaborés.

--oooOooo--

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

--0000000--

- 1) W.L. FOWLKS - *J. Invest. Dermatol.* 32, 249 (1959).
- 2) A. PHYLADELPHY - *Dermatol. Wochschr.* 92, 713 (1931)
- 3) A.M. EL MOFTY - "Vitiligo and Psoralens", Pergamon, Oxford (1968).
- 4) F. FITZPATRICK, J.A. PARRISH et M.A. PATHAK - "Sunlight and Man" M.A. Pathak et al. Eds, University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 783 à 791 (1974)
- 5) J.A. PARRISH, T.B. FITZPATRICK, L. TANENBAUM et M.A. PATHAK - *New Eng. J. Med.* 291, 1207 (1974)
- 6) a) E. BENHUR et P.S. SONG - *Adv. Radiat. Biol.* 11, 131 (1984) - b) D. AVERBECK - "Trends in Photobiology", Hélène et al. Eds, Plenum Publishing Corp., p. 285 (1982) - c) B.J. PARSONS - *Photochem. Photobiol.* 32, 813 (1980) - d) P.S. SONG et K.J. TAPLEY, Jr. - *Ibid.* 29, 1177 (1979) - e) L. MUSAJO et G. RODIGHIERO - "Photophysiology" Ed A.C. Giese, 1, pp. 115 à 147 (1972).
- 7) R.V. BENSASSON, E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT - "Flash Photolysis and Pulse Radiolysis" *Contributions to the Chemistry of Biology and Medicine*, Pergamon Press, pp. 192 à 204 (1983)
- 8) M. SASAKI, T. SAKATA et M. SUKIGARA - *Chem. Lett.*, 701 (1977)
- 9) T. LAI, B.T. LIM et E.C. LIM - *J. Amer. Chem. Soc.* 104, 7631 (1982)
- 10) R.V. BENSASSON, O. CHALVET, E.J. LAND et J.C. RONFARD-HARET - *Photochem. Photobiol.* 39, 287 (1984)
- 11) M.K. LOGANI, W.A. AUSTIN, B. SHAH et R.E. DAVIES - *Ibid.* 35, 569 (1982)
- 12) J. GERVAIS et F. DE SCHRIVVER - *Ibid.* 21, 71 (1975)
- 13) a) P. VIGNY, F. GABORIAU, M. DUQUESNE, E. BISAGNI et D. AVERBECK - *Ibid.* 30, 557 (1979) - b) J.C. RONFARD-HARET, D. AVERBECK, R.V. BENSASSON, E. BISAGNI et E.J. LAND - *Ibid.* 35, 479 (1982)

- 14) D.R. BERDAHL et H.H. WASSERMAN - *Isr. J. Chem.* 23, 409 (1983)
- 15) J.E. HEARST, S.T. ISSAACS, D. KANNE, H. RAPOPORT et K. STRAUB - *Quart. Rev. Biophys.* 17, 1 (1984)
- 16) a) K. STRAUB, D. KANNE, J.E. HEARST et H. RAPOPORT - *J. Amer. Chem. Soc.* 103, 2347 (1981) - b) J. CADET, L. VOITURIEZ, F. GABORIAU, P. VIGNY et S. DELLA NEGRA - *Photochem. Photobiol.* 37, 363 (1983) et références citées. c) P. VIGNY, F. GABORIAU, L. VOITURIEZ et J. CADET - *Biochimie* 67, 317 (1985)
- 17) R.V. BENSASSON, E.J. LAND et C. SALET - *Photochem. Photobiol.* 27, 273 (1978)
- 18) a) K. YOSHIKAWA, N. MORI, S. SAKAKIBARA, N. MIZUNO et P.S. SONG - *Ibid.* 29, 1127 (1979) - b) S. LERMAN, J. MEGAW et I. WILLIS - *Ibid.* 31, 235 (1980) - c) F.M. VERONESE, O. SCHIAVON, R. BEVILACQUA, F. BORDIN et G. RODIGHIERO - *Ibid.* 34, 351 (1981) - d) F.M. VERONESE et al. - *Ibid.* 36, 25 (1982) - e) O. SCHIAVON, R. SIMONIC, S. RONCHI, R. BEVILACQUA et F.M. VERONESE - *Ibid.* 39, 25 (1984)
- 19) Pour une revue sur ce sujet voir : G. RODIGHIERO, F. DALL'ACQUA et M.A. PATHAK - "Topics in Photomedicine" Ed. K.C. Smith, Plenum Publishing Corp. pp. 319 à 398 (1984)
- 20) G. RODIGHIERO - *Acta Derm. Venereol. Sup.* 113, 60 (1984)
- 21) a) D. VEDALDI, F. DALL'ACQUA, A. GENNARO et G. RODIGHIERO - *Z. Naturforsch.* 38c, 866 (1983) - b) D. AVERBECK, L. DUBERTRET, M. CRAW, T.G. TRUSCOTT, F. DALL'ACQUA, P. RODIGHIERO, D. VEDALDI et E.J. LAND - *Il Farmaco Ed. Sc.* 39, 57 (1984)
- 22) a) P.C. JOSHI et M.A. PATHAK - *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 112, 638 (1983) - b) M.J. CONNOR et N.J. LOWE - *Photochem. Photobiol.* 39, 787 (1984) - c) N.J. DE MOL et G.M.J. BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN - *Ibid.* 30, 331 (1979)
- 23) D. AVERBECK, E. BISAGNI, J.P. MARQUET, P. VIGNY et F. GABORIAU - *Ibid.* 30, 547 (1979)
- 24) L. DUBERTRET et al. - *Proc. Int. Psoralens SIR*, Pergamon Press France, p. 245 (1981)
- 25) D. CREED - *Photochem. Photobiol.* 39, 563 (1984)
- 26) A. ANDERS, W. POPPE, C. HERKT-MAETZKY, E.G. NIEMANN et E. HOFER - *Biophys. Struct. Mech.* 10, 11 (1983)
- 27) J. MARKO, G. VERMEERSCH, N. FEBVAY-GAROT et A. LABLACHE-COMBIER - a) Xth IUPAC Symposium on Photochemistry, Interlaken (Suisse) 22-27 Juillet 1984 - b) "Primary Photoprocesses in Biology and

Medicine" Ed R.V. Bensasson et al., Plenum Publishing Corp., pp. 123 à 126 (1985)

28) a) F.J.J. DE KANTER et R. KAPTEIN - J. Amer. Chem. Soc. 104, 4759 (1982) b) R. KAPTEIN, F.J.J. DE KANTER et G.H. RIST - J. Chem. Soc. Chem. Commun., 499 (1981)

29) C. DOUBLEDAY, Jr. - a) Chem. Phys. Letters 64, 67 (1979) - b) Ibid. 79, 375 (1981)

30) H. D. ROTH, M.L.M. SCHILLING, T. MUKAI et T. MIYASHI - Tetrahedron Lett. 24, 5815 (1983)

31) P.J. WAGNER et D.J. BUCHECK - J. Amer. Chem. Soc. 91, 5090 (1969)

32) R. HOFFMAN, P. WELLS et H. MORRISON - J. Org. Chem. 36, 102 (1971)

33) J.GERVAIS, N. BOENS et F.C. DE SCHRYVER - Nouv. J. Chim. 3, 163 (1979)

34) S.L. MATTES et S. FARID - Science 226, 917 (1984) et références citées.

35) H.D. ROTH et A.A. LAMOLA - J. Amer. Chem. Soc. 96, 6270 (1974)

36) R.W. SLOPER, T.G. TRUSCOTT et E.J. LAND - Photochem. Photobiol. 29, 1025 (1979)

37) M. KOIZUMI, S.KATO, N. MATAGA, T. MATSUURA et Y. USUI - "Photosensitized Reactions", Kagakudojin Pub., Kyoto, Japon, Ch. VI et pp. 198 à 205 (1978)

38) a) E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT - Photochem. Photobiol. 29, 861 (1979) - b) M. CRAW, M.R. CHEDEKELL, T.G. TRUSCOTT et E.J. LAND - Ibid. 39, 155 (1984)

39) a) M. TOMKIEWICZ, R.D. Mc ALPINE et M. COCIVERA - Can. J. Chem. 50, 3849 (1972) - b) R.C. SEALY, L. HARMAN, P.R. WEST et R.P. MASON - J. Amer. Chem. Soc. 107, 3401 (1985)

40) W.T. DIXON, P.M. KOK et D. MURPHY - a) J. Chem. Soc. Faraday II 74, 1528 (1978) - b) Ibid. 73, 709 (1977)

41) M.L. MANION-SCHILLING - J. Amer. Chem. Soc. 103, 3077 (1981)

42) F. RIZZUTO et J.D. SPIKES - Photochem. Photobiol. 25, 465 (1977)

43) H. SIEGERMAN - Techniques of electroorganic synthesis, Ed. N.L. WEINBERG, Wiley - Interscience Pub., Vol. V, 2ème partie, Appendice (1975)

44) L. EBERSON et K. NYBERG - Adv. Phys. Org. Chem. 12, p. 110 (1976)

- 45) O. HAMMERICH et V.D. PARKER - *Ibid.* 20, pp. 132-134 (1984)
- 46) E. VOGELMANN, S. SCHREINER, W. RAUSCHER et H.E.A. KRAMER - *Z. Phys. Chem. Neue Folge* 101, 321 (1976)
- 47) A. ANDREONI, R. CUBEDDU, F. DALL'ACQUA, C.N. KNOX et T.G. TRUSCOTT - *Chem. Phys. Letters* 114, 329 (1985)
- 48) Yu E. ORLOV - *Russ. Chem. Rev.* 46, 671 (1977)
- 49) V. BRABEC et V. MORNSTEIN - *Biophys. Chem.* 12, 159 (1980)
- 50) R. KAPTEIN - *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Molecular Biology* - Ed. B. Pullman, D. Reidel, Dordrecht, Pays-Bas, pp. 211 à 229 (1978)
- 51) P.S. SONG, W.M. MANTULIN, D. Mc INTURFF, I.C. FELKNER et M.L. HARTER - *Photochem. Photobiol.* 21, 317 (1975)
- 52) a) A. LANGNER, H. WOLSKA, J. KOWALSKI, H. DURALSKA et E. MURAWSKA - *Int. J. Dermatol.* 15, 688 (1976) - b) H. HONIGSMAN, E. JASCHKE, F. GSCHNAIT, W. BRENNER, P. FRITSCH et K. WOLFF - *British J. Dermatol.* 101, 369 (1979)

--0000000--

## CHAPITRE V

--0000000--

## PARTIE EXPERIMENTALE

--oooOooo--

La majorité des spectres contenus dans ce mémoire ont été enregistrés sur un spectromètre R.M.N. par transformée de Fourier (BRUKER WP-80 SY WG). Seuls quelques-uns, parmi ceux concernant l'étude des dérivés phénothiaziniques en solution aqueuse (au tout début de notre travail), l'ont été également sur un spectromètre à onde continue (JEOL C-60 HL) qui équipait précédemment notre laboratoire. Les résultats sont toutefois identiques dans les deux cas. Nous ne décrirons donc pas ici ce dernier dispositif expérimental, ce qui a déjà été fait au cours d'autres travaux<sup>1</sup>.

### I - ENREGISTREMENT DES SPECTRES DE PHOTO-CIDNP

#### 1 - Le dispositif d'irradiation lumineuse

L'électro-aimant du spectromètre R.M.N. BRUKER WP-80 SY WG est conçu de façon à permettre un accès direct à la tête de mesure. Cette dernière a été réalisée par la société BRUKER qui la commercialise. Il s'agit d'une sonde équipée d'un insert et d'un dewar en quartz. L'irradiation au niveau de la bobine de détection est possible grâce à une ouverture circulaire de 8 mm de diamètre pratiquée sur la face postérieure de la sonde.

Le montage optique est représenté sur la figure 1. La source lumineuse est une lampe haute pression Xénon-Mercure à arc court de 1000 W de puissance (ORIEL). Sur le boîtier de cette lampe sont fixés :

- un premier condenseur en quartz de 50 mm de focale,
- une cellule à filtre liquide de 80 mm de longueur avec circuit de refroidissement,

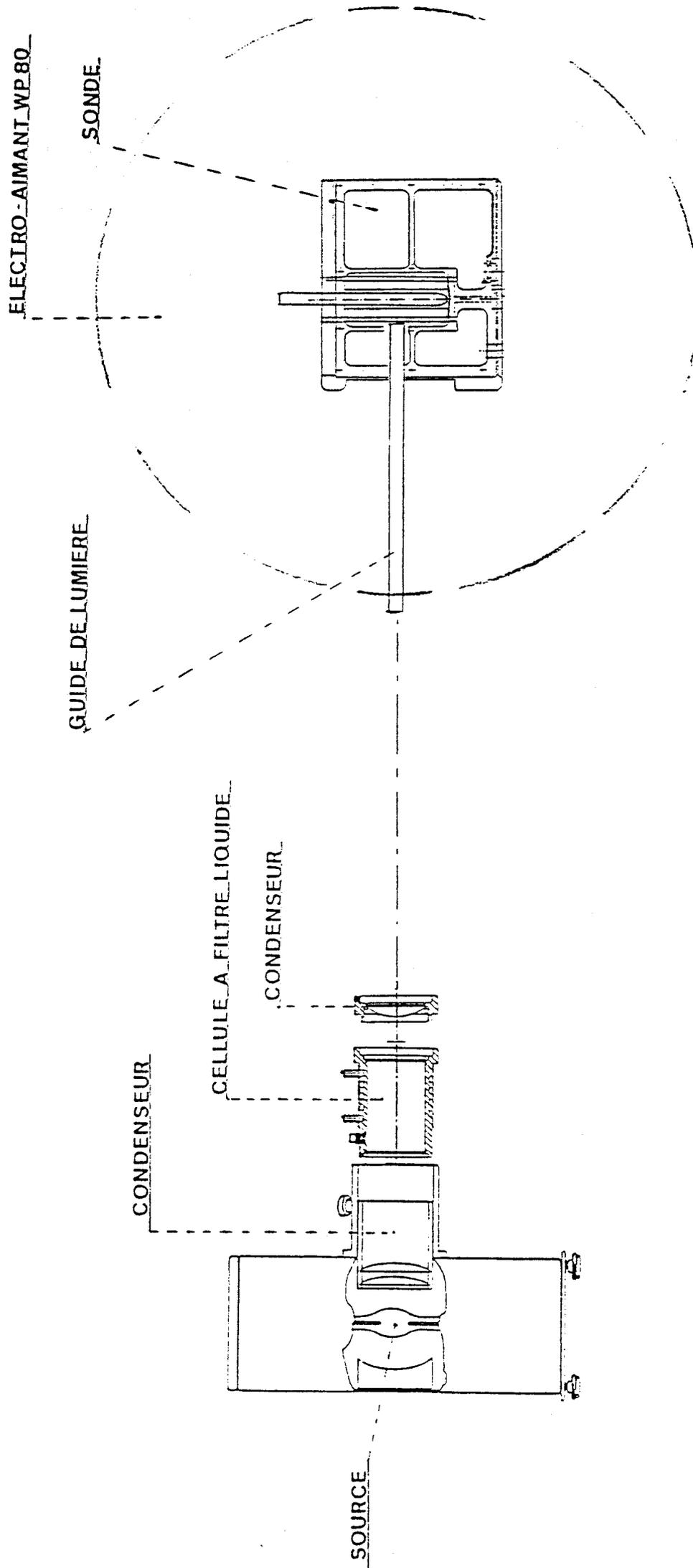


Figure 1

Schéma du montage utilisé pour les expériences de photo-CIDNP.



- un second condenseur en quartz de 250 mm de focale.

Ce dernier permet de focaliser le faisceau lumineux sur la face d'entrée d'un guide de quartz de 8 mm de diamètre et d'une longueur de 500 mm. Celui-ci transmet directement la lumière à l'intérieur de la sonde au niveau de la bobine de détection. Nous pouvons également disposer sur le trajet optique une seconde cellule de refroidissement à circulation d'eau. Celle-ci sert à placer des filtres en verre permettant de sélectionner certaines longueurs d'ondes du spectre d'émission de la source lumineuse.

## 2 - L'enregistrement des spectres

### a) $^1\text{H}$

Nous utilisons une sonde spécifique opérant à 80,130 MHz. Les tubes ont un diamètre de 5 mm et sont en pyrex. Les spectres sont obtenus à partir d'un seul FID. Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au TMS, ou rapportés à cette référence pour les spectres en solution aqueuse où nous avons utilisé le diméthyl-2,2 sila-2 pentane sulfonate de sodium (DSS ;  $\delta / \text{TMS} = 0,015$  ppm).

Un micro-programme nous permet d'enregistrer un FID toutes les 20 secondes. La première impulsion de radiofréquence est émise 15 secondes après le début de l'irradiation. Nous obtenons ainsi une série de spectres (après 15 s, 35 s, 55 s, 75 s, 95 s et 115 s) nous permettant d'observer d'éventuelles évolutions des signaux durant les deux premières minutes d'irradiation.

### b) $^{13}\text{C}$

Nous disposons également d'une sonde spécifique opérant à 20,150 MHz et recevant des tubes de 10 mm de diamètre. Pour les solutions aqueuses des phénothiazines les spectres sont obtenus avec le mode de détection en quadrature de phase. Ils nécessitent l'addition de 1024 FID avec une durée d'impulsion de l'onde de radiofréquence de 3  $\mu\text{s}$  (correspondant à un angle de flip de  $25^\circ$ ). Le délai entre deux impulsions

est de 1 seconde. Les signaux  $^{13}\text{C}$  sont découplés du proton : découplage large bande. La largeur spectrale est de 5000 Hz et le calculateur possède une taille de mémoire de 8K. Il en résulte un temps d'acquisition de 0,819 seconde et une résolution digitale de 1,22 Hz. Les déplacements chimiques sont calculés par rapport au TMS. On introduit à cet effet, dans la solution étudiée, quelques gouttes de dioxane -1,4 dont on considère que le signal est à 67,86 ppm par rapport au TMS.

On notera enfin, qu'aussi bien en  $^{13}\text{C}$  qu'en  $^1\text{H}$ , la température de la sonde est réglée à 343° K pour les solutions aqueuses et à 318° K pour les autres solvants utilisés. Le dégazage des solutions est obtenu en faisant buller de l'azote directement dans le tube RMN pour les solutions aqueuses et par des cycles "congélation - décongélation" sous faible pression ( $10^{-5}$  mm Hg) dans des tubes RMN spéciaux dans les autres cas.

## II - LES PHENOTHIAZINES

### 1 - Origine

Elles nous ont été gracieusement fournies par les laboratoires pharmaceutiques les commercialisant :

- Specia (Paris) pour les chlorhydrates de chlorpromazine et de prométhazine, le maléate de méthopromazine et le fumarate d'aminopromazine.
- Rhône-Poulenc (Vitry-sur-Seine) pour les chlorhydrates de chlorproéthazine et de N-méthyl chloro-2 phénothiazine.
- Squibb (Epernon) pour les chlorhydrates de triflupromazine et de fluphénazine.
- Wyeth-Byla (Paris) pour le chlorhydrate de promazine.
- Sandoz (Nanterre) pour le chlorhydrate de thioridazine.
- Théraplix (Gien) pour le tartrate d'alimémazine.

Nous les avons utilisées sans autre purification, à une concentration de 50 mM.

## 2 - Solvants

L'eau (99,75 %) et l'acétonitrile (99,5 %) deutériés sont des produits de spectrométrie Spin et Techniques (Paris), de même que le chloroforme (99,8 %), l'acétone (99,7 %), le benzène (99,6 %) et le méthanol (99,5 %).

## 3 - Bases des acides nucléiques et nucléotides

Ce sont des produits Aldrich. Les bases utilisées sont l'uracile, la thymine, la cytosine, l'adénine et la guanine. Leurs mononucléotides ont le groupement phosphate fixé sur la position -5'. Il s'agit respectivement : du sel disodique pour l'uridine (UMP), du sel disodique dihydraté pour la thymidine (TMP), des formes acides monohydratées pour la cytidine (CMP) et l'adénosine (AMP), du sel disodique trihydraté pour la guanosine (GMP).

Le dinucléotide (GpC) : guanylyl -3' → 5'-cytidine est un produit Sigma et est commercialisé sous forme de son sel d'ammonium.

En R.M.N. du  $^{13}\text{C}$ , l'attribution des signaux aux différents atomes de carbone de ces composés est faite par comparaison avec des spectres de ces mêmes composés obtenus dans des conditions de température et de pH identiques à celles rencontrées au cours de l'expérience de photo-CIDNP. D'autre part, nous avons également rapproché les déplacements chimiques ainsi mesurés de ceux rapportés dans la littérature<sup>2-5</sup>.

## 4 - Préparation des bases libres des dérivés phénothiaziniques

La méthode consiste à traiter une solution aqueuse de sel de la phénothiazine considérée par un léger excès de soude. La base est alors extraite avec de l'éther éthylique ou de l'éthanol, quand elle ne précipite pas dans la solution. On recristallise dans l'alcool.

Toutes les tentatives que nous avons faites pour préparer, à partir de leur base libre ainsi obtenue, les chlorhydrates des trois dérivés fournis sous forme de sels différents (MPZ, ALMZ et AMPZ) se sont

avérées infructueuses. Nous avons donc essayé de les obtenir in situ en ajoutant quelques gouttes d'acide chlorhydrique directement dans le tube de R.M.N. à une solution contenant la base libre de ces dérivés.

### 5 - Utilisation d'une solution de citrate disodique (SSC)

Nous avons utilisé cette solution dans le but de faire des essais d'irradiation de CPZ en présence d'ADN (acide désoxyribonucléique de thymus de veau fourni par les laboratoires Serva-Heidelberg). Ce dernier y est en effet soluble. Cependant, si les polarisations sont toujours observées dans ce tampon pour les systèmes CPZ/bases des acides nucléiques (y compris GpC), nous n'avons jamais décelé d'effets de CIDNP sur l'ADN.

0,1 M-SSC est une solution décimolaire de citrate disodique. Elle est obtenue en dissolvant 21 g d'acide citrique [ $1H_2O$ ] dans 200 ml de soude normale, puis par dilution à 1 litre avec de l'eau.

### 6 - Comparaison des intensités des polarisations sur GpC

Pour comparer les intensités des polarisations induites par les différentes phénothiazines sur GpC, nous avons mesuré dans chaque cas l'intensité du doublet correspondant au proton H-6 du fragment cytidyle de GpC. Celui-ci a un déplacement chimique de 7,78 ppm et montre de l'absorption exaltée (cf Chap. III, fig. 12). Nous mesurons cette intensité après 15 secondes d'irradiation, et nous la rapportons à celle d'un étalon interne. Ce dernier est constitué par une solution de tertiobutanol placée dans un tube capillaire que nous introduisons à l'intérieur du tube de R.M.N., ce qui nous permet de ne pas l'incorporer au mélange réactionnel. Le signal du tertiobutanol n'est ainsi pas affecté durant l'irradiation. Les résultats obtenus sont alors très reproductibles et les valeurs reportées sont des valeurs moyennes entre plusieurs expériences.

### III - LES FUROCOUMARINES

#### 1 - Origine

Les psoralène, méthoxy -5 et -8 psoralène nous ont été fournis par les laboratoires Promédica (Levallois-Perret). Le triméthyl -4,5',8 psoralène est un produit Sigma. L'hydroxy -5 psoralène est un don de P. Forlot des laboratoires Goupil (Cachan). L'angélicine, synthétisée selon la méthode décrite par R. ROYER et al.<sup>6</sup> nous a été généreusement adressée par ces auteurs. Ces différents composés ont été utilisés sans purification ultérieure.

Tous les autres dérivés nous ont été gracieusement fournis par E. Bisagni (Institut Curie-Orsay). Ils ont tous été synthétisés dans son laboratoire. Le cas échéant, nous nous sommes assurés de leur pureté et l'avons contrôlée par leurs spectres de R.M.N.

#### 2 - Solvants

Les solvants deutériés sont tous des produits de Spectrométrie Spin et Techniques (Paris - cf paragraphe précédent) à l'exception de l'acétonitrile (99,6%) qui provient du Service des Molécules Marquées du C.E.N. de Saclay.

#### 3 - Les acides aminés

Tous les acides aminés et leurs dérivés sont des produits Sigma. Il s'agit de : N-acétyl L-tyrosine, de son ester éthylique, méthoxy -4 L-phénylalanine, N $\alpha$  acétyl L-histidine, N-acétyl DL-tryptophane.

La L-Dopa (dihydroxy -3,4 phénylalanine) est un produit Fluka.

#### 4 - Filtre optique

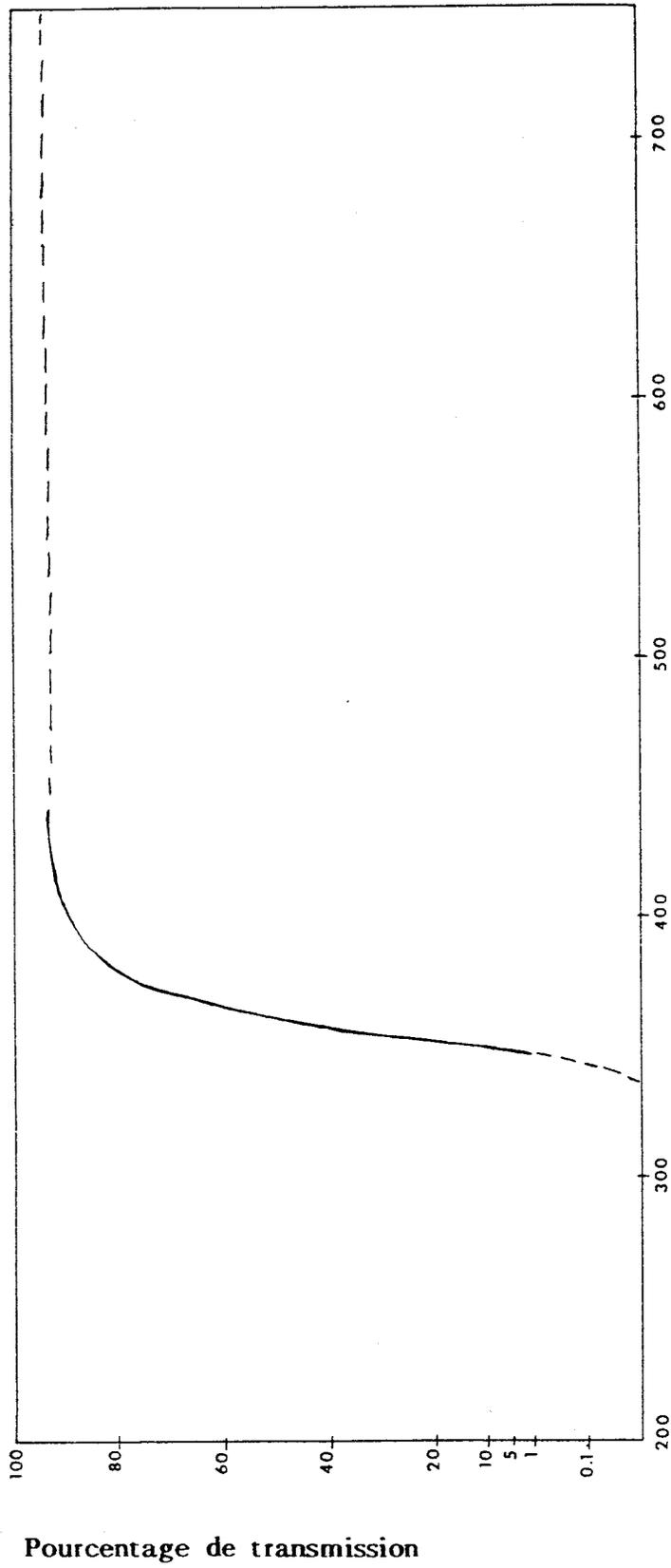
Lors de l'irradiation des systèmes furocoumarines/acides aminés, il faut veiller à ce que la lumière ne soit pas absorbée directement par les acides aminés, auquel cas ces derniers conduiraient à des effets de CIDNP indépendamment de la présence des FC. Il est donc nécessaire de filtrer les longueurs d'onde permettant l'excitation directe des A.A. Ceci

est réalisé à l'aide d'un filtre CORNING CS-052 coupant les radiations inférieures à 330 nm au delà desquelles les A.A. n'absorbent plus. La figure 2 donne le spectre de transmission de ce filtre. On constate aussi que ce filtre transmet plus de 60% de la radiation à 365 nm, i.e. celle qui est couramment utilisée en PUVAthérapie.

### 5 - Comparaison des intensités des polarisation de la N-acétyl-tyrosine

Les concentrations auxquelles nous travaillons ( $4,5 \cdot 10^{-3} M$  à la fois pour FC et AA) ne nous permettent pas d'utiliser le même procédé qu'avec les phénothiazines. L'introduction d'un capillaire dans le tube RMN ne permet pas d'obtenir un bon spectre RMN du mélange avant irradiation. Nous plaçons donc l'étalon interne directement dans la solution. Il s'agit de diméthyl -2,2 sila -2 pentane sulfonate de sodium (DSS -  $10^{-3} M$ ) déjà employé par MUSZKAT et coll<sup>7</sup>. Nous ramenons ainsi l'intensité du doublet correspondant aux protons  $H_{3,5}$  de la tyrosine (avant,  $I_D$ , et pendant irradiation,  $I_L$ ) à celle de ce signal de référence. La polarisation  $I_p$  est ainsi mesurée par le rapport  $\Delta I/I_D$  où  $\Delta I = I_L - I_D$ . Pour chaque furocoumarine, la valeur reportée résulte de la moyenne entre plusieurs mesures effectuées à chaque fois sur des échantillons fraîchement prélevés à partir d'une solution mère. Les plus grands écarts à la valeur moyenne reportée dans le tableau V du chap. IV sont indiqués dans le tableau VI de ce même chapitre. Le spectre pendant irradiation est enregistré 115 s après le début de l'éclairement. Les variations des intensités des polarisations sur TyrOH au cours de cette période sont en effet relativement peu sensibles.

D'autre part, il faut éviter que ces résultats ne soient trop perturbés par des fluctuations de la puissance lumineuse ou par la qualité des filtres de refroidissement à circulation d'eau par exemple. Afin de minimiser l'influence de ces paramètres, nous avons répété les mesures sur un échantillon test (en l'occurrence le 3-CPs) avant chaque nouvelle série de furocoumarines essayées.



Longueur d'onde (nanomètres)

Figure 2

Spectre de transmission du filtre CORNING CS 0-52.



Pourcentage de transmission

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

--0000000--

- 1) S. CAPLAIN et G. VERMEERSCH - *Org. Magn. Reson.* 8, 277 (1976)
- 2) J.L. ALDERFER, R.E. LOOMIS et T.J. ZIELINSKI - *Biochemistry* 21, 2738 (1982)
- 3) D.E. DORMAN et J.D. ROBERTS - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 65, 19 (1970)
- 4) F.E. HRUSKA et W.J.P. BLONSKI - *Can. J. Chem.* 60, 3026 (1982)
- 5) J. UZAWA et M. URAMOTO - *Org. Magn. Reson.* 12, 612 (1979)
- 6) R. ROYER, L. RENE, J.P. BUISSON, P. DEMERSEMAN et D. AVERBECK - *Eur. J. Med. Chem. - Chim. Therapeut.* 13, 213 (1978)
- 7) K.A. MUSZKAT, I. KHAIT et S. WEINSTEIN - *Biochemistry* 23, 5 (1984)

--0000000--

## APPENDICE

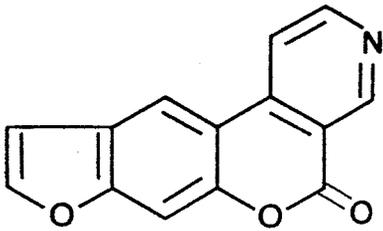
--oooOooo--

Suite aux résultats exposés dans cette thèse, nous avons appliqué notre méthode à d'autres furocoumarines ou analogues comme les homopsoralènes (tableau I). Il s'agit de dérivés soit nouvellement proposés pour leur utilisation en photochimiothérapie (PP, HPP, HPs, 3-CHPs), soit présentant un intérêt d'un point de vue structural par rapport à ceux qui nous ont servis dans notre étude : comparaison du 4-MOP avec les 5-MOP et 8-MOP et influence du mode d'alignement des 3 cycles accolés dans les modèles non linéaires comme l'angélicine (ipPso, aPso et piPso).

Quand ils sont irradiés seuls dans l'acétonitrile, ces composés ne montrent aucune polarisation à l'exception du 4-OHPs. C'est principalement H-3 (E) qui est polarisé dans ce cas, alors que de nouveaux signaux sont visibles vers 8 ppm et 10 ppm. Ces effets correspondent à ceux que nous avons obtenus avec les psoralènes substitués en -3 où le proton H-4 quand il était polarisé, montrait de l'émission. Le 4-MOP n'est par contre pas du tout polarisé. On notera enfin que l'irradiation des homopsoralènes et celle de aPso semblent conduire à une consommation des composés et à une perte de résolution des spectres, sans donner d'effets de CIDNP cependant.

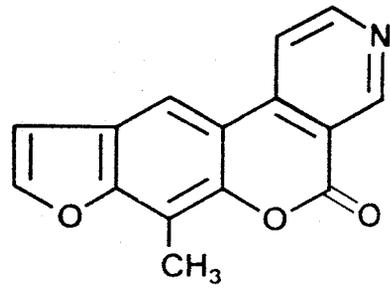
En présence de tyrosine, nous avons indiqué les intensités de polarisation (Ip) provoqués sur cet amino-acide par chacun des dérivés sur le tableau II. Les dérivés sont répartis selon les groupes que nous avons définis au chapitre IV. Ce tableau suggère les commentaires suivants :

- PP, MPP et 3-CHPs se comportent comme des dérivés mono-



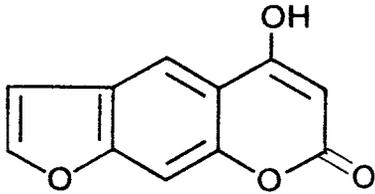
PP

Pyrido (3,4-c) psoralène



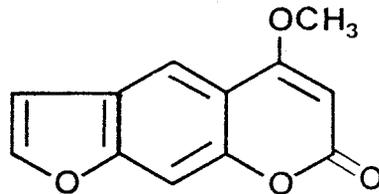
MPP

Méthyl-7 Pyrido (3,4-c) psoralène



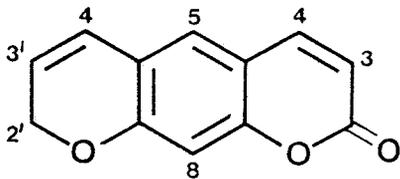
4-OH Ps

Hydroxy-4 psoralène



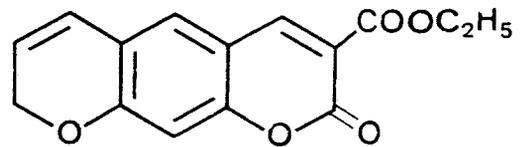
4-MOP

Méthoxy-4 psoralène



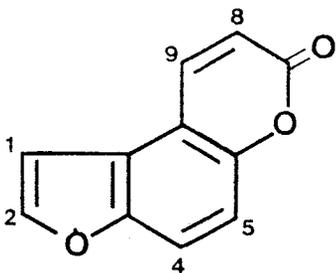
HP

Homopsoralène



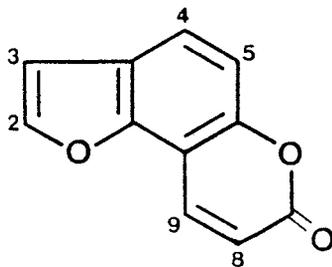
3-CHPs

Carbéthoxy-3 homopsoralène



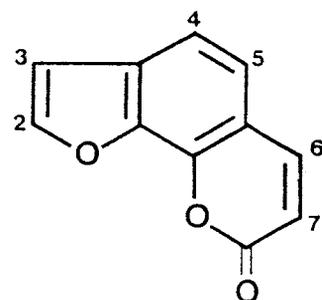
ip Pso

Isopseudopsoralène



a Pso

Allopsoralène



pi Pso

Pseudoisopsoralène



TABLEAU I

Structure des dérivés complémentaires essayés.

Groupe 1

FC	$I_p$	Nature des principales polarisations observées sur FC
4-MOP	0	-
ipPso	0	-
piPso	0	-
aPso	$-0,5 \pm 0,1$	-

Groupe 2

HPs	$-1,1 \pm 0,1$	H-3 (E)
-----	----------------	---------

Groupe 3

4-OHPso	$-5 \pm 1$	H-3 (E) et nouveau pic vers 8ppm
PP	$-4,5 \pm 1,2$	Pas de polarisations nettes
MPP	$-5 \pm 1$	Pas de polarisations nettes
3-CHPs	$-8,3 \pm 1,0$	H-4 (A)



**TABLEAU II : Classification des furocoumarines d'après la méthode de photo-CIDNP.**

fonctionnels. Ces résultats semblent en accord avec les études spectroscopiques<sup>1</sup> ou biologiques<sup>2,3</sup> (méthode identique à celle décrite au chapitre IV, réf. 23) effectuées jusqu'à présent.

On remarquera que pour PP et MPP,  $I_p$  est relativement élevé alors que le rendement de passage intersystème est dix fois plus faible pour ces composés que pour le 3-CPs, par exemple : respectivement 0,02 et 0,04 pour 0,3 dans l'éthanol<sup>4</sup>. Cependant, PP et MPP ne sont eux-mêmes pratiquement pas polarisés.

L'instabilité photochimique de 3-CHPs<sup>3b</sup> se traduit par la consommation apparente de ce composé au cours de son irradiation. Cependant, les éventuels nouveaux photoproduits (qui pourraient défavoriser son utilisation en photochimiothérapie) ne semblent pas avoir une voie de formation de nature radicalaire si l'on se base sur l'absence d'effets de CIDNP sur 3-CHPs (seul H-4 montre de l'absorption exaltée).

- HPs, classé dans le groupe intermédiaire, révèle d'un point de vue biologique un comportement à la fois mono et bifonctionnel, en ce sens qu'il exerce une activité mutagène voisine de celle du psoralène lui-même<sup>5</sup>. Quant aux polarisations visibles sur HPs lui-même, on observe principalement de l'émission pour H-3.

- Le 4-MOP a un comportement identique au 8-MOP, alors que son analogue hydroxylé possède paradoxalement (voir 5-OHPso) une photoréactivité d'un point de vue CIDNP relativement importante.

- Les 3 dérivés angulaires étudiés ici semblent a priori posséder une activité identique, qui les fait ressembler à l'angélicine. Ils n'induisent pas (ou très peu) de polarisations sur TyrOH.

Néanmoins, une différence assez importante apparaît lorsqu'on prolonge l'irradiation de ces dérivés au-delà de la période choisie pour effectuer les mesures de  $I_p$  (1 mn 50 s). En effet, si les spectres obtenus pour ANG et piPso ne sont pas affectés par la durée de l'irradiation, on observe avec ipPso et aPso l'apparition très nette de polarisations à la fois sur la FC (H-8 : E et H-9 : a, pour les deux FC, ainsi que l'apparition de deux nouveaux singulets vers 10,4 et 10,5 ppm avec ipPso) et sur TyrOH ( $I_p \approx -1$  comme pour le

groupe 2). Nous avons déjà observé un tel phénomène avec dH-3CPs et nous l'avons attribué à la formation préalable de photoproduits. Cela ne semble pas être le cas avec ipPso et aPso. Ces résultats confirment en tout cas ceux de l'étude biologique montrant que ipPso et aPso avaient un comportement légèrement différent de piPso. Les photolésions induites par piPso dans l'ADN nucléaire seraient par exemple mieux réparées que dans le cas des deux autres isomères<sup>6</sup>. Les 3 FC angulaires manifestent toutefois une activité monofonctionnelle pure comme l'angélicine, bien qu'elles possèdent une activité photobiologique en générale inférieure à ce dérivé. La photo-CIDNP les classe néanmoins dans le groupe 1 des dérivés bifonctionnels. Cette particularité des FC non linéaires, d'ordre géométrique, avait été discutée au §III.4b du chapitre IV.

La situation des deux hétérocycles l'un par rapport à l'autre sur l'homocycle conditionne donc la réactivité des FC angulaires<sup>6</sup>. Les possibilités de liaisons hydrogène tant par les oxygènes hétérocycliques que par l'oxygène du groupe carbonyle pourraient influencer le comportement de la FC comme le suggèrent des études cristallographiques<sup>7</sup>.

- Enfin, d'un point de vue global, on constate que les effets de CIDNP, quand ils sont observés, se manifestent toujours sur les mêmes positions correspondant à la double liaison 3,4 du cycle pyrone des psoralènes.

Cette étude complémentaire confirme donc la validité de la méthode dans le classement des FC ainsi que ses limitations déjà évoquées au chapitre IV. Mais elle révèle que la photo-CIDNP est également capable de détecter des différences plus subtiles au niveau des isomères angulaires des FC par exemple.

Les composés étudiés dans cet appendice nous ont été gracieusement fournis par R. ROYER et J.P. BUISSON (Institut Curie-Paris) à l'exception de PP et MPP. Ces derniers, synthétisés au laboratoire de E. BISAGNI<sup>8</sup> (Institut Curie-Orsay), nous ont été transmis par R.V. BENSASSON (Muséum National d'Histoire Naturelle-Paris).

Nous leur en sommes très reconnaissants.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

--oooOooo--

- 1) J. BLAIS, P. VIGNY, J. MORON et E. BISAGNI - Photochem. Photobiol. 39, 145 (1984)
- 2) a) D. AVERBECK, S. AVERBECK, E. BISAGNI et L. MORON - Mutation Res. 148, 47 (1985) - b) L. DUBERTRET et al. - Biochimie 67, 417 (1985)
- 3) a) D. AVERBECK, M. MORADI, M. FAULQUES, L. RENE et R. ROYER - Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther. 18, 15 (1983) - b) D. AVERBECK, S. NOCENTINI, M. FAULQUES, L. RENE et R. ROYER - Photochem. Photobiol. 41, 401 (1985)
- 4) R.V. BENSASSON - Communication personnelle
- 5) M. FAULQUES, L. RENE, R. ROYER, D. AVERBECK et M. MORADI - Eur. J. Med. Chem. - Chim. Ther. 18, 9 (1983)
- 6) R. ROYER, L. RENE, J.P. BUISSON, P. DEMERSEMAN et D. AVERBECK - Ibid. 13, 213 (1978)
- 7) G. BRAVIC, J.P. BIDEAU, J. GAULTIER, L. RENE et R. ROYER - Ibid. 16, 465 (1981)
- 8) J. MORON, C.H.N'GUYEN et E. BISAGNI - J. Chem. Soc. Perkin I, 225 (1983)

--oooOooo--

--00000000--

**CONCLUSION**

--00000000--

Notre travail illustre différents aspects de l'apport de la technique de polarisation nucléaire dynamique induite photochimiquement (photo-CIDNP) à l'étude du comportement de composés photosensibilisants à usage thérapeutique : les phénothiazines et les furocoumarines.

● Le premier aspect est une contribution à la compréhension des processus primaires intervenant au cours des photoréactions de ces dérivés irradiés en solution, seuls ou en présence de différents substrats biologiques qui constituent en général leurs cibles d'attaque privilégiées *in vivo*. Grâce au pouvoir de haute résolution de la spectroscopie RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$ , nous avons pu identifier, dans le cas des dérivés à structure phénothiazinique, des photoproduits qu'il est difficile d'isoler du mélange réactionnel par des méthodes conventionnelles. Le mécanisme de leur formation est proposé en accord avec les règles de KAPTEIN. La comparaison de onze phénothiazines met ainsi en évidence l'influence sur leur photoréactivité, à la fois de la nature du substituant en position 2 du cycle aromatique et celle de la chaîne latérale greffée sur l'azote hétérocyclique.

Des réactions de transfert électronique hautement réversibles ("non-réactions" que la CIDNP est pratiquement la seule à pouvoir détecter) sont également observées avec différentes bases des acides nucléiques : purines et pyrimidines. La phénothiazine y joue le rôle de donneur et son état triplet est probablement concerné par cette réaction. C'est ce même type de réaction qui se produit vraisemblablement entre différentes furocoumarines et des acides aminés aromatiques dont la tyrosine en particulier. Mais cette fois, les furocoumarines sont les accepteurs. De telles réactions n'ont pas lieu par contre, dans des conditions identiques, entre les phénothiazines et les amino-acides d'une part, ou les furocoumarines et les nucléobases d'autre part.

Dans ce dernier cas, il n'est pas exclu cependant qu'on puisse observer des effets de CIDNP sur des adduits entre les deux composés.

Une étude sur un spectromètre RMN opérant à très haut champ (360 MHz ou 400 MHz, par exemple) permettrait peut-être de vérifier l'hypothèse généralement avancée d'intermédiaires de nature radicalaire pour la formation de ces adduits. Jusqu'à présent, dans nos conditions expérimentales habituelles, nous n'avons obtenu aucun résultat exploitable. Les principales difficultés sont liées à la complexité des spectres enregistrés à 80 MHz et aux concentrations nécessitées par les limites de détection de l'appareil. Pour ces concentrations, la photodimérisation des furocoumarines est généralement très rapide et masque la présence des adduits. Les spectres RMN des réactifs, des dimères et des adduits sont ainsi superposés et les différents signaux difficiles à attribuer.

On notera enfin qu'un mécanisme de type D-D est suggéré par les polarisations obtenues lors de l'irradiation de certaines furocoumarines seules en solvant polaire. Les espèces semi-oxydée et semi-réduite de la FC (radical cation-radical anion) seraient ainsi formées par la réaction entre une molécule à l'état excité et une autre molécule identique à l'état fondamental.

Malheureusement, pour toutes les réactions décrites, la nature de l'état excité réactif de la furocoumarine ne peut être précisé sans ambiguïté. On remarquera néanmoins, que les polarisations les plus intenses sont toujours observées au niveau de la double liaison 3,4 du cycle pyrone qui constitue, par conséquent, le site réactif de la molécule.

- Le second aspect de notre travail présente un caractère plus original. Il suggère que la photo-CIDNP permettrait d'évaluer la phototoxicité et/ou la photoactivité de médicaments photosensibilisants au même titre que d'autres systèmes d'étude *in vitro*, actuellement utilisés pour identifier les agents capables d'une activité sur le plan photo-biologique. Elle aurait l'avantage de nécessiter beaucoup moins de manipulations.

Nous avons en effet remarqué que l'intensité des polarisations induites sur les substrats biologiques (nucléobases pour les phénothiazines et amino-acides pour les furocoumarines) était corrélée avec le caractère phototoxique du médicament. Le plus paradoxal est certainement que cette relation soit établie à partir d'une réaction réversible, donc non dommageable, *a priori*, pour la substance cible. Néanmoins, les intensités

mesurées reflètent d'une part, l'indice de phototoxicité des différentes phénothiazines et d'autre part, le caractère mono-ou bifonctionnel des furocoumarines. Dans notre laboratoire, ce type d'étude est actuellement étendu à d'autres catégories de substances photosensibilisantes à usage thérapeutique.

● Enfin, sur un plan plus fondamental, des incertitudes subsistent quant au mécanisme de certaines des réactions étudiées, particulièrement dans le cas des furocoumarines. Elles proviennent principalement, comme on l'a vu, de la quantité de processus secondaires susceptibles d'entrer en compétition, ou de l'accumulation parfois rapide de photoproduits. Les polarisations observées résultent ainsi de plusieurs voies réactives différentes. Il est évidemment difficile, voire impossible, d'estimer leurs contributions relatives par une étude du phénomène à l'état stationnaire, telle que nous l'avons effectuée. Aussi, le développement récent de la technique de photo-CIDNP résolue dans le temps pourrait fournir un élément de réponse à ce problème.

Les avantages de cette spectroscopie sont exposés à la fin du second chapitre de cette thèse. Rappelons simplement qu'elle permet d'enregistrer des spectres dans le domaine de la microseconde et de suivre l'évolution des polarisations au cours du temps. Elle autorise ainsi, par exemple, (i) la séparation des réactions issues de paires géminées de celles provenant de radicaux libres non corrélés, (ii) la suppression des réactions d'échange annulant certaines polarisations à l'état stationnaire et (iii) l'observation de polarisations nées de processus de cage avant qu'elles ne soient atténuées (ou supprimées) par les polarisations de fuite, de signe contraire, s'établissant sur des échelles de temps généralement bien supérieures à la microseconde.

L'utilisation de cette technique, couplée avec la résonance paramagnétique nucléaire (RPE) qui pourrait permettre de caractériser les radicaux intervenant dans les réactions étudiées, contribuerait certainement à préciser davantage certaines des hypothèses émises dans ce travail.



## R é s u m é

Certaines substances médicamenteuses présentent une réactivité particulière vis-à-vis de la lumière solaire (UV et visible). Cette réactivité peut s'avérer à la fois bénéfique (utilisation de la substance en photochimiothérapie) et néfaste (phototoxicité, photoallergies, ...). C'est le phénomène de photosensibilisation.

Ce travail présente, d'une part, une contribution à l'étude des processus primaires de photoréaction de deux familles de médicaments très répandus à propriétés photosensibilisantes : les tranquillisants phénothiaziniques (type chlorpromazine) et les furocoumarines (psoralènes) utilisées en photochimiothérapie de certaines maladies de peau. Cette étude est réalisée à l'aide d'une technique spectroscopique consistant à enregistrer des spectres de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) de composés soumis à une irradiation lumineuse. Il s'agit de la Polarisation Nucléaire Dynamique Induite photo-Chimiquement ou photo-CIDNP. Des intermédiaires radicalaires et de nouveaux photoproduits sont ainsi identifiés lors de la photoréaction de ces dérivés, seuls ou en présence de substrats biologiques : les bases des acides nucléiques et les acides aminés aromatiques. Le mécanisme de leur formation est discuté.

D'autre part, ce travail montre également que la photo-CIDNP permet de classer, au sein d'une même famille, les différents dérivés selon leurs indices de phototoxicité et/ou de photoréactivité. Elle pourrait donc être utilisée comme méthode-test de ces médicaments, préalablement à d'éventuels essais plus complets.

## M o t s - c l é s

PHOTO-CIDNP - PHOTSENSIBILISATION - PHOTOTOXICITE -  
FUROCOUMARINES - PHENOTHIAZINES - PURINES - PYRIMIDINES -  
ACIDES AMINES - TRANSFERT ELECTRONIQUE.

