

50376  
1988  
41

N° d'ordre: 211

50376  
1988  
41

# THESE

présentée à

L'UNIVERSITE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE LILLE-FLANDRES-ARTOIS

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE



par

*Didier* **LE NOUEN**

Ingénieur

**ETUDE PAR POLARISATION NUCLEAIRE INDUITE PHOTOCHEMIQUEMENT  
(PHOTO-CIDNP) DES REACTIONS DE TRANSFERT DE CHARGE DANS LES  
SYSTEMES PORPHYRINES SYNTHETIQUES HYDROSOLUBLES -  
SUBSTRATS BIOLOGIQUES**



**Soutenu le 24 Mars 1988 devant la commission d'examen :**

- |     |    |                  |            |
|-----|----|------------------|------------|
| Mme | N. | FEBVAY-GAROT     | Président  |
| MM. | A. | GAUDEMER         | Rapporteur |
|     | R. | KAPTEIN          | Rapporteur |
|     | A. | LABLACHE-COMBIER | Examineur  |
|     | A. | DEFOIN           | Examineur  |
|     | J. | MARKO            | Examineur  |
|     | G. | VERMEERSCH       | Examineur  |

*A mes Parents,*

Le présent travail a été réalisé au Laboratoire de Physique de la Faculté de Pharmacie de Lille sous la direction conjointe de Madame N. FEBVAY-GAROT, Professeur à la Faculté de Pharmacie de Lille II, et de Monsieur A. LABLACHE-COMBIER, Professeur à l'Université des Sciences et Techniques de Lille I.

*Je les prie de trouver ici l'expression de mon estime et de ma gratitude pour l'intérêt constant qu'ils ont porté à la réalisation de ce travail.*

Que Messieurs A. GAUDEMER, Professeur à l'Université de Paris-Sud,  
R. KAPTEIN, Professeur à l'Université d'Utrecht, et  
A. DEFOIN, Chargé de Recherche C.N.R.S. à l'Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Mulhouse

*veuillent bien recevoir mes remerciements pour avoir accepté de juger ce travail.*

Je tiens également à remercier tous ceux qui m'ont aidé dans l'accomplissement de ce travail, en particulier :

- Messieurs J. MARKO et G. VERMEERSCH,

*pour leurs inestimables conseils, pour leurs discussions fructueuses sur certains aspects théoriques de ce travail et pour tout ce qu'ils m'ont apporté, tant sur le plan scientifique que sur le plan humain.*

- Monsieur le Professeur STREITH,

*pour m'avoir accueilli dans son laboratoire en m'y confiant la responsabilité du Service de RMN de l'ENSC de Mulhouse. Il m'a éclairé de ses conseils judicieux pour la mise en forme de cet ouvrage et m'a permis d'achever la rédaction de cette thèse tout en exerçant mes nouvelles fonctions.*

- Madame M. PERRE-FAUVET, du Laboratoire de Chimie de Coordination Bioorganique (Université de Paris Sud)

*pour nous avoir gracieusement fourni les porphyrines synthétiques.*

- Mademoiselle V. DESENCLOS,

*qui, avec beaucoup de gentillesse, a contribué à la reproduction des tableaux et figures de cette thèse.*

- Madame J. LECORCHE

*pour avoir accepté de dactylographier cette thèse.*

Je remercie enfin tous mes camarades des Laboratoires, de Physique de la Faculté de Pharmacie de Lille, de Chimie Organique Physique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille, de Synthèse et Photochimie Organiques de l'ENSC de Mulhouse,

*pour toute l'amitié qu'ils m'ont témoignée.*

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

### CHAPITRE I : LA POLARISATION NUCLEAIRE DYNAMIQUE INDUITE PHOTOCHEMIQUEMENT

I - INTRODUCTION	1
II - LES EFFETS OBSERVES	1
III - LA REACTION RADICALAIRE	3
1. Formation de la paire radicalaire centrale	3
2. Evolution de la paire radicalaire	5
IV - PROPRIETES MAGNETIQUES DES COUPLES DE RADICAUX	5
1. Le mélange S-T <sub>0</sub>	5
2. Comment la C.I.D.N.P. est-elle engendrée ?	9
V - LES REGLES DE KAPTEIN	12
VI - ASPECTS RECENTS DE LA PHOTO-C.I.D.N.P.	13
1. La C.I.D.N.P. résolue dans le temps	15
2. Le phénomène de "cross-polarization"	18
3. La photo-C.I.D.N.P. bidimensionnelle	19
VII - CONCLUSION	21
BIBLIOGRAPHIE	23

### CHAPITRE II : INTERET, UTILISATION ET PHOTOCHEMIE DES PORPHYRINES

I - INTRODUCTION	26
II - MECANISMES ET TYPES DE REACTIONS PHOTOSENSIBILISANTES DANS DES SYSTEMES BIOMEDICAUX	30
III - LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE DES CANCERS PAR LES PORPHYRINES	33
1. Historique	33
2. Aspect clinique de la photochimiothérapie	34
3. Nature des porphyrines utilisées dans ce traitement	34
4. Cibles de phototoxicité et action photodynamique des porphyrines	37
5. Perspectives	41

IV - PHOTOCHEMIE DES PORPHYRINES	42
1. Généralités	42
2. Irradiation des porphyrines seules en solution	44
3. Irradiation des porphyrines en présence de substrats	47
4. Utilisation de la CIDNP dans l'étude photochimique des porphyrines	56
V - CONCLUSION	58
BIBLIOGRAPHIE	60

**CHAPITRE III : ETUDE PAR CIDNP  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  DES PHOTOREACTIONS INDUITES DANS LES SYSTEMES PORPHYRINES- DERIVES QUINONIQUES ET PORPHYRINES-NUCLEOBASES**

I - INTRODUCTION	70
II - RESULTATS EXPERIMENTAUX	74
1. Protocole expérimental	74
2. Irradiation des porphyrines seules en solution	74
3. Irradiation en présence des agents électro-donneurs	78
4. Etude par CIDNP de la photoréaction de différentes porphyrines avec les nucléobases	85
III - INTERPRETATION DES RESULTATS	94
1. Porphyrines seules	94
2. Interaction porphyrines - agents électro-donneurs	98
3. Interaction porphyrines - nucléobases	108
IV - CONCLUSION	120
BIBLIOGRAPHIE	123

**CHAPITRE IV : ETUDE PAR PHOTO-CIDNP DE L'INTERACTION DES PORPHYRINES AVEC DIFFERENTS ACIDES AMINES**

I - INTRODUCTION	129
II - RESULTATS	130
1. Cas de la Tyrosine	130
2. Cas du Tryptophane	139
3. Cas de l'Histidine	142
III - DISCUSSION	145
1. Cas de la Tyrosine	147
2. Cas du Tryptophane et de l'Histidine	168
3. Réactivité des porphyrines	174

IV - CONCLUSION	176
BIBLIOGRAPHIE	178

## **CHAPITRE V : PARTIE EXPERIMENTALE**

I - ENREGISTREMENT DES SPECTRES DE PHOTO-C.I.D.N.P.	182
II - LES PRODUITS	186
III - METHODOLOGIE ET MESURES	187
BIBLIOGRAPHIE	195

## **CONCLUSION GENERALE**

I N T R O D U C T I O N



## INTRODUCTION

Cette thèse résulte d'une collaboration entre les laboratoires de Chimie Organique Physique de l'Université des Sciences et Techniques de Lille (Lille I - Professeur A. LABLACHE-COMBIER) et de Physique de la Faculté de Pharmacie de Lille (Lille II - Professeur N. FEBVAY-GAROT). Elle a été essentiellement réalisée dans ce dernier laboratoire dont l'axe de recherche principal est l'application d'une technique de RMN, la Polarisation Nucléaire Induite Photochimiquement (CIDNP), à l'étude du comportement photochimique de molécules photosensibilisantes à activité thérapeutique et de leurs mécanismes de réaction.

Selon cette optique, nous nous sommes intéressés à l'étude du pouvoir photosensibilisant d'une série de composés : les porphyrines. Ceux-ci font actuellement l'objet de nombreux travaux, liés à l'usage du dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) en photochimiothérapie pour le traitement des tumeurs malignes résistantes aux thérapeutiques classiques. Les modes d'action de ces substances restent mal connus car complexes.

Toutefois il a été montré que leur "action photodynamique" faisait intervenir les deux mécanismes : type II prépondérant (oxygène singulet) et type I (radicalaire).

Au niveau moléculaire leur action résulte principalement dans la photooxydation des liaisons insaturées des lipides, des acides aminés (tryptophane, histidine) constituant les protéines, des bases des acides nucléiques (guanine) constituant l'ADN et l'ARN.

Les photoréactions radicalaires induites par les porphyrines ont été peu étudiées. Nous proposons par ce travail d'approfondir la connaissance des processus primaires de photoréactions radicalaires des porphyrines grâce à l'apport "classique" de la photo CIDNP qui permet :

- La mise en évidence du caractère radicalaire de ces réactions,
- L'identification éventuelle de nouveaux photoproduits,
- L'étude du comportement photochimique de ces agents seuls en solution, ou en présence de modèles de substrats biologiques qui constituent leurs cibles d'attaque privilégiées dans l'organisme (acides aminés, bases des acides nucléiques),
- L'établissement d'un mécanisme réactionnel.

Cette thèse présente dans un premier chapitre un rappel succinct des bases théoriques du phénomène de CIDNP et certains développements récents de cette technique (chapitre I).

Le second chapitre est consacré, dans une première partie, à une revue qui résume les principaux résultats des études concernant l'action photodynamique des porphyrines lors de leur utilisation en photochimiothérapie des cancers (PCT) (chapitre II, 1ère partie). La seconde partie fait le point sur les connaissances actuelles de la photochimie de ces composés. En particulier elle présente les résultats déjà obtenus sur les porphyrines et leurs analogues (chlorophylle) par CIDNP (chapitre II, 2ème partie).

Les deux derniers chapitres exposent l'ensemble des résultats que nous avons obtenus avec les porphyrines et leur interprétation. Nous nous sommes d'abord intéressés à l'étude photochimique de l'interaction du dérivé de l'hématoporphyrine (HpD), qui est l'agent couramment utilisé en PCT, et de certains de ses constituants avec différents agents électro-donneurs (chapitre III, 1ère partie). Nous avons ensuite étendu notre étude à différentes porphyrines synthétiques hydrosolubles d'une part pour comparer leur réactivité à l'HpD, d'autre part pour simplifier cette étude car l'HpD est constitué d'un mélange d'une dizaine de dérivés généralement difficiles à séparer. Afin d'obtenir une approche du phénomène d'action de ces produits in vivo, nous avons étudié leur comportement photochimique en solution aqueuse vis-à-vis de constituants de substrats biologiques : les nucléobases (chapitre III, 2ème partie) et les acides aminés aromatiques (chapitre IV).

CHAPITRE I

## LA POLARISATION NUCLEAIRE DYNAMIQUE INDUITE PHOTOCHEMIQUEMENT

### I - INTRODUCTION

La polarisation nucléaire dynamique induite photochimiquement ou photo-C.I.D.N.P. se rapporte aux différents processus qui produisent, lors de réactions photochimiques en phase liquide, un déséquilibre des populations des états de spins nucléaires dans les produits formés et les réactifs.

Ces déséquilibres induisent des intensités inhabituelles dans les spectres de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.).

Ce sont les observations publiées par BARGON et al. (1-a,b) en 1967 et indépendamment par WARD et LAWLER (1-c,d) qui ont amené la découverte de ces phénomènes. Mais c'est en 1969 que CLOSS (2-a,b) d'une part, KAPTEIN et OOSTERHOFF (3-a,b) d'autre part, ont proposé une théorie permettant d'expliquer ces effets : le mécanisme par paire radicalaire (M.P.R.). Ce dernier repose sur le fait que dans une paire radicalaire les réactions vont dépendre des interactions magnétiques entre les partenaires de cette paire.

Nous n'allons pas développer plus avant le M.P.R. qui est exposé dans de nombreux ouvrages (4-a,b,c), mais nous donnerons uniquement une description qualitative simplifiée du modèle nécessaire à la compréhension des résultats exposés dans les chapitres III et IV. Nous présenterons également quelques aspects récents de cette technique.

### II - LES EFFETS OBSERVES

Les spectres de C.I.D.N.P. sont des spectres de R.M.N. de système en réaction présentant des transitions d'intensité inhabituelle que l'on appelle polarisations. Les différents effets caractéristiques du phénomène sont regroupés sur la figure 1-1 dans le cas d'un quadruplet du premier ordre.

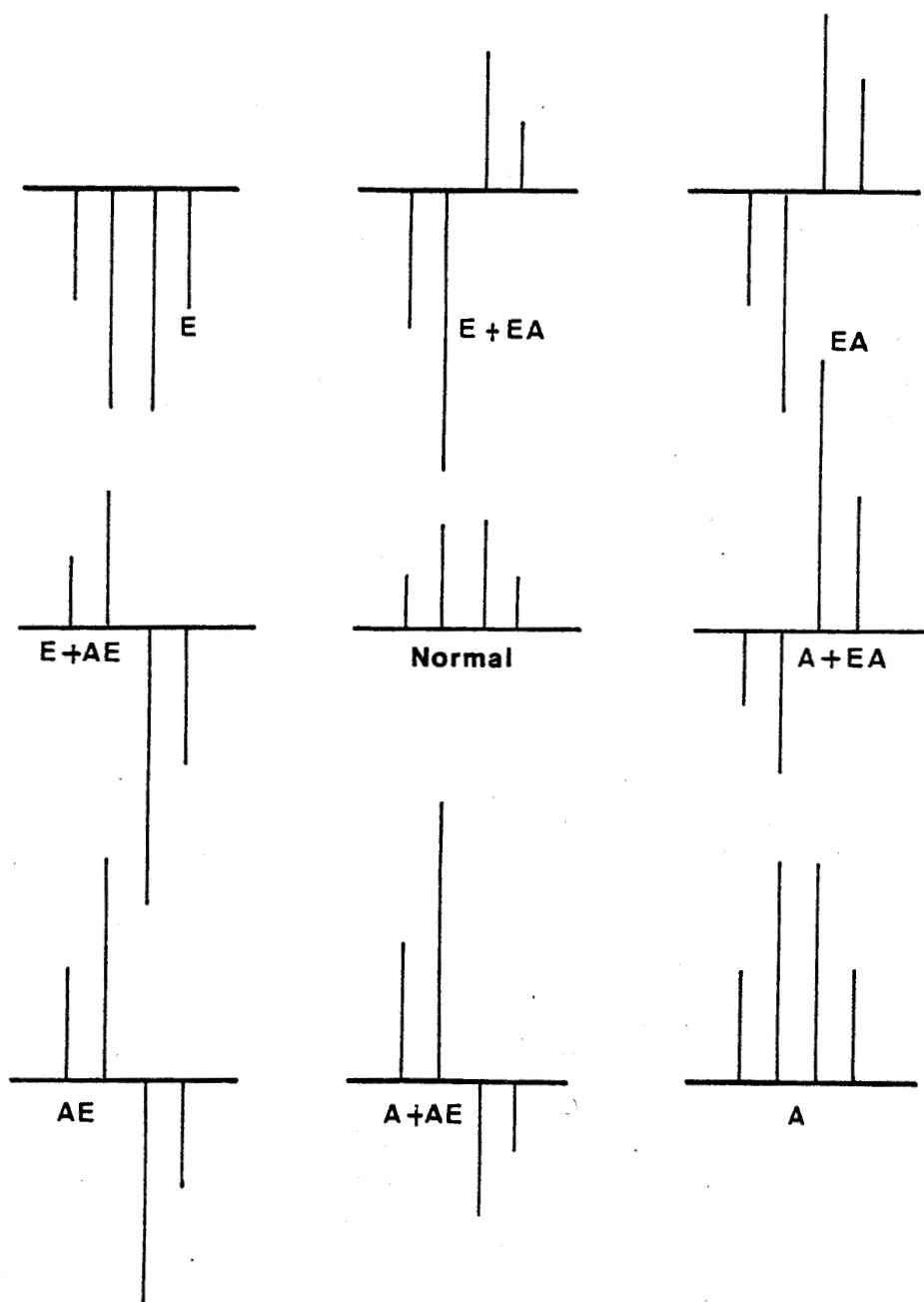


Figure I-1:

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

On peut observer :

- un effet net : toutes les raies du multiplet sont soit en émission (E), soit en absorption exaltée (A).
- un effet de multiplet : certaines raies du multiplet sont en émission pendant que les autres sont en absorption exaltée; cet effet est noté AE ou EA suivant que les raies en absorption sont situées à champ faible ou à champ fort dans le multiplet.
- un mélange des deux effets qui sera noté par exemple A + AE.

### III - LA REACTION RADICALE

Les polarisations obtenues par C.I.D.N.P. proviennent de réactions radicalaires dont l'intermédiaire central est une paire radicalaire.

Le phénomène de C.I.D.N.P. dépend à la fois des mécanismes de formation et d'évolution de la paire qui sont résumés ci-dessous.

#### 1) Formation de la paire radicalaire centrale :(figure 1-2).

Par absorption d'un photon le réactif PT dans son état fondamental ( $S_0$ ) est excité dans un état singulet  $^1PT$  ( $S_1$ ); celui-ci peut réagir de différentes façons :

- par décomposition unimoléculaire ou par réaction bimoléculaire (réactif-substrat),  $^1PT$  conduira à la formation d'une paire radicalaire dans l'état électronique singulet.

- par passage intersystème,  $^1PT$  conduit à l'espèce  $^3PT$  (état triplet excité  $T_1$ ) qui pourra à son tour donner naissance à une paire radicalaire dans un état électronique triplet.

Ces paires radicalaires engendrées par la création simultanée de deux radicaux sont nommées paires géminées singulet ou triplet (paires S ou T).

Enfin, la paire radicalaire peut être formée par rencontre diffusive de radicaux libres créés séparément : c'est alors une paire non géminée appelée paire au "hasard" ou paire F.

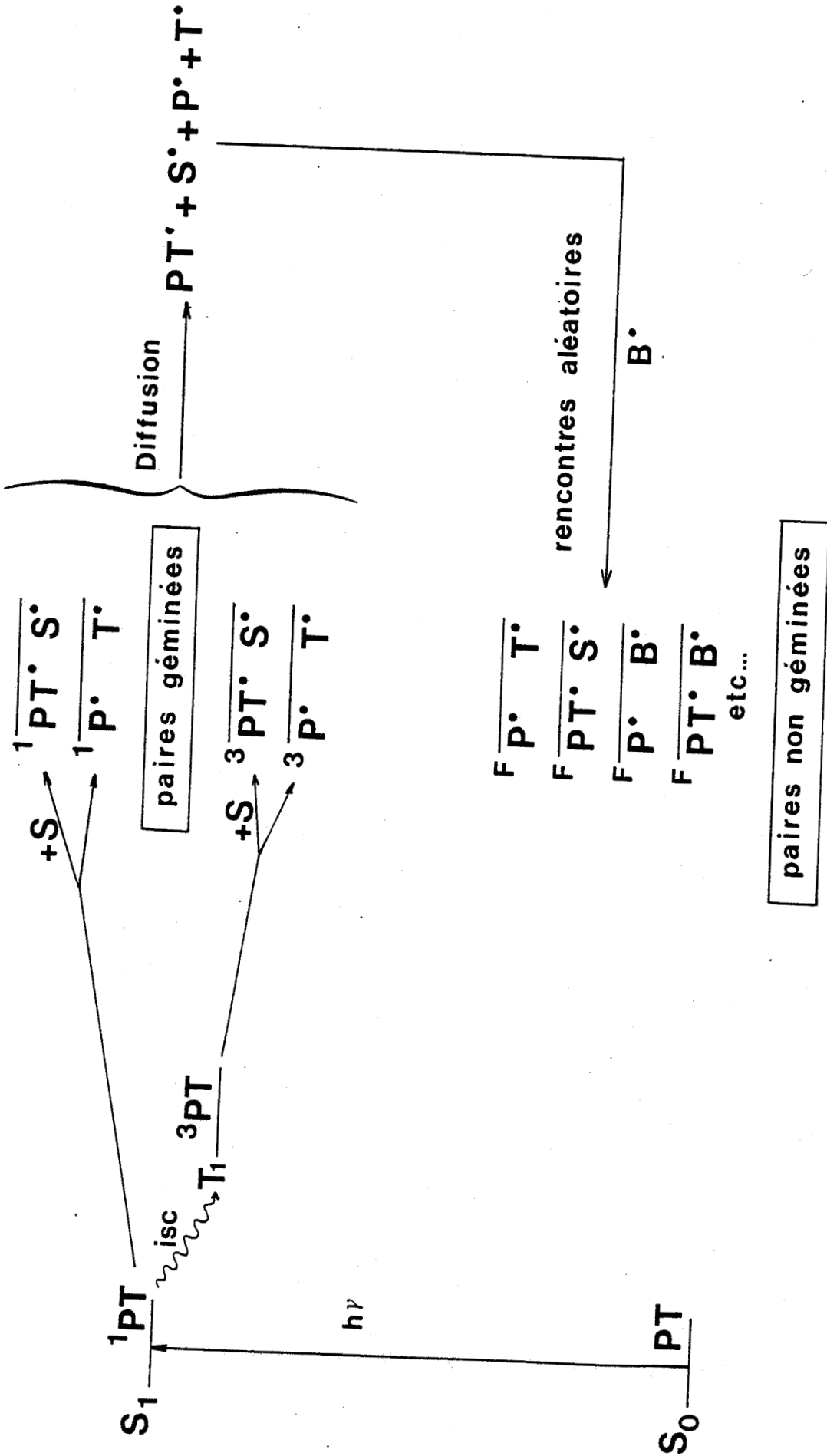


Figure I-2:

Formation de la paire radicalaire centrale  $R_1 R_2$  (PT = réactif ; S = substrat ;  $B \cdot$  = radical libre diffusant formé par une voie indépendante).

## 2) Evolution de la paire radicalaire : (figure 1-3)

La paire centrale peut évoluer ensuite de différentes façons :

- Redonner les produits de départ : c'est une non-réaction (éq. 1).
- Former de nouveaux composés par recombinaison ou par dismutation (éqs. 2 et 3).
- Former de nouvelles paires radicalaires par fragmentation ou réarrangement (éq. 4) et conduire ainsi à la formation de nouveaux produits. Dans ce cas particulier nous pourrions avoir soit un "effet de mémoire" où les polarisations proviendront de la paire initiale, soit un "effet coopératif" où les polarisations dépendront à la fois de paramètres liés à la paire initiale et à la nouvelle paire ainsi formée.

Ces différents cas correspondent à des réactions de cage donnant naissance à des produits de cage.

- Elle peut se séparer pour donner des radicaux libres non corrélés (éq. 6); ceux-ci peuvent être piégés par réaction avec un substrat AB (entre autre le solvant -éq. 7) ou conduire à de nouveaux produits par l'intermédiaire de nouvelles paires formées par rencontre diffusive avec d'autres radicaux (paires F-éq.8). Ce sont alors des produits de fuites.

Ce type de produit peut être également formé :

- par piégeage des radicaux au sein de la paire géminée par un substrat AB (éq. 5)
- par des réactions de dimérisation de radicaux diffusant (éq. 9)

Les polarisations obtenues au cours de ces différentes réactions photochimiques dépendent à la fois des états précurseurs (S, T, F) et de la nature des produits formés (cage, fuite), mais aussi des propriétés magnétiques des couples de radicaux.

## IV - PROPRIETES MAGNETIQUES DES COUPLES DE RADICAUX

### 1) Le mélange S - To :

On admet l'hypothèse suivante : on associe le couple de radicaux formant la paire à une somme de deux radicaux.



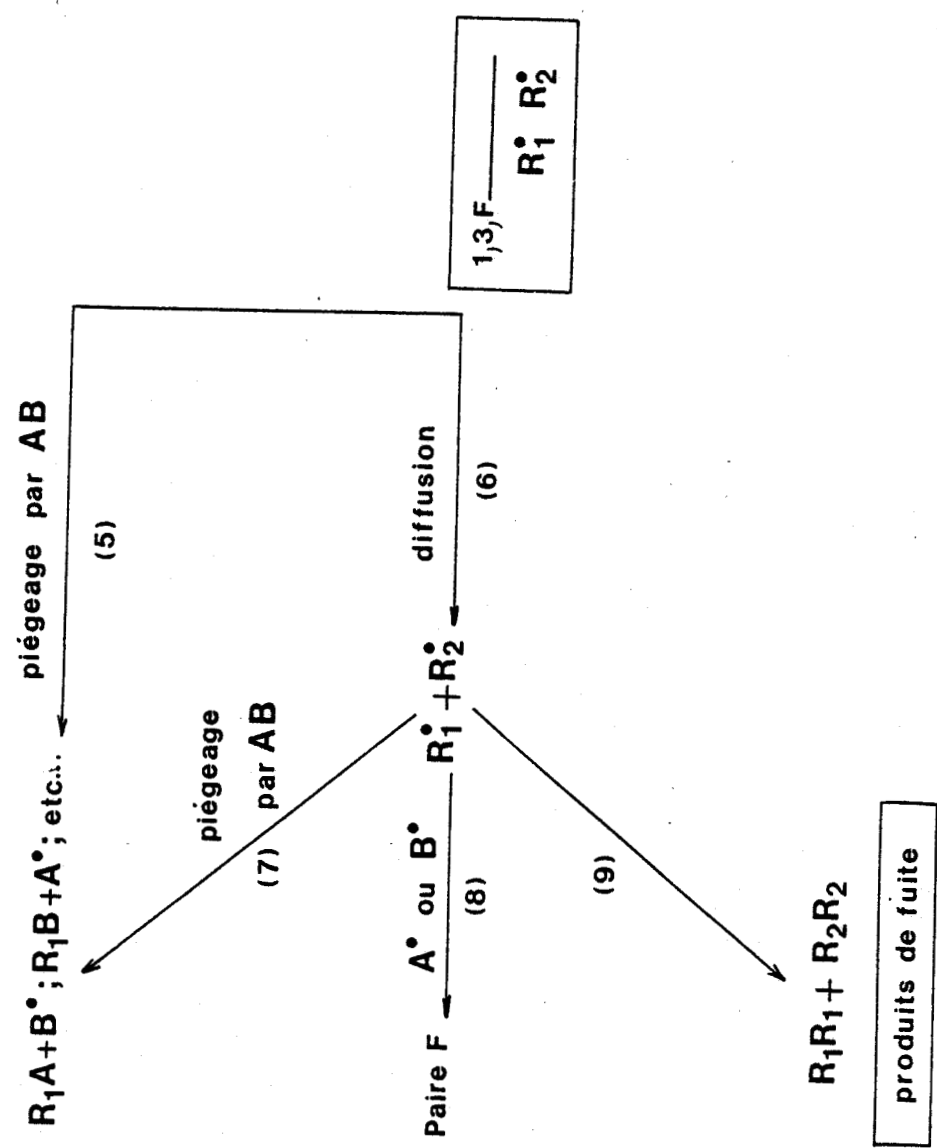
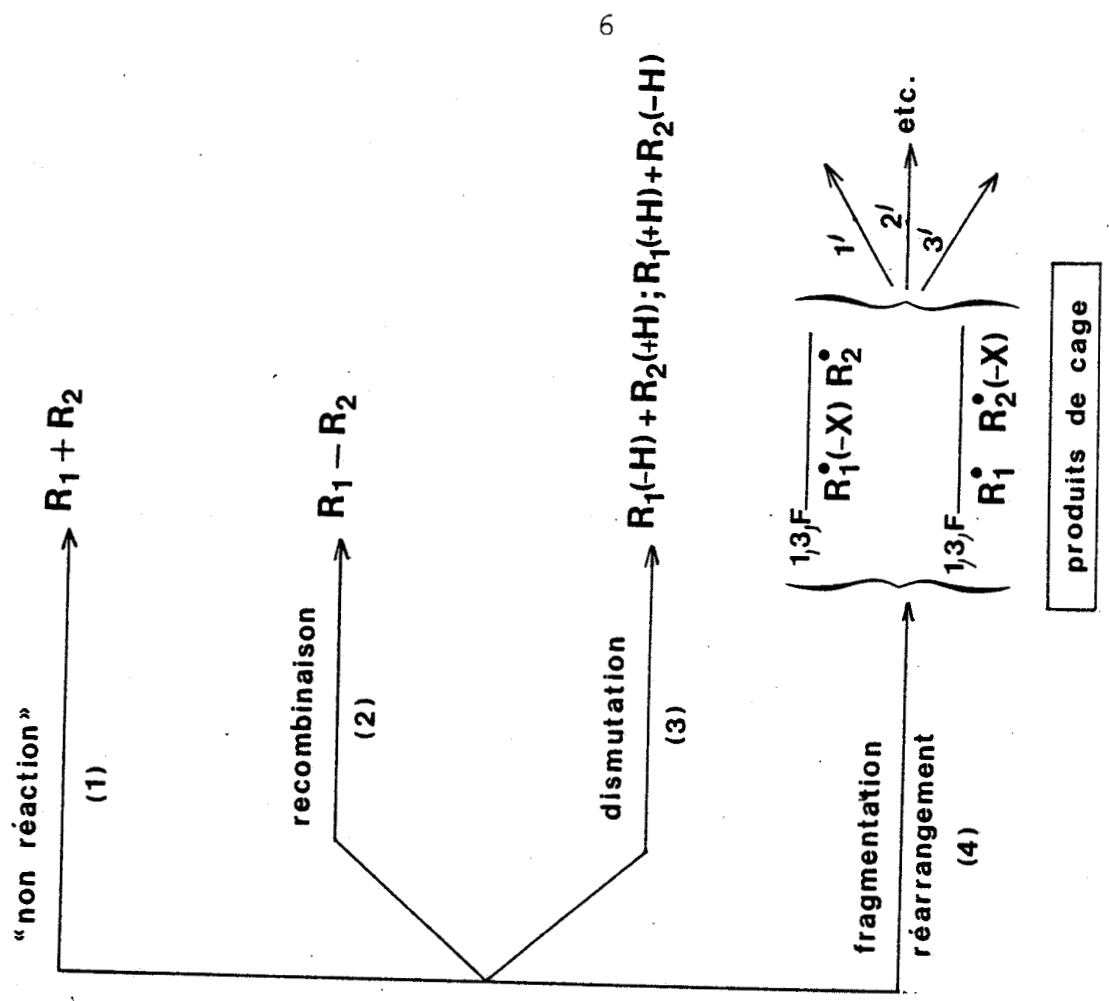


Figure I-3:

Evolution de la paire radicalaire.

La distribution de spin électronique dans un couple de radicaux peut être décrite par deux cas extrêmes : la répartition des deux spins électroniques peut correspondre (i) à un état triplet avec une résultante nette du moment angulaire de spin égale à un ou  $\pm 1$ , (ii) à un état singulet dans lequel le spin résultant est égal à zéro. Dans un champ magnétique  $H_0$ , la dégénérescence de l'état triplet est levée et le spin est quantifié le long de la direction du champ magnétique avec des nombres quantiques  $+1$ ;  $0$  et  $-1$ . On peut représenter les états triplet T et singulet S par un modèle vectoriel comme le montre la figure I-4.

Lorsque les vecteurs spins électroniques sont placés dans un champ magnétique  $H_0$ , il s'animent d'un mouvement de précession autour de l'axe du champ avec une vitesse angulaire  $\omega_j(v)$  :

$$\omega_j(v) = g_j \frac{\beta}{h} H_0 + \sum_i a_{ji} m_{ji}(v)$$

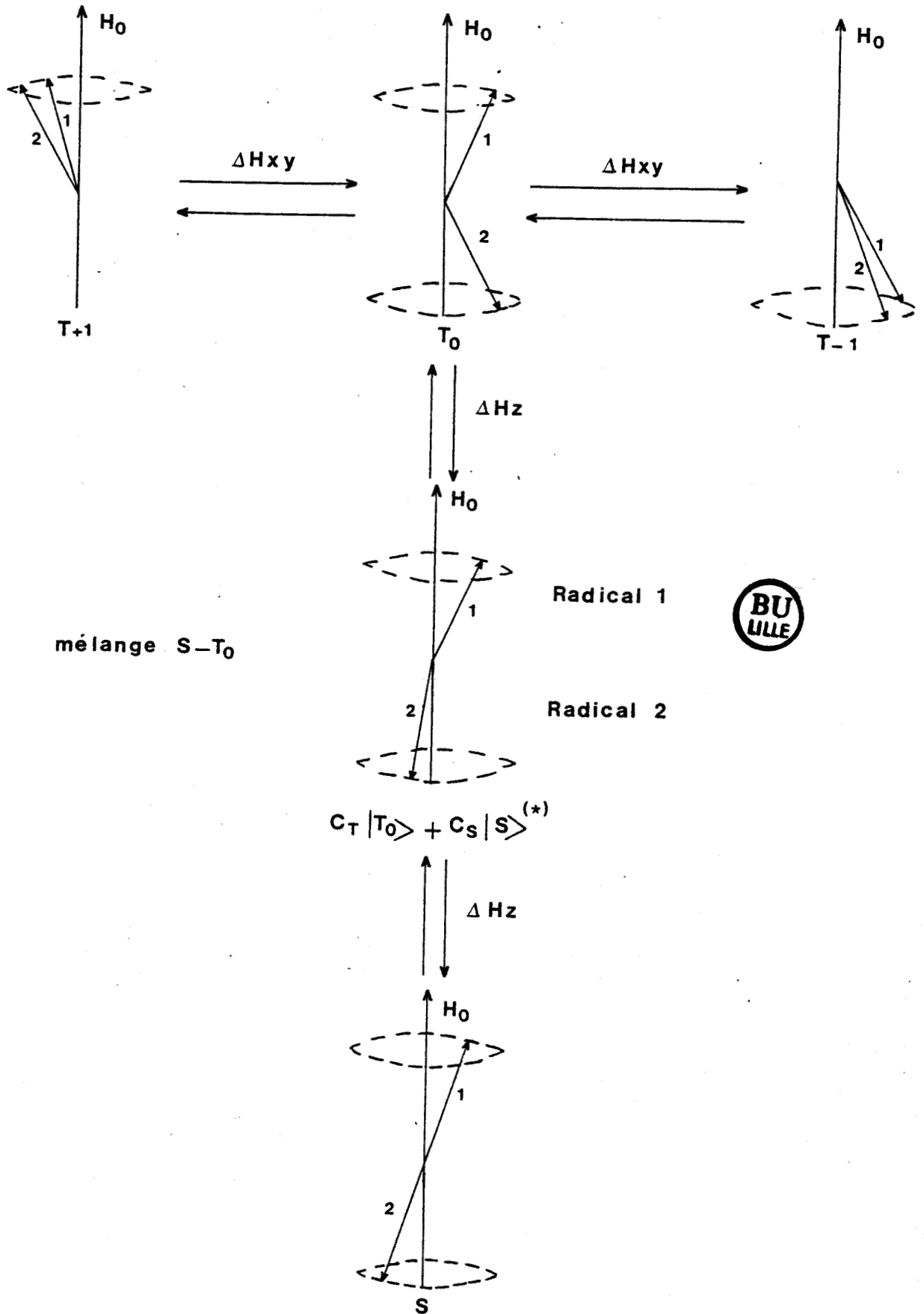
où  $\beta$  est le magnéton de BOHR,  $\frac{h}{2\pi} = h/2\pi$  avec  $h$  = constante de PLANCK,  $g_j$  le facteur de LANDE du radical  $j$  ( $j = 1, 2$ );  $a_{ji}$  est la constante de couplage hyperfin électron-noyau du  $i$ -ème noyau du radical  $j$ ,  $m_{ji}$  est le nombre quantique magnétique du  $i$ -ème noyau du radical  $j$  dans l'état de spin nucléaire  $v$ .

Dans un radical, le couplage spin-orbite introduit un champ magnétique local proportionnel au champ  $H_0$ . Si les couplages spin-orbite ne sont pas identiques pour les deux composantes, un processus de déphasage entre les spins se produit ( $\omega_1(v) \neq \omega_2(v)$ ). Deux facteurs peuvent induire ce déphasage :

- les facteurs de LANDE ( $g_j$ ), dans le cas où  $g_1 \neq g_2$ . Ceci contribuera principalement aux effets nets.
- les constantes de couplage hyperfin ( $a_{ji}$ ); dans le cas où  $g_1 = g_2$ . Nous obtiendrons dans ce cas des effets de multiplets.

Par ce processus un couple de radicaux formés à partir d'un état S (spins antiparallèles) peut être converti en un état triplet  $T_0$  (via un mélange S- $T_0$  - figure I-4).

Il est possible d'obtenir les mélanges S- $T_{-1}$ , et S- $T_{+1}$ , par basculement des spins à bas champ. Toutefois, comme dans le cas du spectromètre de R.M.N. utilisé le champ est de 1,879 Tesla, seul le mélange S- $T_0$  intervient à champ fort (5).



mélange  $S-T_0$

Figure I-4:

Représentation vectorielle de l'interaction de deux spins électroniques couplés faiblement et placés dans un champ magnétique  $H_0$ .  
 $C_T$  et  $C_S$  représente les contributions respectives des fonctions d'onde électronique triplet ( $|T_0\rangle$ ) et singulet ( $|S\rangle$ ).

Cette évolution de l'état électronique de la paire au cours du temps conditionnera sa réactivité et conduira ainsi par recombinaison (6-a,b) aux espèces polarisées.

## 2) Comment la C.I.D.N.P est-elle engendrée ?:

Compte tenu des mécanismes des réactions radicalaires et des propriétés magnétiques des couples de radicaux que nous venons de décrire, nous pouvons établir un modèle simple permettant d'expliquer l'origine du phénomène de C.I.D.N.P. Nous le décrirons dans le cas de polarisations montrant des effets nets.

Considérons la réaction générale de la figure 1-5.

Une molécule  $R_1H-R_2$  dans un état triplet excité donne naissance par coupure homolytique à une paire de radicaux  $\overline{R_1H^\bullet R_2^\bullet}^T$  (la barre indiquant que les spins électroniques des deux partenaires sont corrélés). On suppose ici que le proton du premier radical est le seul noyau magnétique, afin de simplifier le problème. La paire radicalaire  $\overline{R_1H^\bullet R_2^\bullet}^T$  peut évoluer suivant deux voies :

- i) soit par diffusion, pour donner des radicaux libres qui réagissent indépendamment pour former des produits de fuite  $R_1H-X$  et  $R_2-Y$ .
- ii) soit par croisement intersystème (mélange S-To) pour passer dans un état singulet. Cet état, pour lequel les spins électroniques sont anti-parallèles (état liant), peut réagir directement pour donner des produits diamagnétiques de recombinaison.

La constante d'interconversion entre les états S et To ( $K_{isc}$ ), pour une configuration de spin nucléaire donnée, dépend des facteurs de LANDE et des constantes de couplage hyperfin des radicaux.

$$K_{isc}(\nu) \approx \Delta \omega_{1,2}(\nu) = (g_1 - g_2) \frac{\beta}{h} H_0 + m(\nu) A_H \quad \nu = \alpha, \beta$$

Prenons l'exemple de la figure 1-5 ou  $g_1 > g_2$  et  $A_H < 0$ .

Dans ces conditions le passage inter-système est plus rapide pour les paires radicalaires où le proton du radical  $R_1H^\bullet$  est dans un état de spin  $\beta$  ( $m = -\frac{1}{2}$ ) puisque  $K_{isc}(\beta) > K_{isc}(\alpha)$ . Les paires à l'état singulet se formeront plus rapidement à partir d'une configuration de spin nucléaire  $\beta$  et montreront ainsi une tendance à donner des réactions de recombinaison.

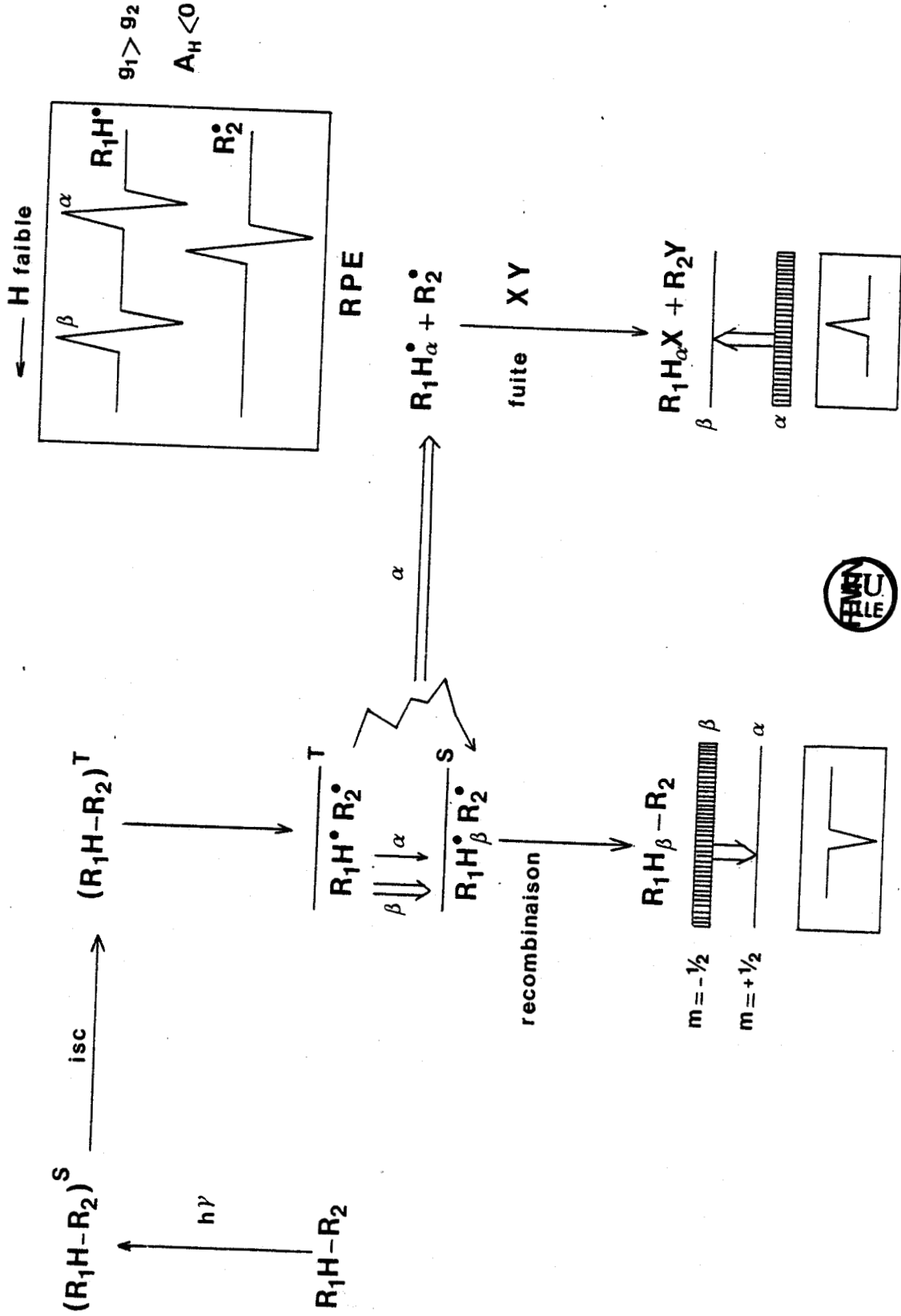


Figure I-5:

Représentation schématique du processus de sélection de spin responsable des effets de CIDNP.

De même les paires ayant les protons du radical  $R_1H^\bullet$  dans un état de spin  $\alpha$  ( $m = +\frac{1}{2}$ ) sont davantage susceptibles de se séparer, donc de former des produits de fuite (l'état triplet étant un état répulsif). Ce processus de sélection de spin induit un déséquilibre des populations de spin nucléaire des produits se traduisant dans les spectres de R.M.N par des intensités "anormales" : nous obtiendrons ainsi de l'émission (E) pour  $R_1H-R_2$ ; de l'absorption exaltée pour  $R_1H-X$ .

L'effet de multiplet peut s'expliquer par un modèle analogue.

Le mélange S-To induisant le processus de C.I.D.N.P. se fait généralement à l'échelle des temps de passage intersystème, soit entre 1 et 10 nanosecondes. Les polarisations ainsi créées persistent pendant le temps de la relaxation spin-réseau ( $T_1$ ) au sein des produits (1 à 10 secondes pour les protons des petites molécules; 0,3 à 2 secondes pour ceux des macromolécules). Ceci permet leur détection par R.M.N. Un petit effet de C.I.D.N.P. peut produire des changements significatifs au niveau de l'intensité des signaux de R.M.N. Ainsi des exaltations de l'ordre de 10-100 sont couramment observées.

Toutefois les différents effets de C.I.D.N.P. peuvent être atténués ou perturbés par des réactions secondaires (dismutation, réactions d'échanges (?)) compromettant ainsi leur observation. Certaines propriétés des effets de C.I.D.N.P. observées à champ fort ont pu être mises en évidence par la théorie de la paire radicalaire et vérifiées expérimentalement:

- L'effet net provient uniquement de paires pour lesquelles  $\Delta g \neq 0$  contrairement à l'effet de multiplet où  $\Delta g = 0$ .
- Le signe des polarisations dépend du signe de  $\Delta g$  et de  $a_i$ .
- Les précurseurs T et F donnent des polarisations inverses de celles d'un précurseur S.
- Les produits de cage et de fuite provoquent des polarisations de signe opposé.

Les règles de Kaptein rassemblent ces différents paramètres.

## V - LES REGLES DE KAPTEIN

On peut prédire qualitativement la nature des polarisations par deux règles simples de multiplication de signes : ce sont les règles de KAPTEIN (8).

- La première concerne l'effet net.

Pour un noyau  $i$  situé sur un radical  $R$ , la polarisation nette est donnée par :

$$\Gamma_{ne}(i) = \mu \cdot \epsilon \cdot a_i \cdot \Delta g$$

où

$\mu$  : désigne la multiplicité du précurseur. Il est positif pour un précurseur T ou F, négatif pour un précurseur S.

$\epsilon$  : dépend du type de produit; il sera positif pour un produit de cage, négatif pour un produit de fuite.

$a_i$  : est le signe de la constante de couplage hyperfin du noyau  $i$ . Celle-ci est généralement déterminée par R.P.E

$\Delta g = g_1 - g_2$  : c'est la différence des facteurs de LANDE des radicaux 1 et 2, où  $g_1$  est le facteur de LANDE du radical 1 portant le noyau  $i$ .  $g$  est également déterminé par R.P.E.

- La seconde concerne l'effet de multiplet.

Pour deux noyaux (ou groupes de noyaux) couplés  $i$  et  $j$ ; la polarisation du multiplet est donnée par :

$$\Gamma_{me}(i,j) = \mu \cdot \epsilon \cdot a_i \cdot a_j \cdot J_{ij} \cdot \sigma_{ij}$$

Dans le cas de l'effet de multiplet, la différence  $g_1 - g_2$  est nulle et n'intervient plus; en plus des paramètres cités plus haut, deux nouveaux paramètres entrent en jeu :

$J_{i,j}$  : c'est le signe de la constante de couplage de spin nucléaire entre les noyaux  $i$  et  $j$  (celle-ci intervient sur la position des niveaux et est déterminée par R.M.N.).

$\sigma_{i,j}$  : est un paramètre de position, il est positif quand les noyaux  $i$  et  $j$  sont situés sur le même radical, négatif quand les noyaux  $i$  et  $j$  sont situés sur des radicaux différents.

Pour appliquer ces règles, il suffit d'effectuer le produit des signes de ces paramètres afin de déterminer la nature de la polarisation.

Ainsi si :

$$\Gamma_{ne}(i) = \begin{cases} +, & \text{nous aurons un effet net en absorption exaltée, noté A.} \\ -, & \text{nous aurons un effet net en émission, noté E.} \end{cases}$$

$$\Gamma_{me}(i, j) = \begin{cases} +, & \text{nous aurons un effet de multiplet en émission-absorption,} \\ & \text{notée EA.} \\ -, & \text{nous aurons un effet de multiplet en absorption-émission,} \\ & \text{notée AE.} \end{cases}$$

Ces règles ne sont valables qu'à champ fort et pour des couplages du premier ordre. Elles peuvent être utilisées pour obtenir facilement des informations sur l'un des paramètres de ces deux équations à partir des spectres de CIDNP. On peut remonter ainsi à la nature de la paire de radicaux (9), au mode de formation des produits (10), ou à une estimation des paramètres  $g$  (11) et  $a_i$  (12).

## VI - ASPECTS RECENTS DE LA PHOTO-C.I.D.N.P.

Le développement récent de techniques nouvelles en photo-C.I.D.N.P est lié à l'intérêt porté par différentes équipes à l'étude structurale (7, 13-a,b,c) de l'interaction de certaines substances photosensibilisantes avec des cibles biologiques privilégiées (bases des acides nucléiques, protéines).

En particulier, KAPTEIN (14-a) a pu mettre en évidence des réactions de transfert de charge (arrachement d'hydrogène ou transfert d'électron) entre les flavines et certains acides aminés aromatiques (tyrosine, histidine, tryptophane). Ces réactions lui ont permis de déterminer la nature des interactions sensibilisateur-substrat et lui ont servi dans l'étude structurale des protéines (cf. référence 14-b).

Elles sont résumées sur la figure 1-6.

Lors d'une irradiation continue, induisant un état stationnaire, seuls les signaux correspondant aux acides aminés cités ci-dessus



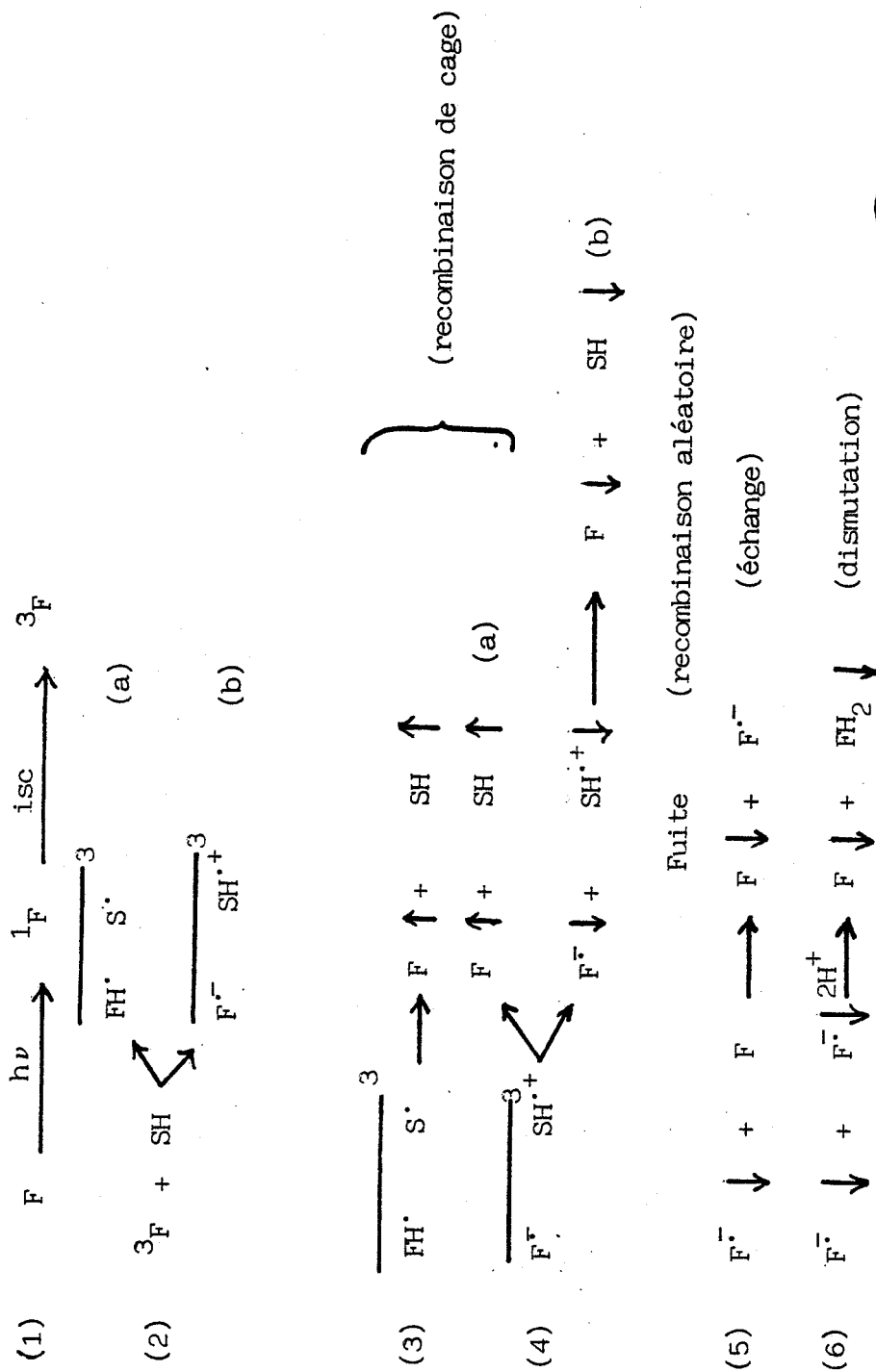


Figure I-6:

Réactions pouvant affecter les intensités des effets de CIDNP lors de l'interaction photosensibilisateur (F)-substrat(SH). Les flèches  $\uparrow$  et  $\downarrow$  correspondent respectivement aux polarisations de cage et de fuite.

sont polarisés. L'absence d'effets de C.I.D.N.P au niveau du sensibilisateur peut s'expliquer de différentes façons :

- i) Ils s'annihilent mutuellement à partir des réactions de recombinaison (éq. 4a) et de fuite (éq. 4b) du fait du temps de relaxation plus long des radicaux pour ce produit que pour les acides aminés.
- ii) Ils sont perturbés par des processus secondaires tels que des réactions d'échange (éq. 5) ou de dismutation (éq. 6).

La mise en évidence de la contribution de ces différentes voies réactives a pu être démontrée grâce à la technique de photo-C.I.D.N.P résolue dans le temps (15).

### 1) La C.I.D.N.P résolue dans le temps :

- Cette technique (fig. 1-7) consiste à irradier l'échantillon par un éclair laser émettant dans la bande d'absorption du sensibilisateur. Après un temps  $\tau_1$  court, on envoie une impulsion de radiofréquence (rf) et on enregistre le FID résultant. On répète cette séquence après un temps  $\tau_2$  suffisant pour permettre aux spins de relaxer mais cette fois sans irradiation. Par différence de ces deux FID on obtient un spectre de C.I.D.N.P. ne montrant que les signaux polarisés. On effectue généralement une présaturation du spectre (séquence aléatoire d'impulsions rf) avant ces deux étapes afin d'éliminer toutes polarisations résiduelles. On peut répéter plusieurs fois ces différentes séquences afin d'améliorer le rapport signal/bruit. De cette façon, en faisant varier  $\tau_1$  on peut étudier la dépendance des intensités des signaux de C.I.D.N.P. en fonction du temps et séparer les différentes voies réactionnelles comme l'ont montré certains exemples d'application de cette technique :

- CLOSS et MILLER (16), lors de l'étude de la photolyse de la déoxybenzoïne, ont pu différencier les polarisations provenant des étapes de recombinaison et de fuite. Pour un temps  $\tau_1 \approx 10^{-7}$  s ils obtiennent un spectre de C.I.D.N.P. caractérisé par des polarisations du produit initial provenant d'une recombinaison au sein de la paire géminée. Pour un temps  $\tau_1 \approx 10^{-4}$  s le spectre de C.I.D.N.P. montre l'apparition de nouvelles polarisations provenant des produits de fuite.

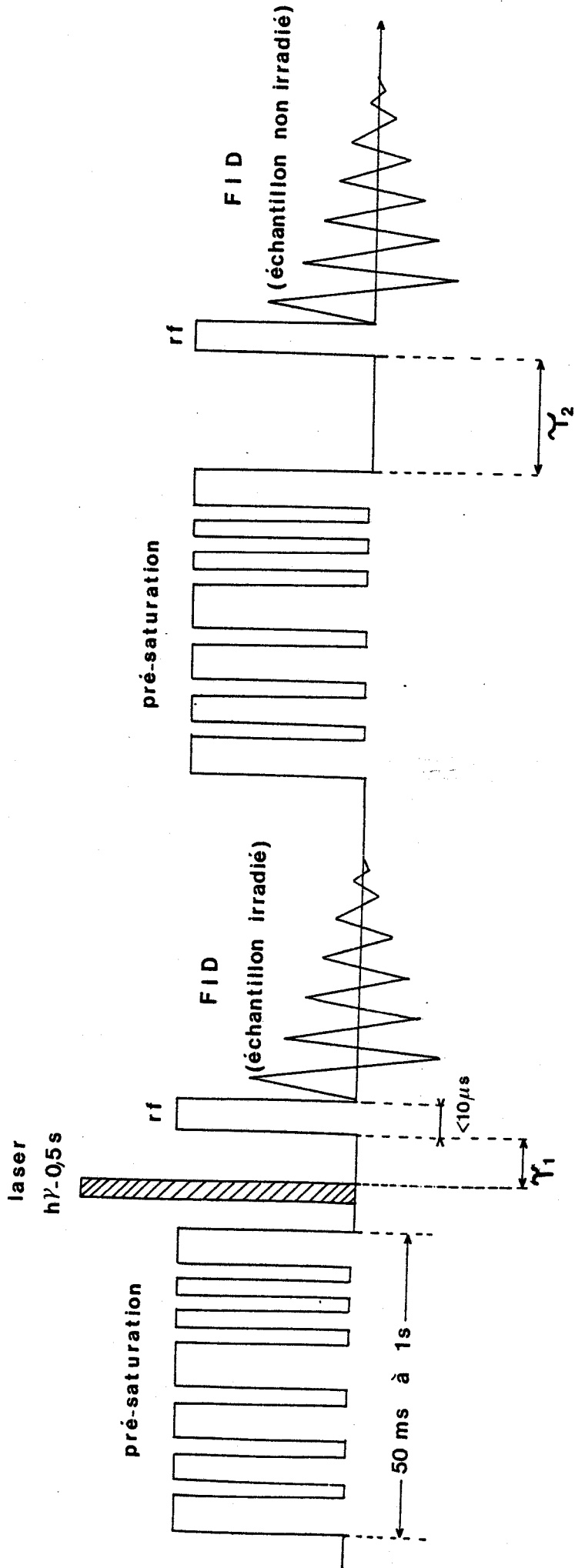
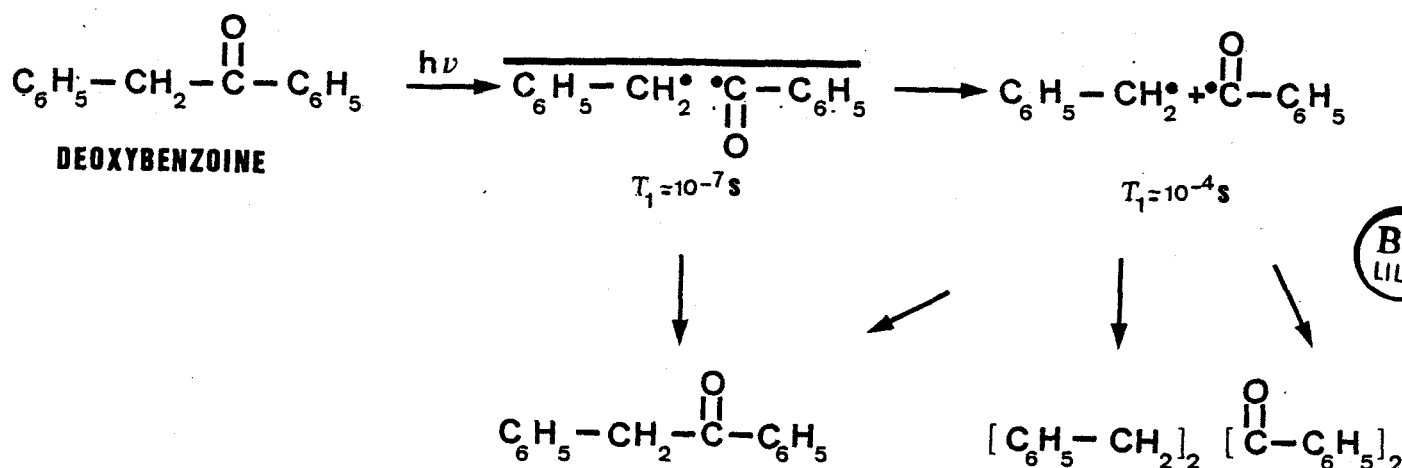


Figure I-7:

Séquences d'impulsions caractérisant les expériences de photo-CIDNP résolue dans le temps.





- KAPTEIN et al. (17) ont pu comparer grâce à cette technique l'importance relative des réactions de transfert d'électron et d'arrachement d'hydrogène (fig. 1-6, éqs. 2a et 2b) en étudiant la photoréduction d'une flavine par le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH).
- De même ils ont démontré (7), par une étude cinétique liée à l'intensité des polarisations, qu'au cours de la réaction de transfert électronique entre le tryptophane et la flavine, l'absence de polarisations sur cette dernière était due au processus de dismutation des radicaux flavinyles (fig. 1-6, éq. 6).
- Pour leur part, CLOSS et SITZMANN (18) en étudiant la photooxydation de dérivés chlorophylliques par les quinones ont montré qu'une réaction d'échange (fig. 1-6, éq. 5) était responsable de l'absence de polarisations et de phénomène d'élargissement des raies ("Broadening") au niveau de ces sensibilisateurs.

La photo-C.I.D.N.P. résolue dans le temps présente de nombreux avantages dans l'étude mécanistique des réactions : elle permet de simplifier les spectres, d'étudier la cinétique d'une réaction, d'identifier des intermédiaires radicalaires. Toutefois cette technique de détection est limitée dans le temps par la durée de l'impulsion radiofréquence (2ns dans le meilleur des cas avec des spectromètres de R.M.N. modifiés).

## 2) Les phénomènes de "cross-polarization":

La photo-C.I.D.N.P. est également utilisée dans l'étude conformationnelle des protéines en solution. En effet, les polarisations obtenues au niveau des résidus aromatiques peuvent donner des informations non seulement sur leur degré d'accessibilité mais aussi sur leur mobilité et leur orientation au sein de la protéine.

En particulier l'utilisation d'une technique de R.M.N. monodimensionnelle, basée sur la méthode par différence (14-a) et bénéficiant du pouvoir de haute résolution de la spectrométrie de R.M.N., a permis de mettre en évidence des phénomènes de polarisation transverse ou "cross-polarization" intervenant au niveau de certains acides aminés qui constituent les protéines.

Ces effets sont dus à un mécanisme de relaxation dipolaire transverse pour lequel un noyau ou groupe de noyaux transfère ses polarisations à un autre initialement non polarisé (19).

Par analogie avec l'effet OVERHAUSER (NOE) (20), les variations des effets de C.I.D.N.P. obtenus par ce phénomène dépendront des distances internucléaires (proximité des noyaux impliqués dans le transfert), de l'agitation moléculaire et du mouvement interne des molécules.

Ainsi KAPTEIN (14-a) a utilisé cette propriété pour différencier et attribuer les glissements chimiques de différents résidus tyrosine de l'inhibiteur trypsique du pancréas de boeuf (BPTI). Lors de l'irradiation de cette protéine en présence de flavine, seules les molécules de tyrosine accessibles au sensibilisateur sont polarisées. Ce sont celles qui se trouvent à la surface de la protéine. Dans le cas où elles se trouvent enfermées au sein de la protéine, la réaction photochimique n'est plus possible car le sensibilisateur et ce substrat sont suffisamment éloignés pour qu'il n'y ait plus d'interaction.

Au cours de ces réactions un transfert de polarisation a pu être mis en évidence entre les protons aromatiques  $H_{3,5}$  et  $H_{2,6}$  de la tyrosine. Les protons  $H_{2,6}$  ne sont pas polarisés par voie directe à cause de leur faible constante de couplage hyperfin dans le radical tyrosyle.

Pour une molécule de tyrosine faiblement associée le transfert se fait avec une inversion de la polarisation (21).

Par contre dans le cas où la tyrosine se retrouve partiellement immobilisée le transfert se fait avec rétention du signe de la polarisation (22) du fait de l'agitation moléculaire plus restreinte (fig. 1-8).

La mesure de la polarisation des protons  $H_{2,6}$  permet d'estimer le temps de corrélation  $\tau_c$  de la molécule et ainsi d'évaluer le degré de mobilité de celle-ci au sein de la protéine.

La tyrosine n'est pas le seul résidu pour lequel un phénomène de transfert de polarisation est observé. KAPTEIN (14-a) a montré qu'un effet analogue était responsable de la polarisation du groupement  $\alpha$ -CH d'un résidu tryptophane lors de l'irradiation du lysozyme du blanc d'oeuf de poule (HEW lysozyme) en présence de flavine. Le transfert s'effectue dans ce cas à partir du groupement  $\beta$ -CH<sub>2</sub>.

Le transfert de polarisation n'est pas seulement de type intramoléculaire. Certaines possibilités de transfert intermoléculaire ont été mises en évidence comme par exemple entre les protons  $H_{3,5}$  d'une molécule de tyrosine et le groupement  $\epsilon$ -CH<sub>2</sub> d'une lysine (13a) ou encore entre les protons  $H_2$  et  $\beta$ -CH<sub>2</sub> de deux tryptophanes voisins. Celui-ci ne peut avoir lieu que dans le cas où ces deux molécules sont très proches l'une de l'autre. On voit donc qu'un tel phénomène peut renseigner sur l'environnement immédiat des résidus polarisés. Toutefois il faut noter que le phénomène de transfert de polarisation dépend de nombreux paramètres physicochimiques : la complexation avec le sensibilisateur (13a); les effets de concentration, de pH et de température (23) qui vont influencer le microenvironnement de chaque résidu et faire varier leur degré de liberté.

### 3) La photo C.I.D.N.P. bidimensionnelle :

Bien que des techniques de R.M.N. monodimensionnelles (1D) telles que l'INEPT (24) soient employées pour élucider les spectres de photo-C.I.D.N.P. et en particulier le mécanisme de transfert de polarisation au sein de petites molécules, celles-ci ne suffisent plus pour interpréter ces phénomènes lors de l'irradiation de macromolécules. Ceci est dû à la complexité des spectres ainsi obtenus, du fait de la superposition des polarisations de résidus de même nature.

Pour contourner cette difficulté, SCHEEK et al. (24,25) ont

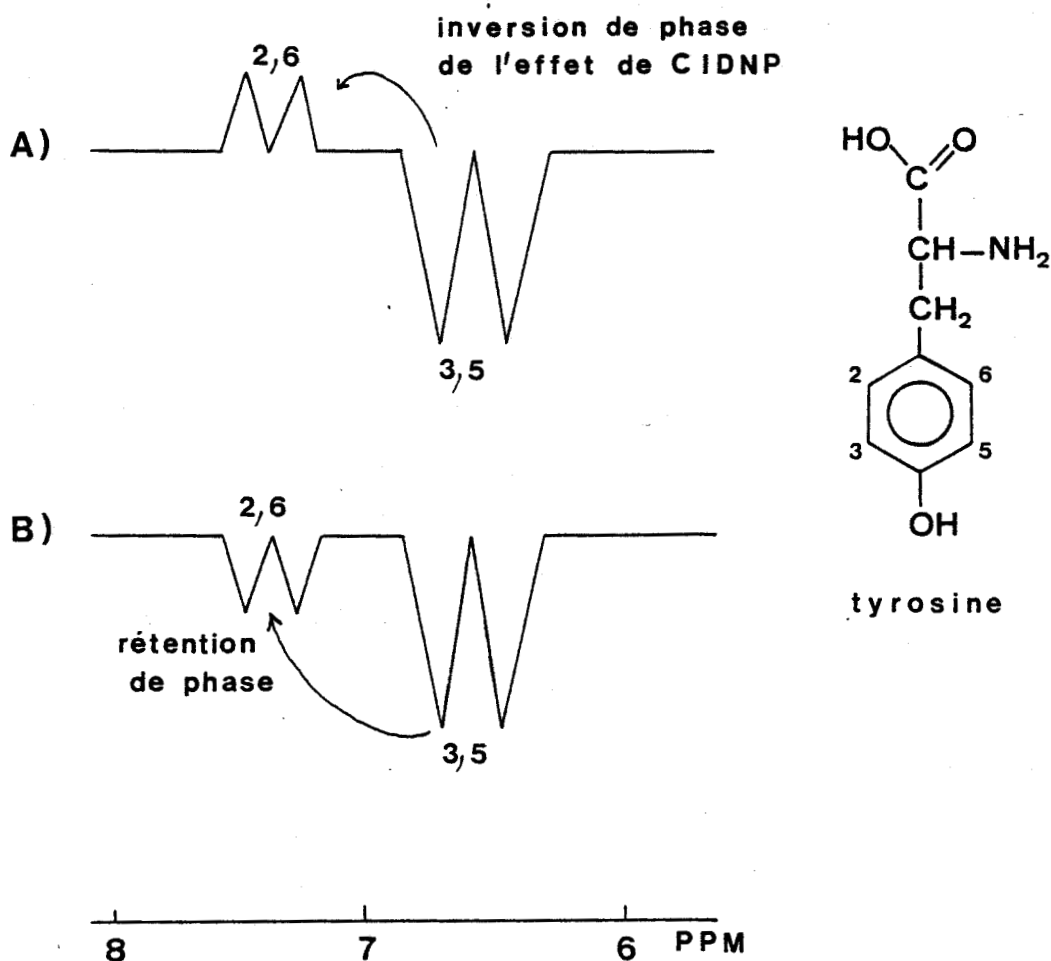


Figure I-8:

Représentation schématique des polarisations obtenues au niveau des protons aromatiques de résidus tyrosine d'une protéine, lors de l'irradiation en présence de flavine (A : tyrosine libre ou faiblement associée ; B : tyrosine partiellement immobilisée). La flèche indique un transfert de polarisation.

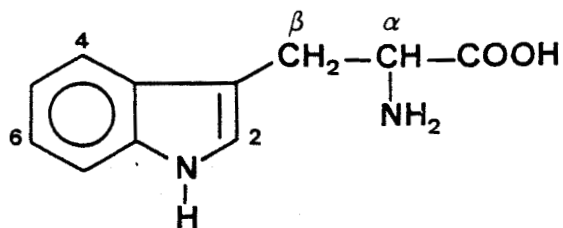


Figure I-9:

La molécule de tryptophane.

récemment combiné la photo-C.I.D.N.P. et la spectroscopie de R.M.N. bidimensionnelle (2D) en utilisant différentes séquences impulsionnelles : la C.I.D.N.P.-COSY et la C.I.D.N.P.-NOESY.

Du fait de leur dissymétrie, les spectres bidimensionnels ainsi obtenus permettent directement de mettre en évidence les protons des différents résidus sujets au transfert de polarisation.

Ces méthodes permettent donc d'obtenir une meilleure résolution des spectres et de corrélérer directement les protons responsables et sujets au transfert de polarisation. Ceci ne pouvait être obtenu en R.M.N. monodimensionnelle que par double irradiation.

Ainsi ces auteurs (24) ont pu montrer par cette méthode que le groupement  $\alpha$ -CH d'un tryptophane (fig. 1-9) était polarisé positivement par transfert à partir du proton  $H_2$  et négativement à partir des protons  $\beta$ -CH<sub>2</sub>. Sur un spectre de C.I.D.N.P. monodimensionnel ces deux polarisations s'annihilent partiellement.

La C.I.D.N.P. bidimensionnelle est une extension utile et intéressante de la technique de photo-C.I.D.N.P., puisqu'elle permet d'examiner les différentes interactions entre les résidus aromatiques à la surface des protéines et d'avoir une plus grande connaissance de leur environnement immédiat grâce au phénomène de transfert de polarisation.

## VII- CONCLUSION

L'importance des facteurs d'exaltation fait de la C.I.D.N.P. une méthode très sensible. La C.I.D.N.P. a l'autre avantage sur la R.P.E. de renseigner sur les produits mêmes de la réaction et non pas simplement sur les radicaux intermédiaires qui peuvent ou non prendre part à la réaction. Toutefois l'utilisation complémentaire de la R.P.E. (qui renseigne plus sûrement sur l'identité d'un intermédiaire radicalaire et donne accès aux paramètres  $a_i$  et  $g$ ) et de la C.I.D.N.P. fait de ces techniques des outils de choix pour l'élucidation de mécanismes radicalaires.

Hormis le proton  $^1H$ , d'autres noyaux ont également été étudiés en C.I.D.N.P. :  $^{19}F$ ,  $^{13}C$ ,  $^{31}P$ ,  $^2H$ ,  $^{15}N$  (5).



L'apport de techniques nouvelles, telles que la photo-C.I.D.N.P. résolue dans le temps et la photo-C.I.D.N.P. bidimensionnelle, est lié à l'intérêt que suscite l'étude des réactions radicalaires de type I (voir chapitre II) dans les systèmes sensibilisateur/substrats biologiques. Ces techniques ont permis de préciser les différents mécanismes intervenant au cours de ces réactions, ainsi que les intermédiaires radicalaires impliqués dans l'action photodynamique de ces composés. Des informations d'ordre structural sur les macromolécules biologiques (identification des résidus de surface, mobilité, environnement immédiat) sont obtenues grâce à la haute résolution des spectres de R.M.N. 2D et l'étude du phénomène de relaxation transverse.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 - a) J. BARGON, H. FISCHER et U. JOHNSEN  
Z. Naturforsch. 22a, 1551 (1967)
- b) J. BARGON et H. FISCHER  
Z. Naturforsch. 22a, 1556 (1967)
- c) H.R. WARD et R.G. LAWLER  
J. Am. Chem. Soc. 89, 5518 (1967)
- d) R.G. LAWLER  
J. Am. Chem. Soc. 89, 5519 (1967)
- 2 - a) G.L. CLOSS  
J. Am. Chem. Soc. 91, 4552 (1969)
- b) G.L. CLOSS et A.D. TRIFUNAC  
J. Am. Chem. Soc. 92, 2183 (1970)
- 3 - a) R. KAPTEIN et L.S. OOSTERHOFF  
Chem. Phys. Letters, 4, 195 (1969)
- b) R. KAPTEIN et L.S. OOSTERHOFF  
Chem. Phys. Letters, 4, 214 (1969)
- 4 - a) "Chemically Induced Magnetic Polarisation"  
Eds. G.L. CLOSS et A.R. LEPLEY (Wiley-New York (1973))
- b) "Chemically Induced Magnetic Polarisation"  
Eds. L.T. MUUS, P.W. ATKINS, K.A. Mc LAUHLAN et  
J.B. PEDERSEN, N.A.T.O. Advanced Study Institute Series (Series C),  
Vol. 34 (D. Reidel-Dordrecht-Holland)(1977).
- c) I.R. GOULD, N.J. TURRO et M.B. ZIMMT dans  
"Advances in Physical Organic Chemistry"  
Eds. V. GOLD et D. BETHELL, Vol. 29, p. 1 à 52  
(Academic Press (1984))
- 5 - R. KAPTEIN  
dans "Advances in Free Radical Chemistry", Ed. G.H. WILLIAMS,  
Vol. 5, p. 319 à 380, (Londres (1975))
- 6 - a) R.M. NOYES  
J. Am. Chem. Soc. 77, 2042 (1955)

- b) R.M. NOYES  
Prog. React. Kinet. 1, 129 (1961)
- 7 - P.J. HORE et R. KAPTEIN  
dans "N.M.R. Spectroscopy : New Methods and Applications",  
Ed. G.C. LEVY, Amer. Chem. Soc., Washington D.C., p. 285 (1982)
- 8 - R. KAPTEIN  
Chem. Commun., 732 (1971)
- 9 - R. KAPTEIN  
Chem. Commun., 1687 (1970)
- 10 - G.L. CLOSS et A.D. TRIFUNAC  
J. Am. Chem. Soc. 92, 2186 (1970)
- 11 - R. KAPTEIN, J. BROKKEN-ZIJP et F.J.J. DE KANTER  
J. Am. Chem. Soc. 94, 6262 (1972)
- 12 - R. KAPTEIN  
Doctoral Dissertation, University of LEIDEN (1971)
- 13 - a) R. KAPTEIN  
dans "N.M.R. Spectroscopy in molecular biology",  
Eds. B. PULLMANN, D. REIDEL, DORDRECHT, Pays-Bas, p. 211 à 229 (1978)  
b) K.A. MUSZKAT et C. GILON  
Nature 271, 685 (1978)  
c) E.F. Mc. CORD, R.R. BUCKS et S.G. BOXER  
Biochem. 20, 2880 (1981)
- 14 - a) F. MÜLLER, C.G. VAN SCHAGEN et R. KAPTEIN  
dans "Flavins and Flavoproteins", Eds. T.P. SINGER, ELSEVIER,  
AMSTERDAM, Pays Bas, p. 385 (1976)  
b) J. MARKO  
Thèse de doctorat ès-Sciences Physiques, Université de Lille I,  
chap. II (Mai 1986)
- 15 - G.L. CLOSS, R.J. MILLER et O.D. REDWINE  
Acc. Chem. Res. 18, 196 (1985)
- 16 - G.L. CLOSS et R.J. MILLER  
J. Am. Chem. Soc. 101, 1639 (1979)
- 17 - R. KAPTEIN, P.J. HORE, A. VOLBEDA et K. DIJKSTRA  
J. Am. Chem. Soc. 104, 6262 (1982)

- 18 - G.L. CLOSS et E.V. SITZMANN  
J. Am. Chem. Soc. 103, 3217 (1981)
- 19 - G.L. CLOSS et M.S. CZEROPSKI  
Chem. Phys. Lett. 45, 115 (1977)
- 20 - J.H. NOGGLE et R.E. SCHIRMER  
dans "The Nuclear Overhauser Effect- Chemical Applications",  
Academic Press, New York (1971)
- 21 - P.J. HORE, M.R. EGMOND, H.T. EDZES et R. KAPTEIN  
J. Magn. Reson. 49, 122 (1982)
- 22 - R. KAPTEIN, K. DIJKSTRA et K. NICOLAY  
Nature, 274, 293 (1979)
- 23 - A. DE MARCO, L. ZETTA et R. KAPTEIN  
Eur. Biophys. J. 11, 187 (1985)
- 24 - R.M. SCHEEK, S. STOB, R. BOELEN, K. DIJKSTRA et R. KAPTEIN  
Faraday, Discuss. Chem. Soc. 78, 245 (1984)
- 25 - R.M. SCHEEK, S. STOB, R. BOELEN, K. DIJKSTRA et R. KAPTEIN  
J. Am. Chem. Soc. 107, 705 (1985)

CHAPITRE II

## INTERET, UTILISATION ET PHOTOCHEMIE DES PORPHYRINES

### I - INTRODUCTION

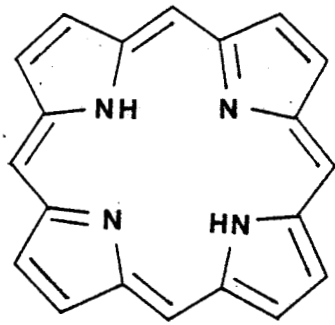
Depuis une vingtaine d'années les pigments tétrapyrroliques font l'objet d'une étude particulière de la part des biochimistes et des biophysiciens. Ces pigments ont tous comme structure de base celle de la porphine qui est constituée d'un cycle tétrapyrrolique. Les différenciations structurales proviennent essentiellement de la nature de leurs chaînes latérales, d'une réduction du cycle ou de l'inclusion d'un atome métallique au sein du noyau aromatique (fig. 11-1).

L'intérêt porté à ces produits réside, d'une part, dans leur capacité à intervenir dans un grand nombre de processus biologiques :

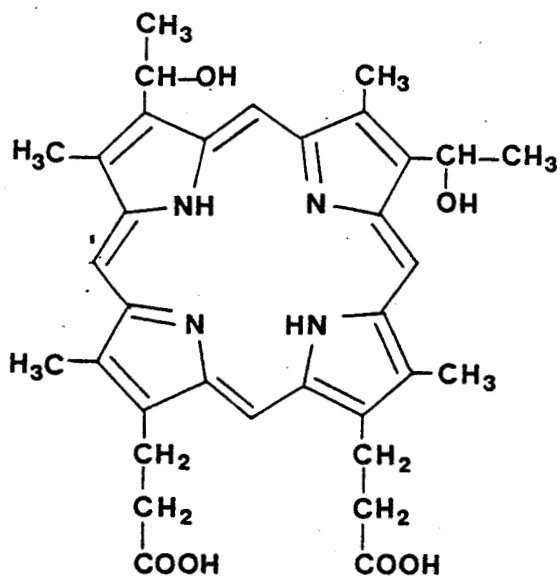
- Les porphyrines de fer (hémoglobine, myoglobine) assurent le transport de l'oxygène vers les tissus ou interviennent dans des réactions de transfert d'électrons (cytochrome a,b,c) ou d'oxydation de substrats organiques (cytochrome P 450).
- La chlorophylle et ses dérivés (bactériochlorophylles, phéophytines, etc...) participent aux réactions de transfert d'électron mises en cause lors de la photosynthèse.
- On rencontre des porphyrines naturelles en grande concentration dans l'organisme (protoporphyrine, uroporphyrine, coproporphyrine, etc...). Certaines cellules les synthétisent et de nombreux tissus possèdent une affinité importante pour ce type de composés.

Ces produits possèdent, d'autre part, des propriétés photophysiques (tableau 11-1) intéressantes dans de nombreuses applications :

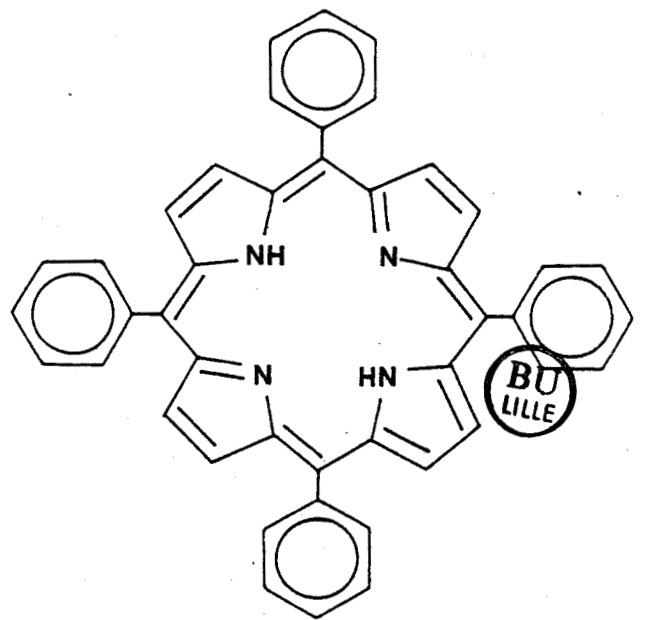
- Ils absorbent une partie importante de la lumière visible.
- La durée de vie de l'état excité triplet est relativement longue.
- Leur rendement de conversion intersystème singulet-triplet est élevé.



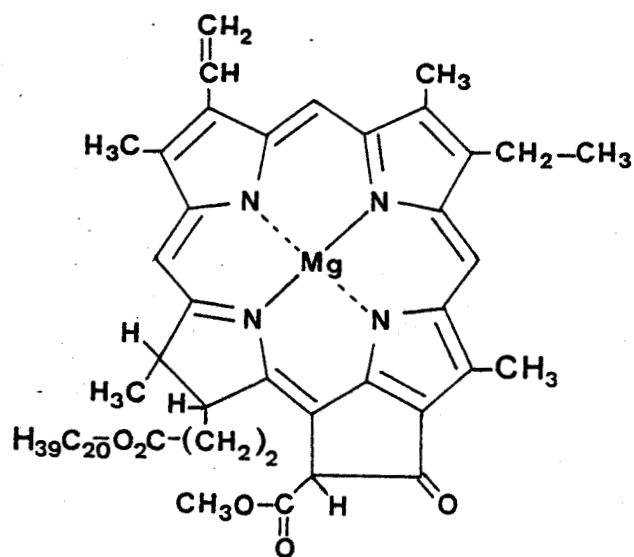
Porphine



hématorphyrine



méso-tétraphényl porphyrine



chlorophyllé-a

Figure II-1. Formules de quelques dérivés porphyriniques.

PRODUITS	$\lambda$ (nm)	$\tau$ (ms)	$\phi_T$	$E_T$ (kJ.mol <sup>-1</sup> )
CHLOROPHYLLE-a	433 (1) 665	1,5-1,7(1)	0,64(1)	125(1)
BACTERIOCHLOROPHYLLE -a	398 (1) 780	0,33-0,47(1)	0,15-0,4(1)	61-92(1)
HEMATOPORPHYRINE	395 (5) 620	0,1-0,2(2)	0,6-0,8(2)	155(5)
MESO - TETRA (N-METHYLPYRIDYL-4) PORPHYRINE	421 (4) 650	0,12 (3)	0,9(3)	140(4)

Tableau II-1. Paramètres photophysiques de quelques dérivés porphyriniques.



- Ils sont facilement oxydables et réductibles. En effet, des molécules telles que la chlorophylle, les porphyrines et leurs dérivés mettent en jeu des processus de transfert de charge en présence d'accepteurs ou de donneurs d'électrons sous l'action de la lumière. Dans certains cas ces réactions d'oxydo-réduction sont réversibles et leur confèrent une grande stabilité photochimique.

Ces différentes propriétés ont axé les recherches suivant deux objectifs :

- Le premier concerne l'étude de l'oxydation de la chlorophylle et de ses analogues afin de créer des modèles permettant d'élucider et de reproduire la première étape de la photosynthèse. Celle-ci se traduit par la conversion d'une énergie électromagnétique (la lumière) en énergie chimique (gradient électrochimique dû au transfert d'électron induit). Le but de cette recherche est la production et le stockage de l'énergie lumineuse sous forme de combustible.
- Le second est l'utilisation des propriétés photosensibilisantes des porphyrines en photochimiothérapie pour le traitement des tumeurs malignes résistantes aux thérapeutiques classiques.

Ce dernier axe de recherche est englobé dans une discipline appelée photomédecine qui, dans son sens le plus large, implique l'utilisation de la lumière (visible, ultraviolette) dans des activités médicales telles que : la prévention, le diagnostic, le traitement et l'élucidation de l'étiologie des maladies, ainsi que dans la préparation des produits pharmaceutiques.

L'étendue et le niveau des recherches de base et des applications de la photomédecine se sont développés de façon considérable ces dernières années. Ceci est suscité en partie par le succès des applications de nouveaux types d'approches photo-médicales dans les essais cliniques comme, par exemple, la thérapie photodynamique des tumeurs.

On distingue deux notions suivant l'utilisation de la lumière en thérapie :

- La photothérapie, où seule la lumière est utilisée.

- La photochimiothérapie, où un photosensibilisateur approprié est administré au patient avant son exposition à la lumière. Dans ce dernier cas, seules les longueurs d'onde pouvant être absorbées par le photosensibilisateur sont efficaces.

Les pionniers de cette nouvelle méthode d'investigation furent RAAB et VON TAPPEINER (6) qui prédirent dès 1900 les implications photochimiothérapeutiques des sensibilisateurs et qui introduisirent pour la première fois le concept de l'action photodynamique de ceux-ci : "... La consommation de certains photosensibilisateurs et l'action combinée de la lumière, peuvent avoir une application thérapeutique..... dans un domaine tel que la dermatologie....".

Les processus photochimiques caractérisant cette action sont diversifiés et plusieurs mécanismes réactionnels ont été proposés suivant la nature du photosensibilisateur.

## II - MECANISMES ET TYPES DE REACTIONS PHOTOSENSIBILISANTES DANS DES SYSTEMES BIOMEDICAUX

Plusieurs types de molécules peuvent jouer le rôle de photosensibilisateurs parmi lesquelles on trouve des produits naturels (la chlorophylle, les porphyrines, les flavines, etc....) ainsi que des produits synthétiques (acridines, anthraquinones, xanthènes, etc....).

En général, ces sensibilisateurs (SENS) sont excités dans un état singulet de courte durée de vie par absorption d'un photon. Par passage intersystème cet état est converti en un état triplet excité ( $^3$ SENS) qui est souvent responsable des principales altérations photobiologiques du fait de sa plus longue durée de vie. Celui-ci peut être réduit (réaction D-R) ou oxydé (réaction D-O) suivant différentes voies compétitives (fig. 11-2) qui dépendent de la nature du sensibilisateur, de celle du substrat ainsi que du milieu réactionnel.

Dans certains de ces processus, le sensibilisateur dans l'état excité triplet donne par transfert de charge avec le substrat des radicaux ions et/ou neutres (étapes-1,2). Ceux-ci réagissent de différentes façons pour former des produits de photoaddition (étapes -1',2') ou donnent naissance à l'anion superoxyde en présence d'oxygène (étape-3).

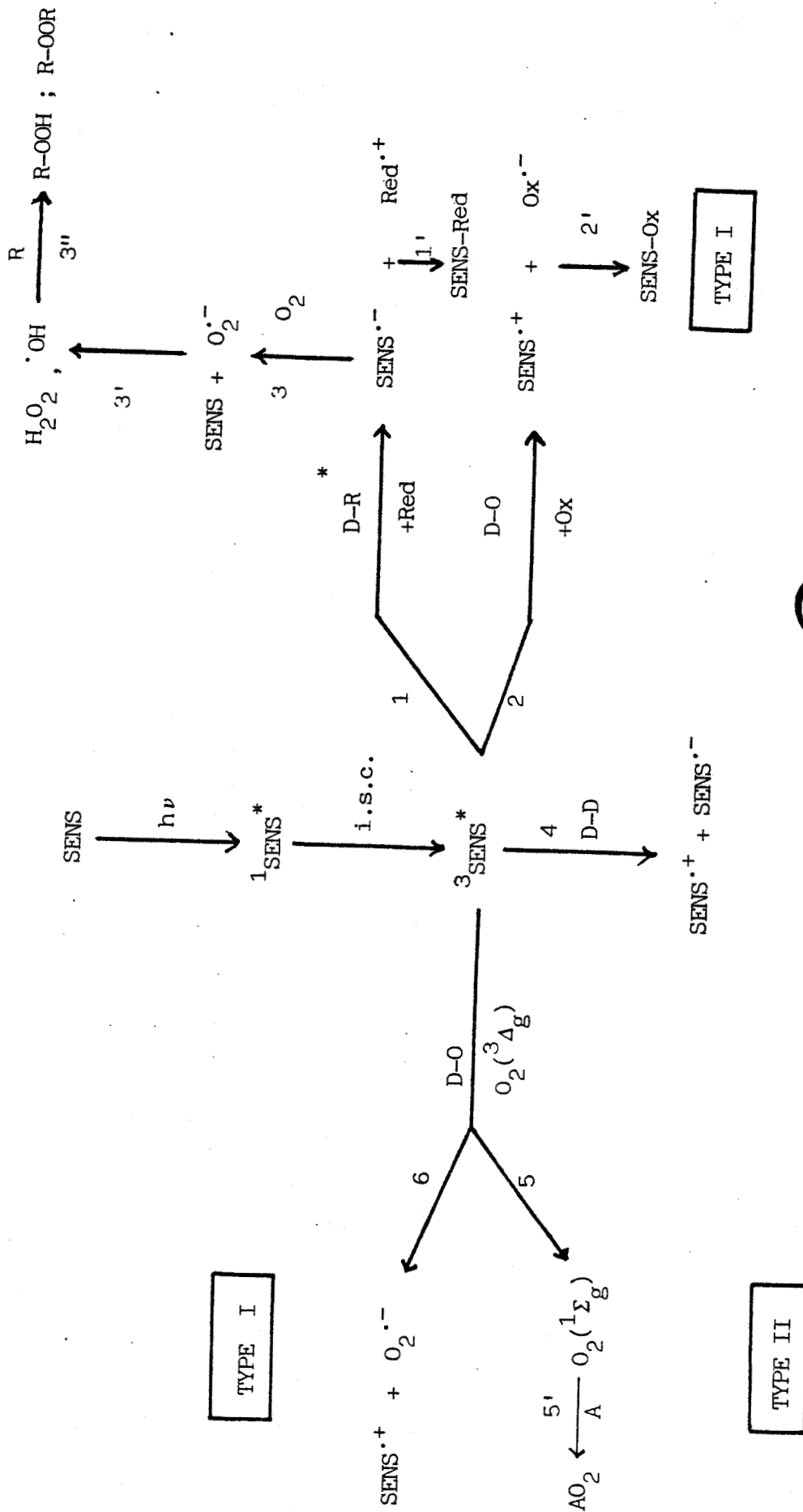


Figure II-2. Processus primaires intervenant lors des réactions mettant en jeu un photosensibilisateur (SENS).  
 \* Pour plus de clarté, les espèces radicalaires obtenues par arrachement d'hydrogène n'ont pas été représentées sur ce schéma.

De même deux molécules du sensibilisateur, l'une à l'état excité et l'autre à l'état fondamental, peuvent réagir pour donner une paire de radicaux ions constituée des espèces semi-oxydée et semi-réduite (réaction D-D, étape-4).

Certains sensibilisateurs excités dans l'état triplet transfèrent leur énergie à une molécule d'oxygène à l'état fondamental  $O_2$  ( $^3 \Sigma_g$ ) pour donner de l'oxygène singulet  $O_2$  ( $^1 \Delta_g$ ), le sensibilisateur retrouvant son état fondamental. L'oxygène singulet peut réagir à son tour avec de nombreux types de biomolécules qui sont normalement insensibles à l'oxygène dans son état fondamental (étapes- 5,5').

D'autres espèces réactives oxygénées, telles que le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ), l'anion superoxyde ( $O_2^{\bar{}}$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^\bullet$ ) sont produites à partir de réactions entre le photosensibilisateur et l'oxygène (étapes- 3,3',6) Celles-ci peuvent réagir ensuite avec les différentes espèces en solution pour donner des produits d'oxygénation (endoperoxydes, hydroperoxydes, etc...) (étape-3'').

On regroupe communément ces différentes réactions suivant deux catégories : les réactions de type I lorsqu'elles sont de nature radicalaire, et celles de type II lorsqu'il s'agit d'un transfert d'énergie.

L'oxygène singulet, le radical hydroxyle sont des espèces très réactives, de même que l'ion superoxyde mais à un degré moindre. C'est pourquoi la plupart des réactions photosensibilisantes nécessitent la présence d'oxygène moléculaire et en consomment en quantité stoechiométrique : ce sont des réactions de photooxydation sensibilisées (réactions photodynamiques). Toutefois il existe des exemples bien connus pour lesquels, en l'absence d'oxygène, le sensibilisateur peut être converti en un photoproduit toxique (psoralène, chlorpromazine).

Le mécanisme de l'action photodynamique des porphyrines est encore peu connu. Pourtant des études ont montré que certains de ces différents types de réactions sont responsables de leur action photosensibilisante (7). Elles feront l'objet d'une brève revue dans le paragraphe suivant qui expose les différents résultats obtenus lors de l'utilisation de ces sensibilisateurs en photochimiothérapie.

### III- LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE DES CANCERS PAR LES PORPHYRINES

#### 1. Historique :

L'intérêt porté à l'utilisation des porphyrines en photo-médecine est lié à leur capacité d'une part à se fixer préférentiellement au niveau des sites tumoraux et d'autre part de photosensibiliser les tissus atteints de lésions malignes pour conduire ainsi à leur dégradation.

En 1942, AULER et BANZER (8) implantèrent des carcinomes de FLEXNER et JOBLING ainsi que des sarcomes de JENSEN sur des rats. Ils observèrent qu'en leur injectant de l'hématoporphyrine, celle-ci s'accumulait préférentiellement dans les tumeurs ainsi que dans les nodosités lymphatiques. Ces observations fortuites conduisirent à de nombreux travaux sur l'accumulation et la rétention sélective des porphyrines dans les tumeurs (9).

AULER et BANZER (8) injectèrent aussi de l'hématoporphyrine à différents animaux auxquels on avait greffé des tumeurs, puis les exposèrent à la lumière ultraviolette. Il en résulta une augmentation de la nécrose des tumeurs.

En 1966, LIPSON (10), qui avait étudié la rétention sélective du dérivé de l'hématoporphyrine, mentionna le traitement photodynamique d'un cas de cancer récurrent et récalcitrant chez un patient en utilisant celui-ci comme agent photosensibilisant.

Quelques années plus tard, DIAMOND (11) constata que des gliomes implantés dans les régions sous-cutanées du rat étaient détruites efficacement par l'administration d'échantillons commerciaux d'hématoporphyrine suivie d'une exposition à la lumière.

En 1975, KELLY (12) implanta chez des souris des tissus sains et cancéreux (carcinomes) de la vessie d'un homme. L'administration du dérivé de l'hématoporphyrine, suivie d'une exposition à la lumière pendant vingt-quatre heures causa une destruction prononcée des tissus tumoraux et peu de dommages au niveau des tissus sains.

De même, DOUGHERTY (13) rapporta l'obtention de résultats analogues sur des souris et des rats et ne nota aucun dommage au niveau de la peau.

A la suite de ces résultats, des essais cliniques de cette thérapie photodynamique des tumeurs ont été réalisés sur des patients (14-a,b).

## 2) Aspect clinique de la photochimiothérapie :

Cette technique, maintenant bien établie, est connue sous le nom de **PHOTOCHIMIOTHERAPIE** ou **P.C.T.** Les recherches actuelles sont axées essentiellement vers l'utilisation des porphyrines comme sensibilisateurs, en particulier du dérivé de l'hématoporphyrine (HpD). Ce composé est utilisé dans le traitement de différents types de tumeurs chez l'être humain (fig. 11-3) :

i) En thérapie, la technique utilisée implique une injection intraveineuse ou intrapéritonale d'HpD suivie d'un temps d'incubation pour permettre à ces composés de se fixer au niveau cellulaire. Une irradiation dans une de ses bandes d'absorption provoque des effets phototoxiques responsables de la nécrose du tissu qui le contient (15-a,b). On utilise en général une lumière rouge (630 nm) car cette longueur d'onde pénètre profondément dans les tissus (sur plus d'un centimètre). Il n'est pas nécessaire d'utiliser une source Laser car le spectre d'absorption de l'hématoporphyrine est très large. Toutefois, les Lasers ont l'avantage de pouvoir être couplés facilement à une fibre optique, ce qui permet une utilisation par voie endoscopique.

ii) Cette technique peut également servir dans la localisation de lésions macroscopiques visibles, comme un petit cancer bronchitique (16), ou pour réaliser une cartographie d'une lésion étendue comme un cancer de la vessie (17), par détection de la fluorescence à 690 nm des porphyrines après excitation U.V. (407 nm).

## 3) Nature des porphyrines utilisées dans ce traitement :

L'HpD est obtenu à partir d'une acétylation suivie d'une hydrolyse alcaline de l'hématoporphyrine (18). C'est un mélange complexe de plusieurs porphyrines appelé **PHOTOFRIN I** dont la composition n'a été que partiellement élucidée (19) (fig. 11-4). Tous les constituants de ce mélange ne semblent pas avoir les mêmes propriétés photosensibilisantes. Ceci pourrait être dû à leur pouvoir de rétention au niveau des tumeurs (20). Ainsi DOUGHERTY a pu séparer du mélange, une fraction appelée **PHOTOFRIN II** qui est

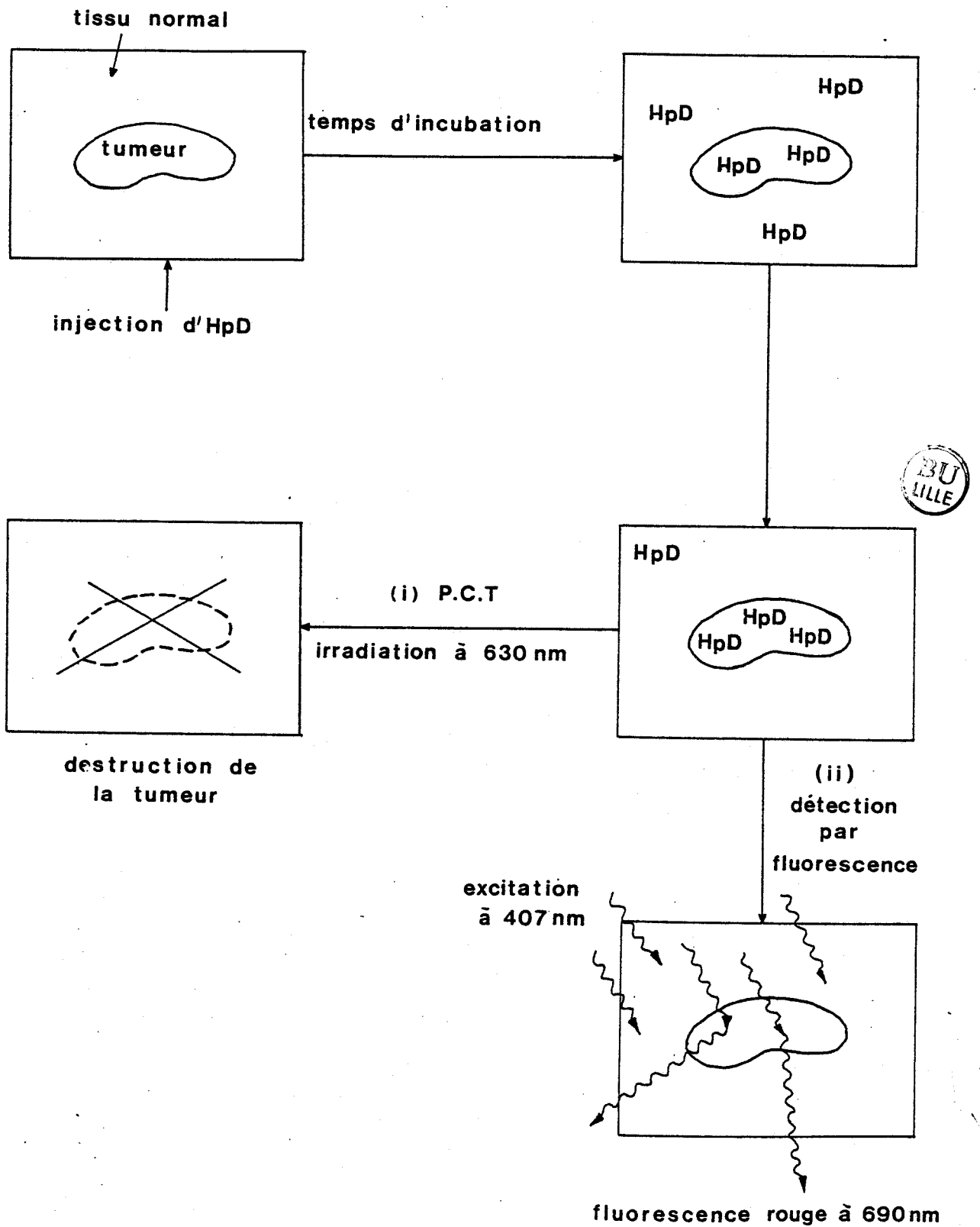
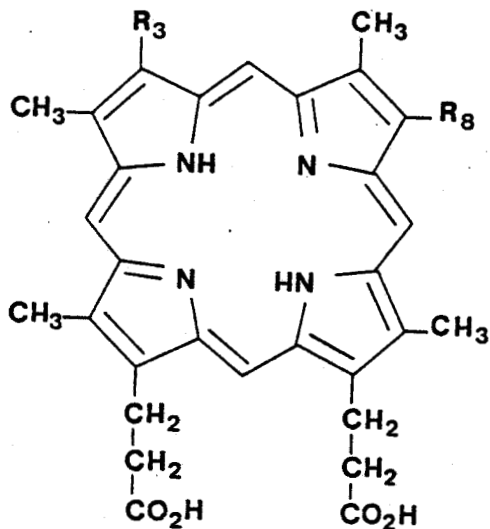


Figure II-3: Diagramme schématique de la détection et de la thérapie photodynamique (P.C.T.) des tumeurs.



	R <sub>3</sub>	R <sub>8</sub>
a	-CH(OH)-Me	-CH(OH)-Me
b	-CH(OH)-Me ou -CH=CH <sub>2</sub>	-CH=CH <sub>2</sub> ou -CH(OH)-Me
c	-CH=CH <sub>2</sub>	-CH=CH <sub>2</sub>
d	-CH(OH)-Me ou -CH(OAc)-Me	-CH(OAc)-Me ou -CH(OH)-Me
e	-CH(OAc)-Me	-CH(OAc)-Me
f	-CH(OAc)-Me ou -CH=CH <sub>2</sub>	-CH=CH <sub>2</sub> ou -CH(OAc)-Me

BU  
LILLE

Figure II-4. Structure des principales porphyrines constitutives du dérivé de l'hématoporphyrine (HpD).

a. Hématoporphyrine IX ; b. (Hydroxy-1 éthyl) - 8(3) vinyl - 3(8) deutéroporphyrine IX ; c. Protoporphyrine IX ; d. O-acétylhématoporphyrine IX ; e. 0,0'-diacétylhématoporphyrine IX ; f. (Acétoxy-1 éthyl) - 8(3) vinyl - 3(8) deutéroporphyrine IX.



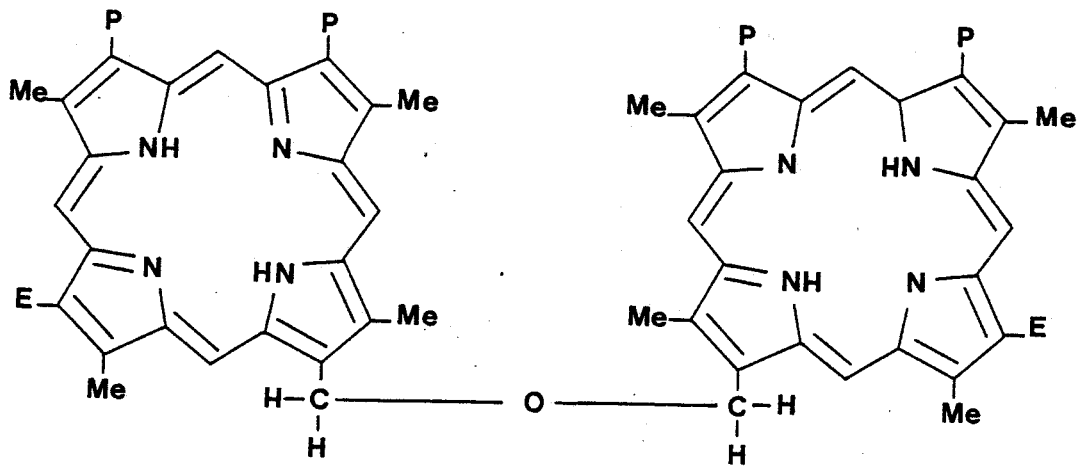
constituée des éléments les moins polaires. Celle-ci serait plus facilement retenue au niveau des tissus tumoraux et aurait l'action photodynamique la plus importante. L'identité du ou des composés responsables de cette action n'a pas encore été déterminée. Toutefois certains auteurs ont proposé que ceux-ci pouvaient être des éthers (21) ou esters (14b) de la dihématoporphyrine appelés DHE (fig. 11-5). Il semble que l'activité photosensibilisante des composants de l'HpD soit liée à leurs propriétés physiques (solubilisation en phase lipidique (22), degré d'aggrégation (23-a,b)) et que celles-ci vont influencer leur distribution dans les tissus et au niveau intracellulaire.

#### 4) Cibles de phototoxicité et action photodynamique des porphyrines :

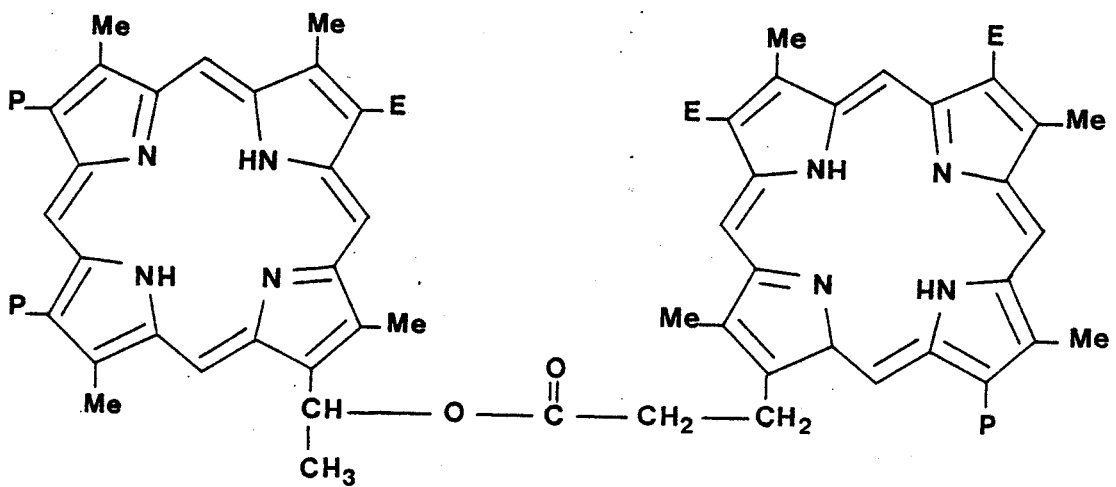
Au niveau cellulaire, la principale cible associée au processus photodynamique des porphyrines est la membrane cellulaire (24-25). Les cellules cancéreuses irradiées en présence de différentes porphyrines (protoporphyrine, hématoxyline, HpD) montrent des altérations morphologiques au niveau de la membrane (trous et vésicules endo et exo-plasmiques (26)) conduisant à une modification de leur perméabilité et de leur fonction de transport (27). Au niveau moléculaire, les principaux constituants des membranes (lipides et protéines) subissent des réactions de photooxydation. Ainsi GROSSWEINER (28-a,b,c) a montré que la peroxydation des lipides contenus dans les liposomes pouvait être responsable de l'inactivation des cellules cancéreuses. Toutefois, de récentes études (29) ont établi que les effets phototoxiques les plus importants proviennent d'une détérioration des protéines. Certains acides aminés tels que le tryptophane, l'histidine, la cystéine subissent des dégradations importantes. De même, à la suite d'expériences sur des érythrocytes (30), on a observé la formation de liaisons inter ou intrapeptidiques.

Une augmentation du temps d'incubation (avant irradiation) permet aux porphyrines de migrer vers les régions intracellulaires (31) où d'autres sites d'action de la phototoxicité de ces molécules ont été décrits.

C'est le cas des microsomes (32), des chromosomes (33) ou encore des mitochondries (34). Au niveau de ces dernières, l'action des porphyrines est responsable de l'inhibition de la respiration et de la phosphorylation oxydative (25).



(a)



(b)

Figure II-5. Structure du DHE. a) Ether ; b) Ester.  
 Me =  $-\text{CH}_3$  ; P =  $-(\text{CH}_2)_2 - \text{CO}_2\text{H}$  ; E =  $-\text{CHOH} - \text{CH}_3$ .

Les détériorations photoinduites au niveau de l'A.D.N par les porphyrines semblent jouer un rôle mineur dans le mécanisme de l'inactivation des cellules tumorales (35). Pourtant DUBBELMAN et al. (36) ont montré que cette action photodynamique était responsable de coupures simple brin au niveau de l'A.D.N ainsi que de l'induction de liaisons entre protéines et A.D.N. Ces différents effets occasionnent l'arrêt de la synthèse de l'A.R.N et de l'A.D.N. C'est spécifiquement au niveau de la guanine que s'effectuent ces interactions (37-a,b). Elles résultent d'une photooxydation de ce résidu. Toutefois aucune activité mutagène (38) n'a pu être décelée après traitement par l'HpD, ce produit ne semblant pas induire de réactions secondaires carcinogènes pour l'organisme.

Les effets néfastes les plus importants qui interviennent à la suite du traitement photochimiothérapeutique par les porphyrines sont principalement de deux natures.

Les premiers concernent des accidents de photosensibilisation de la peau (lésions urticariennes et sclérodermiformes) qui persistent pendant plusieurs semaines (39). L'étiologie de ce phénomène est peu connue mais semble liée à la lente élimination des porphyrines par les tissus après traitement (40). L'administration d'agents caroténoïdes ( $\alpha$ -Tocophérol (40),  $\beta$ -carotène (41)) connus pour désactiver l'état triplet des porphyrines permet d'obtenir un degré satisfaisant de protection.

Les seconds concernent la possibilité d'induction phototoxique au niveau de la rétine et du cristallin de l'oeil (42). En effet, la photooxydation sensibilisée par les porphyrines de certains acides aminés (histidine, tryptophane) ou de l'acide ascorbique (43-a) présents dans les tissus de l'oeil peut conduire à une photopolymérisation et à l'apparition de cataracte (42).

Le mécanisme primaire de l'action photodynamique des porphyrines est très controversé. Ceci est dû à la complexité des paramètres (distribution cellulaire, agrégation, pH) liés à ce phénomène et au nombre important d'espèces activées ou radicalaires initiateuses de cette action.

Les effets phototoxiques les plus importants sont attribués à la formation d'oxygène singulet (44-a,b,c,d). Ces résultats ont

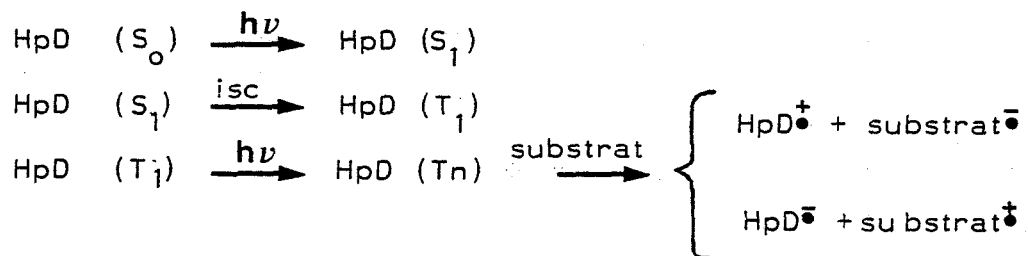
### 5) Perspectives :

Les recherches actuelles sont orientées vers l'amélioration du pouvoir photosensibilisant des porphyrines, soit au niveau de leur distribution intracellulaire, soit dans l'augmentation de leur réactivité.

Ainsi MEW (52-a) d'une part et OSEROFF (52-b) d'autre part ont montré que l'hématoporphyrine liée à certains anticorps monoclonaux pouvait avoir une très bonne activité photodynamique par rapport à certaines cellules tumorales. L'action conjuguée de ces deux entités permet la fixation de l'Hp dans des cellules tumorales spécifiques et la destruction sélective de celles-ci aussi bien *in vivo* que *in vitro*.

Seules quelques études sur des porphyrines autres que l'HpD ont été citées dans la littérature. Celles-ci concernent l'utilisation de porphyrines synthétiques hydrosolubles. Ainsi la méso-tétra sulfonato-4 phénylporphyrine qui est un bon agent de rétention des tumeurs (9) n'a pas été utilisée cliniquement probablement à cause de sa longue rétention dans l'organisme et à sa neurotoxicité naturelle à grande concentration (53). Toutefois ces composés absorbent peu à 630 nm. C'est pourquoi les chercheurs s'intéressent à l'utilisation de composés analogues absorbant plus intensément dans le rouge telles que les phthalocyanines (54) ou les chlorines (55).

Une nouvelle technique a été proposée par BODANESS et al. (56) afin d'améliorer la réactivité des porphyrines en milieu non oxygéné. Celle-ci est basée sur une absorption de deux photons par le sensibilisateur et fait intervenir le mécanisme suivant :



Toutefois, de nombreuses études sont encore nécessaires pour optimiser les différents paramètres responsables de l'action photodynamique des porphyrines.

En particulier, ces études reposent sur la connaissance des propriétés photochimiques et des mécanismes primaires de photoréactions de ces molécules.

conduit de nombreux auteurs à étudier les rendements de formation de cette espèce suivant la nature des porphyrines (45-a,b) et l'environnement (46-a,b) dans lequel elle est produite afin de comparer l'efficacité photodynamique de différents dérivés. Par contre d'autres auteurs (47a-b;28-a) ont pu détecter la formation du radical anion de l'hématoporphyrine ( $H_2P^{\bullet-}$ ) dans des études in vitro. Celui-ci est formé à partir de l'état excité triplet (47-a) de la porphyrine. De même SCONFIENZA et al. (48) ont proposé un mécanisme de transfert d'électron de la porphyrine vers le tryptophane comme étape primaire de la photodégradation de ce dernier.

Cette ambivalence photoréactionnelle est liée à l'environnement et au degré d'agrégation des porphyrines (28-a,48). Un mécanisme de type II sera prépondérant en milieu homogène et en présence de porphyrine sous forme monomère, tandis qu'un milieu hétérogène et l'agrégation des porphyrines favoriseront un mécanisme de type I. Ce dernier résultat semble être confirmé par le fait que GROSSWEINER (28-b) a pu montrer que des agrégats d'HpD pouvaient promouvoir des effets photosensibilisants en milieu non oxygéné.

La formation d'autres espèces activées de l'oxygène tels que le radical hydroxyle (43-a,b; 49), l'anion superoxyde (50-a,b), le peroxyde d'hydrogène (43-a) a pu être mise en évidence par des méthodes de piégeage lors de l'irradiation des porphyrines en présence d'acide ascorbique et de cystéine.

L'importance des effets phototoxiques occasionnés par ces dérivés oxygénés est difficilement mesurable. Pourtant, GIBSON et al. (51) ont montré que l'anion superoxyde n'est pas le principal agent responsable de l'action photodynamique de l'HpD.

Toutefois comme l'HpD est un mélange complexe de plusieurs porphyrines qui possèdent des propriétés physico-chimiques différentes (solubilité, rendement de conversion intersystème, couples acido-basique etc....), leur distribution dans les cellules dépendra de leur environnement (phase lipidique/aqueuse, complexation avec les protéines, pH intracellulaire, oxygénation ....) et sera responsable de leur différence de réactivité (type I/type II) pendant l'irradiation.

## IV - PHOTOCHEMIE DES PORPHYRINES

### 1) Généralités :

Les porphyrines (base libre, complexes métallés, formes réduites) jouent un rôle important dans beaucoup de processus rédox et de transfert d'énergie : l'étape réactionnelle primaire de leurs états excités repose à la fois sur un transfert de charge et sur la formation de complexe analogue au mécanisme invoqué lors de la première étape de la photosynthèse. Dans le but de construire des modèles équivalents, de nombreuses études ont porté sur la photoréduction et la photo-oxydation des porphyrines, spécialement pour trouver des agents réducteurs ou oxydants capables de produire des photoréactions rédox cycliques (57-a,b,c,d,e,f).

Les résultats préliminaires obtenus sur la nature du mécanisme photochimique intervenant entre les différentes espèces proviennent de méthodes spectroscopiques telles que la photolyse éclair, la résonance paramagnétique électronique (R.P.E.) ainsi que de la polarisation nucléaire dynamique induite photochimiquement (C.I.D.N.P.). Ceux-ci seront exposés dans les paragraphes suivants.

Dans un solvant inerte, c'est généralement l'environnement (présence d'un accepteur ou d'un donneur d'électron) qui va déterminer la direction du transfert électronique. Celui-ci dépend principalement des potentiels rédox des états excités des porphyrines. Bien que ceux-ci ne soient pas connus, il est intéressant de noter que la réactivité photochimique des porphyrines montre une certaine symétrie qui suit l'ordre de décroissance des potentiels de réduction de ces produits à l'état fondamental. En fait, c'est la densité de charge électronique portée par les azotes centraux du cycle porphyrinique qui va déterminer le potentiel rédox de ces molécules et influencer leurs propriétés acido-basiques ainsi que leur réactivité en terme de transfert électronique (58). Cette densité de charge dépend à la fois de la nature des différents substituants périphériques de la porphyrine (positions méso et  $\beta$ -pyrrolique) (fig. 11-6a) et du noyau métallique complexant :

- Pour une série de porphyrines de même nature, le potentiel de réduction augmente avec des substituants électro-donneurs et diminue avec des substituants électro-attracteurs, principalement pour des substitutions en position méso où la densité de charge la plus importante

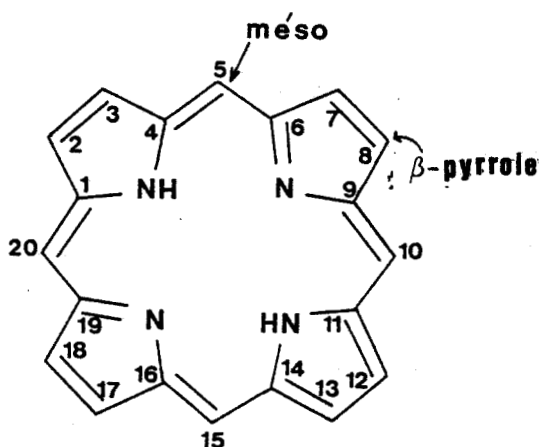


Figure II-6a Système de numérotation du squelette porphyrinique.

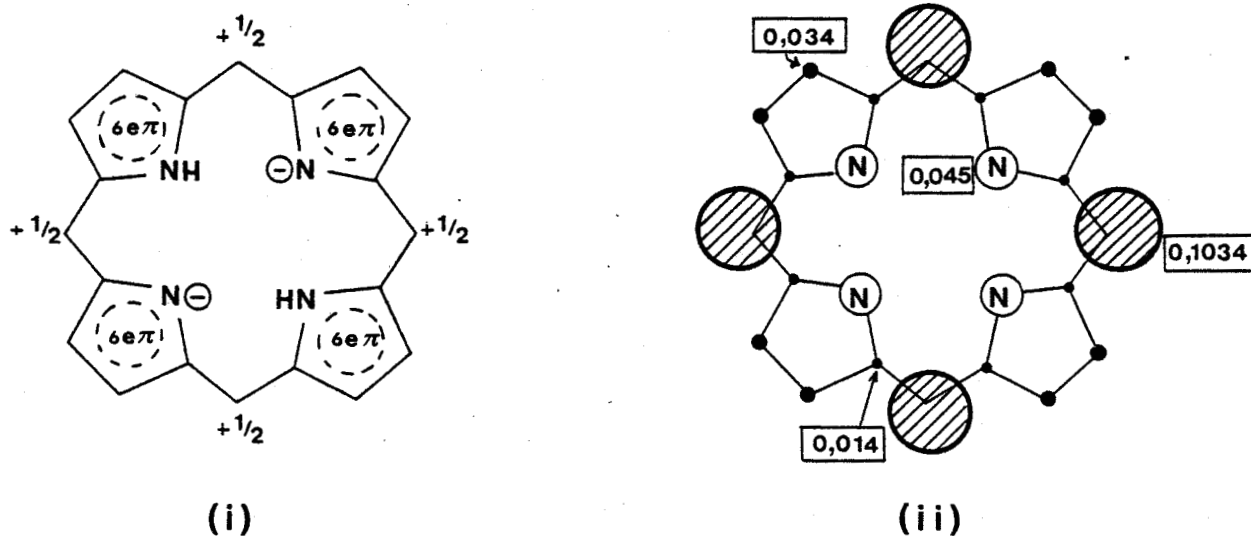


Figure II-6b i) Formule limite de résonance du cycle tétrapyrrolique selon WOODWARD (59) ; ii) Distribution électronique de charge relative lors de l'introduction d'un électron au niveau du cycle tétrapyrrolique (60) (niveau  $4e\pi$ ).

est située sur les ponts interpyrroliques (fig. 11-6b).

- Dans le cas des complexes métalliques, le potentiel de réduction augmente avec l'électronégativité du métal (61).

- De même, les constantes acido-basiques ( $PK_3$ )<sup>\*</sup> des bases libres suivent l'ordre des potentiels rédox (62) : plus la basicité est forte, plus le potentiel de réduction est négatif. Ceci implique que le produit est plus difficilement réductible et, a fortiori, que la densité de charge est plus importante au niveau des azotes centraux. En fait le pKa sert à mesurer la densité de charge  $\sigma$  au niveau du cycle. En affectant les intégrales coulombiennes des carbones méso, la densité de charge  $\sigma$  doit directement influencer les orbitales  $\pi$  du système auxquelles sont rattachées les propriétés redox du composé (4).

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau 11-2\*\*.

Les différents paramètres mentionnés ci-dessus affectent également les niveaux énergétiques des états excités des porphyrines et donc leur photoréactivité. Cette dernière sera encore influencée par d'autres facteurs tels que le solvant, la concentration, les phénomènes d'agrégation ou le pH. Ceux-ci modifieront principalement les vitesses de réaction, les rendements quantiques de formation des espèces excitées ainsi que la sensibilisation des intermédiaires radicalaires.

## 2) Irradiation des porphyrines seules en solution :

Pendant l'irradiation de certaines porphyrines en solution aqueuse les radicaux anion et cation de ces espèces ont pu être mis en évidence.

Ainsi BONNET et al. (3,66) ont montré par radiolyse pulsée que la méso-tétra(sulfonato-4 phényl) porphyrine, l'uroporphyrine, la cuproporphyrine et l'hématoporphyrine\*\* conduisaient à la formation

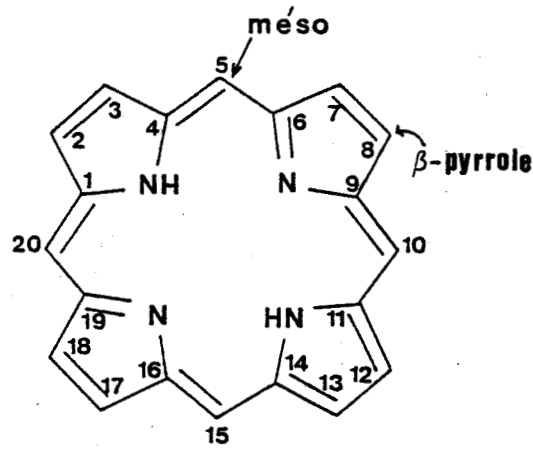
\* Pour plus de commodité on note généralement la porphyrine sous forme de base libre  $PH_2$ . Quatre couples acido-basiques sont liés à la dissociation de cette base libre :  $pK_1(PH^-/P^{2-})$ ;  $pK_2(PH_2/PH^-)$ ;  $pK_3(PH_3^+/PH_2)$ ;  $pK_4(PH_4^{2+}/PH_3^+)$

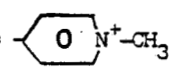
\*\* Les formules des dérivés tétrapyrroliques cités dans ce chapitre sont résumés dans le tableau 11-3.



PORPHYRINES <sup>b</sup>	POTENTIEL DE REDUCTION <sup>a</sup> $E_{\frac{1}{2}}^{\text{red}}(\text{P})$ volts	<sup>63</sup> pK <sub>3</sub>	ELECTRONEGATIVITE <sup>65</sup>
TMePyPH <sub>2</sub>	- 0,55 <sup>58</sup>	2	/
TAPPH <sub>2</sub>	- 0,67 <sup>58</sup>	4	/
TPPSH <sub>2</sub>	- 1,09 <sup>58</sup>	5	/
Sn (IV) TPP	- 0,81 <sup>64</sup>	/	4,8
Pd (II) TPP	- 1,10 <sup>64</sup>	/	2,0
Ni (II) TPP	- 1,18 <sup>64</sup>	/	1,8
Cd (II) TPP	- 1,25 <sup>64</sup>	/	1,5
Mg (II) TPP	- 1,35 <sup>64</sup>	/	1,0

Tableau II-2. Influence du caractère acido-basique et de l'électronégativité du métal sur les potentiels de réduction de quelques porphyrines a) les potentiels sont donnés par rapport à l'électrode au calomel saturé ; b) MTPP : complexe métallé de la méso-tétraphénylporphyrine ; TMePyPH<sub>2</sub> : méso-tétra (N méthyl-4 pyridyl) porphyrine ; TAPPH<sub>2</sub> : méso-tétra (N,N',N'' triméthylamino -4 phényl) porphyrine ; TPPSH<sub>2</sub> : méso-tétra (sulfonato-4 phényl) porphyrine. (voir tableau II-3)



NOM	ABBREVIATION	SUBSTITUANTS
Méso-tétraphénylporphyrine	TPPH <sub>2</sub>	R <sub>5,10,15,20</sub> = $\phi$ -
Méso-tétra (N-méthyl-4 pyridyl) porphyrine	TMePyPH <sub>2</sub>	R <sub>5,10,15,20</sub> = 
Méso-tétra (N,N',N''-triméthyl-4 aminophényl)porphyrine	TAPPH <sub>2</sub>	R <sub>5,10,15,20</sub> = p. $\phi$ -N <sup>+</sup> (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Méso-tétra (sulfonato-4 phényl) porphyrine	TPPSH <sub>2</sub>	R <sub>5,10,15,20</sub> = p. $\phi$ -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup>
" Octylporphyrine "		R <sub>3,8,13,18</sub> = -CH <sub>3</sub> R <sub>2,12</sub> = -(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub> R <sub>7,17</sub> = -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
(Hydroxy-4 phényl) -5 tris (p-tolyl) - 10,15,20 porphyrine		R <sub>5</sub> = p. $\phi$ -OH R <sub>10,15,20</sub> = p. $\phi$ -CH <sub>3</sub>
Hématoporphyrine	H <sub>2</sub> P	R <sub>2,7,12,18</sub> = -CH <sub>3</sub> R <sub>3,8</sub> = -CHOH -CH <sub>3</sub> R <sub>13,17</sub> = -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H
Uroporphyrine		R <sub>2,7,12,17</sub> = -CH <sub>2</sub> - CO <sub>2</sub> H R <sub>3,8,13,18</sub> = -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H
Coproporphyrine		R <sub>2,8,12,18</sub> = -CH <sub>3</sub> R <sub>3,7,13,17</sub> = -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H
Octaéthylporphyrine	OEP	R <sub>2,3,7,8,12,13,17,18</sub> = -CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
Deutéroporphyrine		R <sub>2,7,12,18</sub> = -CH <sub>3</sub> R <sub>13,17</sub> = -(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CO <sub>2</sub> H

BU  
LILLE

Tableau II-3. Structures des différentes porphyrines citées dans ce mémoire (les substituants non précisés correspondent à des atomes d'hydrogène).  
 $\phi$  = radical phényle.

du radical cation par photoionisation à partir de l'état triplet. Ce phénomène avait déjà été observé par TOLLIN (67) lors de l'irradiation de la chlorophylle. Cette réaction est spécifique du solvant utilisé (66) et de la nature de la porphyrine (3). Ce résultat est probablement lié, selon BONNET (3), au potentiel de réduction de ces espèces, donc au caractère énergétique de la réaction.

Par photolyse éclair, FRINK et FERRAUDI (68) ont mis en évidence un processus d'annihilation triplet-triplet à partir de l'état  $^3\pi\pi^*$  de différentes métalloporphyrines (MP) : l'octaéthylporphyrine de zinc et la tétraphénylporphyrine de zinc. Ce processus fait intervenir la formation d'un excimère dans l'état excité singulet dont l'évolution est différente suivant la nature du solvant. En milieu non polaire, il donne l'espèce  $^1MP$  dans l'état  $^1\pi\pi^*$ . En milieu polaire, cet excimère peut conduire aux radicaux anion et cation de la porphyrine (69) selon le mécanisme suivant (70) :



Ce mécanisme serait analogue à celui mis en évidence avec une série de composés de structure voisine : les phthalocyanines (70).

### 3) Irradiation des porphyrines en présence de substrat :

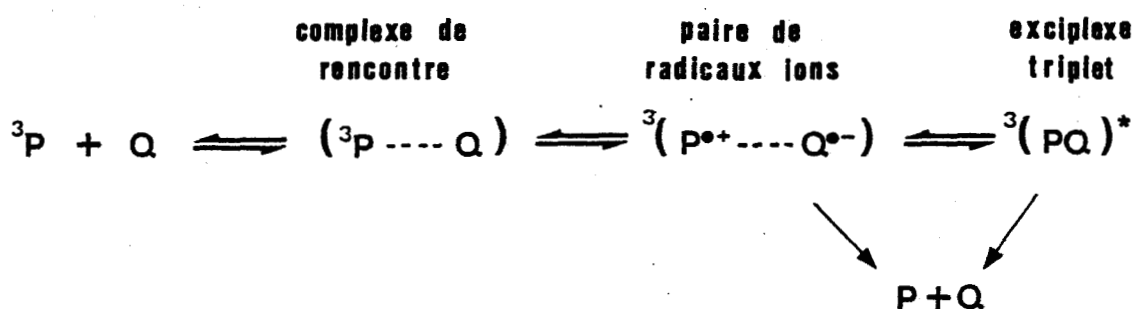
#### a) Photooxydation

##### a-1 Réaction avec des accepteurs d'électrons

Certaines études ont permis de mettre en évidence la formation d'exciplexes en milieu non polaire lors de la désactivation des états excités des porphyrines (P) en présence d'accepteurs d'électrons tels que les quinones (Q) ou les dérivés nitrés aromatiques. Cet exciplexe peut

se former à partir des états excités, singulet (71-a) et triplet (71-b,c,d). Toutefois l'exciplexe formé à partir du triplet présente une plus grande réactivité que celui formé à partir du singulet du fait que sa structure facilite la formation de la paire de radicaux ions (71-e).

Kapinus et al. (71-d) proposent le schéma réactionnel suivant pour la formation de l'exciplexe à l'état triplet.



La formation de l'exciplexe passe par trois étapes distinctes :

- 1) formation d'un complexe de rencontre
- 2) transfert d'électron et création d'une paire de radicaux ions
- 3) transfert inverse et recombinaison au sein de la paire conduisant aux réactifs ou à la formation de l'exciplexe. Par désactivation, ce dernier reforme la paire de radicaux ions initiale ou redonne les produits de départ.

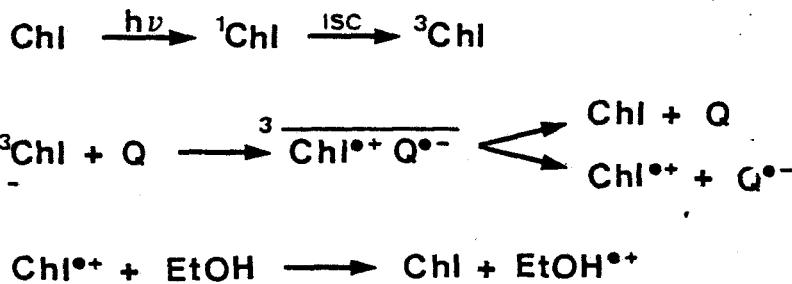
En milieu polaire, aussi bien l'état singulet que l'état triplet des métalloporphyrines donnent des ions libres qui se recombinaient pour donner les produits de départ à des vitesses proches de la limite de diffusion (72). En effet un solvant polaire favorise la dissociation de la paire en radicaux ions libres solvatés. En contrepartie la stabilité de l'exciplexe est atténuée (durée de vie plus courte) et l'équilibre paire de radicaux ions exciplexe est fortement déplacé vers la droite. L'étude de ces processus (71-b,d) a montré l'intervention d'un transfert de charge entre ces différentes espèces. En particulier en milieu polaire où celui-ci est un transfert d'électron. De bonnes corrélations (71-b,73,74,75) ont pu être mises en évidence entre les potentiels de réduction des inhibiteurs (quinones) et le  $\log(Kq)$  où  $Kq$  représente la constante de vitesse du processus inhibiteur. Ces résultats (71-d, 73,75,76,77) ont permis également de démontrer que  $Kq$  peut être lié à l'énergie libre ( $\Delta G$ ) requise par la réaction de transfert d'électron.

Celle-ci est donnée par l'équation de REHM et WELLER (78) :

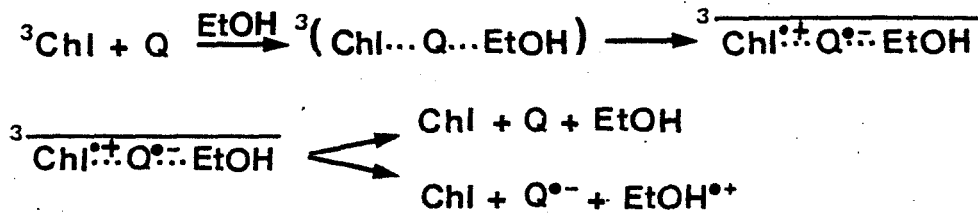
$$\Delta G = E_{\frac{1}{2}}^{\text{ox}}(P) - E_{\frac{1}{2}}^{\text{red}}(Q) - \frac{e^2}{\epsilon r} - E'(T \text{ ou } S)$$

ou  $E_{\frac{1}{2}}^{\text{ox}}$  (P) et  $E_{\frac{1}{2}}^{\text{red}}$  (Q) sont respectivement les potentiels d'oxydation de la porphyrine (P) et de réduction du substrat (Q),  $\frac{e^2}{\epsilon r}$  est un terme coulombien lié à la nature du solvant et exprimant l'interaction entre les partenaires de la paire d'ions formée,  $E'$  est l'énergie de l'état excité de la porphyrine.

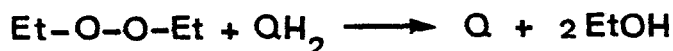
Ces réactions de transfert de charge entre chlorophylle (67,79-a,80), porphyrines (79-b,81,82-a) et des quinones ont fait l'objet de nombreux travaux. La chlorophylle (Chl) (78-a) et la tétraphénylporphyrine de zinc (ZnTPP) (79-b) transfèrent un électron à la quinone (Q). Les signaux R.P.E des radicaux semiquinoniques ( $\text{HQ}^\bullet$ ) dérivant des radicaux anions des quinones ont été obtenus par TOLLIN (79-a). Ce même auteur a pu mettre en évidence la formation du radical cation de la chlorophylle ( $\text{Chl}^{\dot{+}}$ ) ainsi que d'autres radicaux provenant du solvant (éthanol) par R.P.E (80). Il suggère le mécanisme suivant qui fait intervenir un exciplexe ternaire.



ou



puis



Dans le cas des dérivés métallés de porphyrines hydrosolubles (MP) HARRIMAN et al. (82-a,b,c,d,e) ont montré par photolyse éclair que le mécanisme primaire de photooxydation par le persulfate de sodium faisait intervenir une paire d'ions. Toutefois par dismutation, les radicaux cations de ces porphyrines forment le dication :



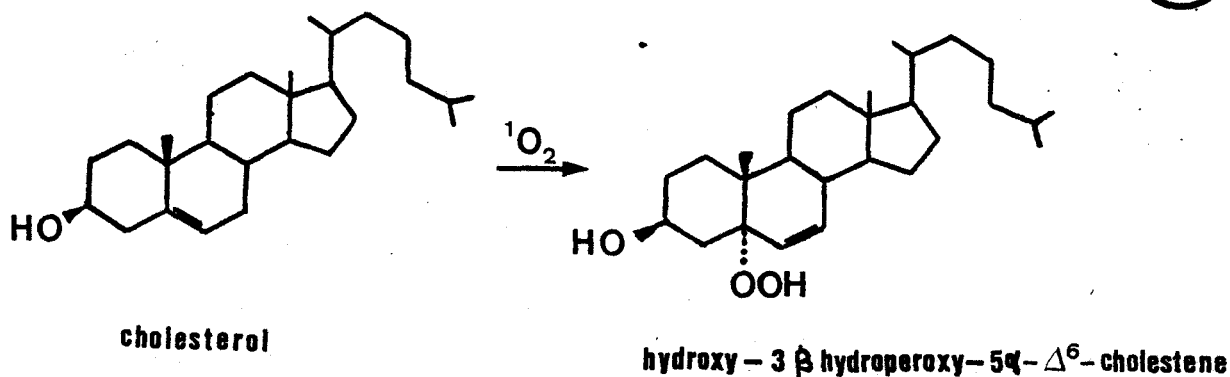
Ce dernier, par attaque par les ions hydroxyles en milieu alcalin, conduit à la formation d'isoporphyrine ( $\text{MP}(\text{OH})^+$ ) (82-b,c,e;83) et de dihydroxyporphyrine ( $\text{MP}(\text{OH})_2$ ) (82-b,c,e) (fig. 11-7). Ces auteurs ont également émis l'hypothèse que l'un des intermédiaires observés pouvait être un dimère  $\pi$  du radical ( $\text{MP}^{\bullet+}$ )<sub>2</sub> (84).

#### a-2 Réaction avec l'oxygène ( $\text{O}_2$ )

En présence d'oxygène les porphyrines (P) ou leurs complexes métallés excités dans l'état triplet peuvent donner lieu à des réactions de transfert d'énergie et former de l'oxygène singulet ( $^1\text{O}_2$ ) (chap. II, parag. III-4)



$^1\text{O}_2$  serait alors responsable de l'inactivation photodynamique de systèmes biologiques (85). Lamola et al. (86) l'ont démontré dans le cas de la photohémostase des membranes des hématies lors d'une protoporphyrine d'origine génétique : la protoporphyrine IX sensibilise la formation de  $^1\text{O}_2$ , qui serait responsable de l'oxydation des liaisons insaturées du cholestérol en hydroxy-3 $\beta$ -hydroperoxy-5 $\alpha$ - $\Delta^6$ -cholestène.



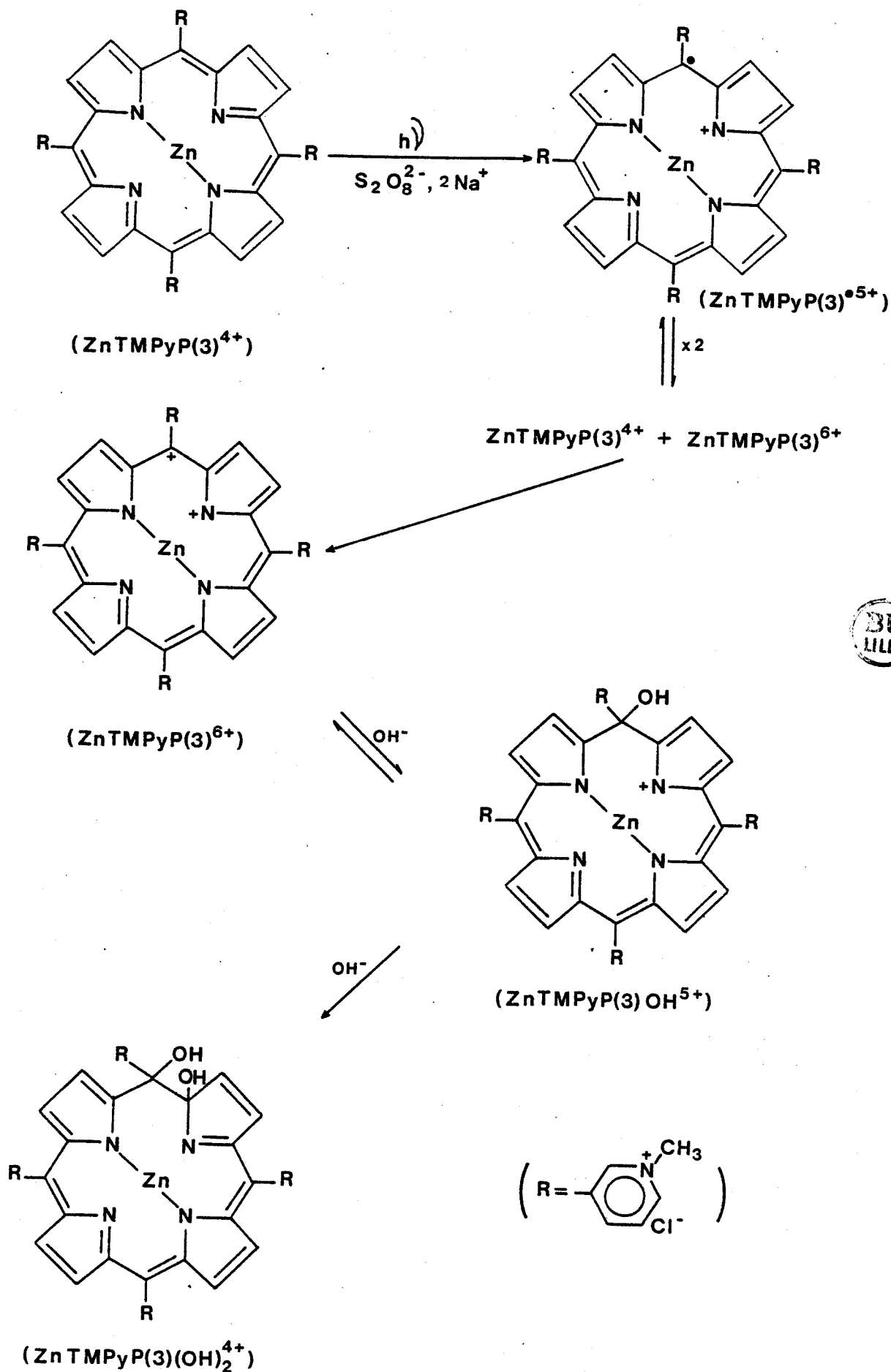
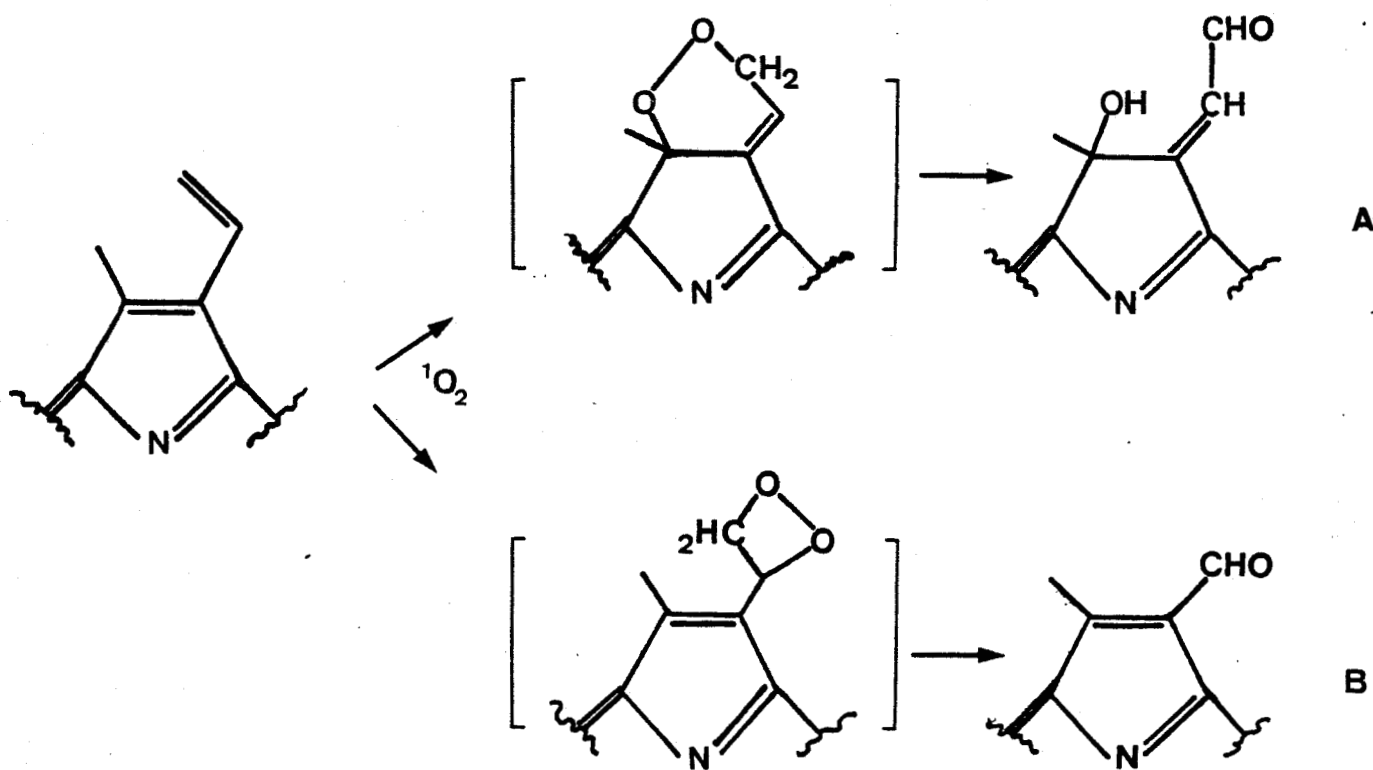


Figure II-7. Photooxydation de la méso-tétra (N-méthyl-3 pyridyl) porphyrine de zinc par le persulfate de sodium.

Cet hydroperoxyde en se scindant donne naissance à des espèces radicalaires susceptibles d'attaquer d'autres sites de la membrane des hématies.

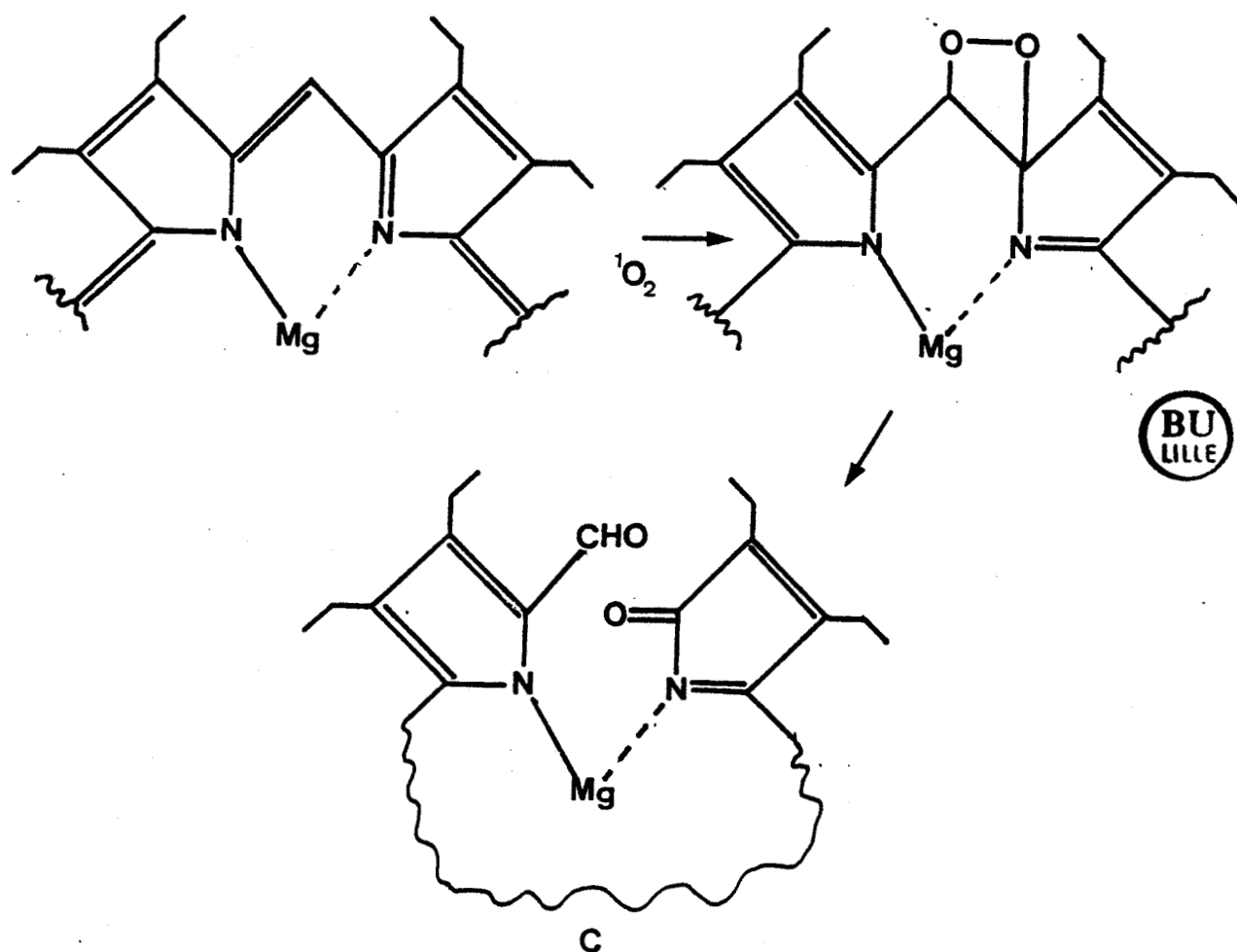
L'administration de doses massives de  $\beta$ -carotène ou d' $\alpha$ -tocophérol, substances connues pour inhiber l'état triplet des porphyrines, protège les malades de cette photohémolyse (87).

La porphyrine elle-même peut être photooxydée par  $^1\text{O}_2$  ainsi formé. COX et WHITTEN (88) ont mis en évidence la formation de photoprotoporphyrine (A), de monoformylmonovinyldeuteroporphyrine et de diformyldeuteroporphyrine(B) lors de l'irradiation de la diméthyl ester protoporphyrine IX en milieu non polaire et en présence d'oxygène.





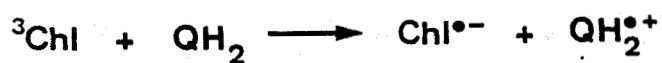
De même, MAUZERALL (89) lors de l'irradiation de l'octa-éthylporphyrine de magnésium dans le benzène reporte la formation de 1-formyl-19 cetotétrabilène (C).



### b) Photoréduction

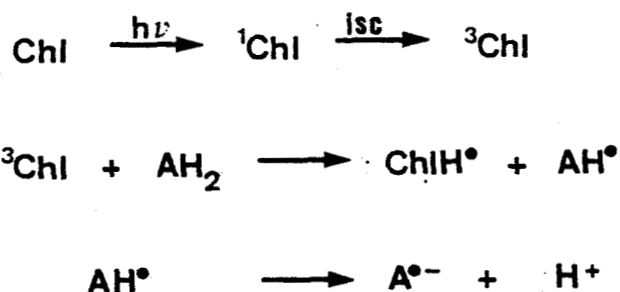
Les cycles tétrapyrroliques sont photoréduits par transfert de charge en présence de donneurs d'électron.

La chlorophylle (Chl) sensibilise l'oxydation de l'hydroquinone ( $H_2Q$ ) par transfert d'électron. On aurait (90) :



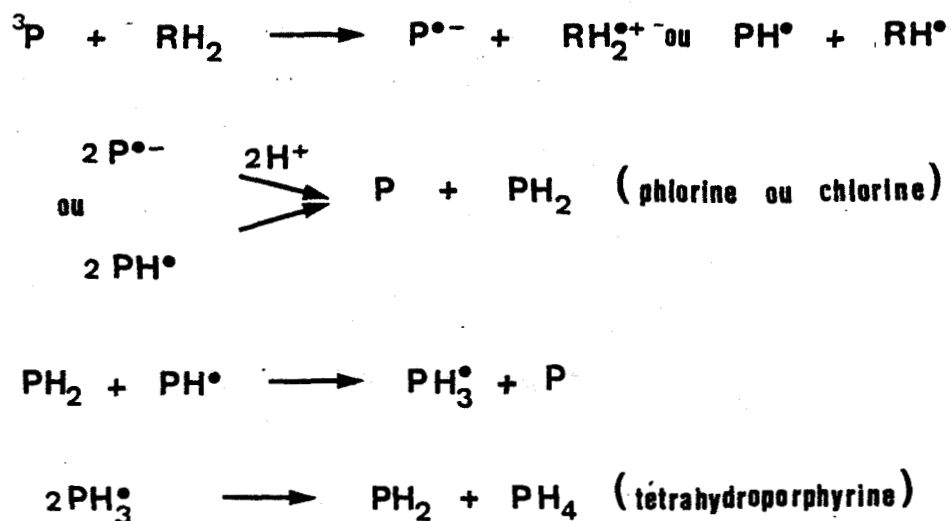
Le radical benzosemiquinonique ( $HQ^\bullet$ ) formé à partir du radical cation ( $QH_2^{\bullet+}$ ) a été caractérisé par R.P.E par BANERJEE et TOLLIN (91).

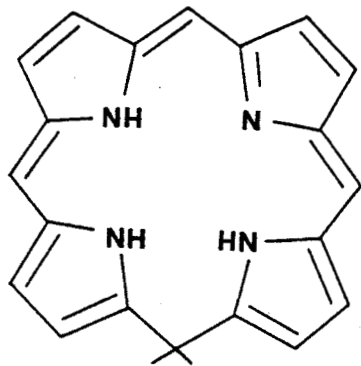
En présence d'acide ascorbique ( $AH_2$ ), la chlorophylle est photoréduite en sa forme semi-réduite ( $ChIH^\bullet$ ) dans la pyridine. Cette dernière a été observée par R.P.E (92).



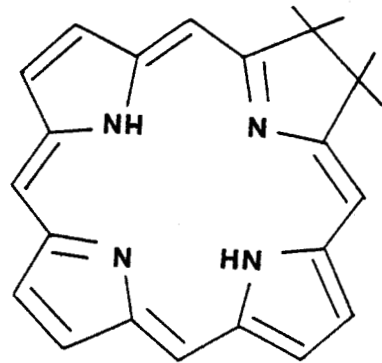
L'hématoporphyrine est photoréduite en présence de donneurs d'électron ou de proton. Les radicaux de l'uroporphyrine (57a), de l'hématoporphyrine (47-a,b) de même que ceux des agents donneurs (47-B) ont été détectés par R.P.E ou par photolyse éclair (93). Selon ces études, c'est l'état triplet des porphyrines qui est l'état réactif.

Les métalloporphyrines et leurs bases libres (P) sont réductibles en solution aqueuse désoxygénée en leur radical anion (94,95,96,97,98,57-e). Par dismutation, ces radicaux forment de nouvelles espèces : des phlorines, des tétrahydroporphyrines (95,57-e) ou des chlorines (57-e) (fig. 11-8).

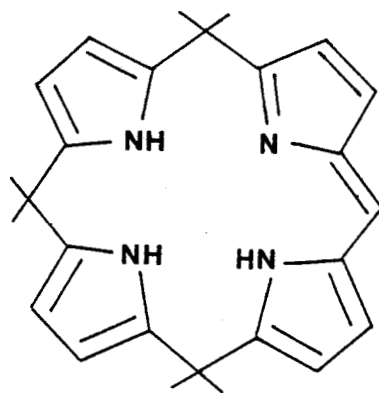




phlorine



chlorine



tétrahydroporphyrine

Figure II-8. Structure des dérivés résultant de la réduction des cycles tétrapyrroliques.

Ce mécanisme réactionnel a été proposé à partir d'études de radiolyse pulsée (95,57-e) et de R.P.E basées sur la deutération du solvant (99).

La réduction peut intervenir au niveau du métal ou au niveau du cycle (95). Le type de produit formé dépend de la nature de la porphyrine, de celle du noyau métallique et du pH de la solution (94).

La réactivité de ces porphyrines est reliée d'un point de vue énergétique à leur potentiel de réduction (94,98,57-e) et il a été également démontré que c'était la molécule protonée dans son état excité qui était la plus réactive (94,98,99,100).

#### 4) Utilisation de la C.I.D.N.P. dans l'étude photochimique des porphyrines :

La technique de photo-CIDNP a été employée dans l'étude des réactions photochimiques faisant intervenir des cycles tétra-pyrroliques par de nombreux groupes de recherche afin d'étudier les différents mécanismes mis en jeu et de déterminer les intermédiaires radicalaires ainsi que les produits formés au cours de la réaction.

La première expérience de CIDNP fut réalisée par TOMKIEWICZ et KLEIN (101) qui étudièrent la photooxydation de la chlorophylle (Chl) par des dérivés quinoniques (Q). Ils observèrent des polarisations sur les quinones et interprétèrent les résultats par la formation de la paire  $\text{Chl}^+\text{Q}^\bullet$  à partir de l'état singulet. Ces travaux repris par ROTH et LAMOLA (102) en une étude plus approfondie ont conduit ces derniers à des résultats opposés, leur suggérant que la paire de radicaux ions est formée à partir de l'état triplet. CLOSS (103) propose également la formation de la paire radicalaire à partir de l'état triplet lors de l'étude du système inverse : la chlorophylle jouant le rôle d'accepteur, les substrats étant des dérivés hydroquinoniques. Cette réactivité à partir de l'état triplet est confirmée par le fait que le  $\beta$ -carotène inhibe ces réactions de photo-CIDNP (102).

Plusieurs facteurs influencent les réactions de CIDNP : le pH, la concentration des espèces présentes, la nature du solvant. ROTH (102) a observé qu'un milieu acide favorisait l'observation des

polarisations. L'explication de ce phénomène fut donnée par MARUYAMA (104) qui propose la formation d'un complexe entre l'accepteur et le donneur. L'acide permettrait la séparation de la paire  $\text{Chl}^+ \text{Q}^-$  et favoriserait la réversibilité du processus. De même ROTH (102) a pu montrer que la concentration de l'accepteur pouvait intervenir au niveau de la probabilité de formation de la paire dans les états singulet ou triplet, favorisant ainsi l'un par rapport à l'autre. MARUYAMA (105) a étudié l'influence du milieu sur la réaction lors de l'irradiation de la phéophytine- $\alpha$  (Pheo- $\alpha$ ) en présence de triméthyl-2,3,5 hydroquinone ( $\text{H}_2\text{Q}$ ). Dans le méthanol il a mis en évidence la paire  $\text{HQ}^\bullet \text{Pheo-}\alpha\text{H}^\bullet$  et en milieu non polaire (benzène) la paire  $\text{H}_2\text{Q}^+ \text{Pheo-}\alpha\text{T}^-$ .

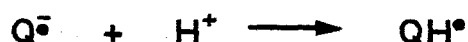
Les interactions photoinduites entre porphyrines et quinones ont fait l'objet de quelques études par CIDNP. Ainsi GLAZKOV (106) qui a étudié le système méso-tétraphénylporphyrine/quinone en solution benzène-méthanol a pu identifier la formation de la paire  $\text{TPP}^+ \text{Q}^{\bullet -}$  pendant l'irradiation.

Il est à noter que dans tous ces travaux les auteurs n'ont jamais observé de polarisations au niveau des protons des dérivés porphyriniques pendant irradiation à l'état stationnaire; ces derniers ne montrent généralement que des effets d'élargissement des raies. L'interprétation de ce phénomène fut donnée par CLOSS et SITZMANN (107), dans le cas des dérivés chlorophylliques. Il proviendrait d'un échange d'électron entre deux molécules du pigment : l'une étant chargée, l'autre étant neutre (cf. chap. I, par. IV-1).

Toutefois dernièrement, MARUYAMA a observé grâce à la CIDNP résolue dans le temps des polarisations provenant des protons pyrroliques de la méso-tétraphénylporphyrine (108,109) et de l'octylporphyrine (109) lors de l'irradiation de ces dérivés en présence de composés phénoliques. Il a pu, par la même occasion, relier la réactivité aux potentiels d'oxydation des agents électrodonneurs.

ZHURAVLEV (110) avait également observé, lors d'une étude par CIDNP  $^{13}\text{C}$  de la photoréaction de dérivés de la méso-tétraphénylporphyrine (TPP) avec la parabenzoquinone (Q), des polarisations

uniquement sur les carbones méso de ces porphyrines. Il propose le mécanisme suivant :



La contribution des différentes paires a été mise en évidence par l'inversion des polarisations sur la quinone lors de l'addition d'un piègeur de radicaux, le tert-butyl nitroxy. De même, MARUYAMA (111) propose un schéma analogue lors de l'étude du même système en présence d'acide.

Cet auteur a mis également en évidence par CIDNP la formation de photoproduit dans les systèmes méso-tétraphénylporphyrine/quinone/méthoxy-4-phénol (112) et (hydroxy-4 phényl)-5 tris p-tolyl-10,15,20 porphyrine/quinone (113).

## V - CONCLUSION

L'utilisation des porphyrines comme agents photosensibilisants en photochimiothérapie des cancers repose sur leur phototoxicité au niveau des cellules tumorales. Le mécanisme réactionnel primaire responsable de leur action photodynamique est très controversé. Celui-ci fait intervenir deux catégories de réactions : type II et type I. Certaines études ont démontré que la photoactivité des porphyrines est attribuée aux réactions de type II. Toutefois, la diversité des paramètres physicochimiques liés à la nature des porphyrines et à leur environnement peut favoriser l'un des mécanismes par rapport à l'autre. Il n'est pas exclu dans ces conditions que la formation

d'espèces radicalaires, par des réactions de type I, intervienne dans les effets primaires de ces agents photosensibilisants. Jusqu'alors peu d'études ont permis d'obtenir des renseignements d'ordre mécanique sur la nature radicalaire des photoréactions primaires qui interviennent dans les systèmes porphyrines-substrats biologiques. Les résultats les plus intéressants à ce niveau proviennent essentiellement de l'utilisation de la technique de photo-CIDNP dans des études axées principalement sur l'interaction des porphyrines avec les quinones. Ces recherches ont permis d'obtenir une meilleure compréhension des photoprocessus primaires, d'identifier de nouveaux produits, d'en établir le mécanisme de formation et de détecter des réactions réversibles importantes dans les études biochimiques. Elles ont permis également de mettre en évidence l'importance des facteurs énergétiques liés aux réactions de transfert électronique. L'intérêt de ces études est limité d'une part par la diversité des résultats obtenus suivant la nature du solvant utilisé et des espèces en solutions et d'autre part par l'absence de polarisations au niveau des porphyrines (ces polarisations ne sont observées que dans des cas bien précis cf. chap I par. VI-1).

Toutefois, ces résultats intéressants nous permettent d'envisager l'utilisation de la technique de photo-CIDNP dans l'étude *in vitro* de photoréactions de modèles simples se rapprochant des systèmes biologiques. D'une part cette technique peut permettre d'obtenir une meilleure compréhension des processus radicalaires pouvant intervenir au cours de l'action photodynamique des porphyrines; d'autre part, elle peut constituer une méthode de choix dans l'évaluation de la photoactivité de différentes porphyrines vis à vis de modèles de substrats biologiques qui constituent en général des cibles d'attaque privilégiées dans l'organisme.

Les chapitres III et IV exposent l'ensemble des résultats que nous avons obtenus sur des systèmes porphyrine/eau/nucléo-bases ou acides aminés.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - R.V. BENSASSON, E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT  
dans "Flash Photolysis and Pulse Radiolysis. Contribution to the  
Chemistry of biology and medicine", Pergamon Press (1983)
- 2 - E. REDDI, G. JORI, M.A. RODGERS et J.D. SPIKES  
Photochem. Photobiol. 38, 639 (1983)
- 3 - R. BONNET, R.J. RIDGE, E.J. LAND, R.S. SINCLAIR, D. TAZT et T.G. TRUSCOTT  
J. Chem. Soc. Faraday trans. I 78, 127 (1982)
- 4 - K. KALYANASUNDARAM  
Inorg. Chem. 23, 2455 (1984)
- 5 - F. RICHELLI et L.I. GROSSWEINER  
Photochem. Photobiol. 40, 599 (1984)
- 6 - H.V. TAPPEINER  
"Über die Wirkung fluoresceinder Stoffe auf Infusorien nach Versuchen  
von O. RAAB"  
Münch. Med. Wochenschr. 47, 5 (1900)
- 7 - M.C. BERENBAUM, R. BONNET et P.A. SCOURIDES  
Br. J. Cancer 45, 571 (1982)
- 8 - H. AULER et G. BANZER  
Z. Krebsforsch. 53, 65 (1942)
- 9 - J. MOAN et T. CHRISTENSEN  
dans "Porphyrins as tumors localizing agents and their possible use  
in photochemotherapy of cancer"  
Tumor. Res. 15, 1 (1980)
- 10 - M.S. LIPSON, M.J. GRAY et E.J. BALDES  
dans "Hematoporphyrin derivatives for detection and management of cancer"  
Proc. 9th Intl. Cancer. Congr. p. 393 (1966)
- 11 - I. DIAMOND, S.G. GRANNELLI, A.F. Mc.DONAGH, A.E. NIELSON  
C.B. WILSON et R. JAENICK  
Lancet II, 1175 (1972)
- 12 - J.F. KELLY, M.E. SNELL et M.C. BERENBAUM  
Br. J. Cancer 31, 237 (1975)



- 13 - T.J. DOUGHERTY, G.B. GRINDLEY, R. FIEL, K. WEISHAUP et G. BOYLE  
J. Natl. Cancer. Inst. 51, 115 (1975)
- 14 - a) T.J. DOUGHERTY  
J. Invest. Dermatol. 77, 122 (1981)
- b) H. VAN DEN BERG  
Chem. Britain 22, 430 (1986)
- 15 - a) A. DALHMANN, A.G. WHILE, R.G. BURNS, G.R. MASON,  
F.M. JHONSON et M.W. BERNIS  
Cancer Res. 43, 430 (1983)
- b) T.J. DOUGHERTY, K.R. WEISHAUP, D. BOYLE, A. MITTLEMAN,  
J.E. KAUFMAN et A. GOLDFARB  
Cancer Res. 38, 2628 (1978)
- 16 - Y.H. HAYATA, C. KATO, J. ONO, Y. MATSUCHIMA, N. HAYASHI,  
T. SAITO et N. KAWATE  
Recent. Results. Cancer. Res. 82, 121 (1982)
- 17 - R.C. BENSON, G.M. FARROW, J.H. KINSEY, D.A. CORTESE,  
H. ZINKE et D.C. UTZE  
Mayo. Clin. Proc. 57, 548 (1982)
- 18 - R.L. LIPSON, B.J. BALDES et A.M. OLSEN  
J. Natl. Cancer Inst. 26, 1 (1961)
- 19 - R. BONNET, R.J. RIDGE, P.A. SCOURIDES et M.C. BERENBAUM  
J.C.S. PERKIN I, 3135 (1981)
- 20 - J.F. EVENSEN, S. SOMMER, J. MOAN et T. CHRISTENSEN  
Cancer Res. 44, 482 (1984)
- 21 - T.J. DOUGHERTY, W.R. POTTER et K.R. WEISHAUP  
dans "Porphyrin in tumor phototherapy"  
Eds. A. ANDREONI, R. CUBEDDU, Plenum Press, New York, p.23 (1984)
- 22 - D. KESSEL  
Photochem. Photobiol. 36, 99 (1982)
- 23 - a) J. MOAN et S. SOMMER  
Photochem. Photobiol. 40, 631 (1984)
- b) J. MOAN et S. SOMMER  
Cancer Lett. 21, 167 (1983)
- 24 - G. BERTOLONI, B. SALVATO, M. DALL'ACQUA, M. VAZZOLER et G. JORI  
Photochem. Photobiol. 39, 811 (1984)

- 25 - G. MORENO et C. SALET.  
Int. J. Radiat. Biol. 47, 383 (1985)
- 26 - G. VOLDEN, T. CHRISTENSEN et J. MOAN  
Photobiochem. Photobiophys. 3, 105 (1981)
- 27 - D. KESSEL  
Biochemistry 16, 3443 (1976)
- 28 - a) L.I. GROSSWEINER, A.S. PATEL et J.B. GROSSWEINER  
Photochem. Photobiol. 36, 159 (1982)  
b) L.I. GROSSWEINER et G.C. GOYAL  
Photochem. Photobiol. 37, 529 (1983)  
c) G.C. GOYAL, A. BLUM et L.I. GROSSWEINER  
Cancer Res. 43, 5806 (1983)
- 29 - J. MOAN  
Porphyrin sensitized photodynamic inactivation of cells  
dans "Lasers in Medical Science", Eds. BAILLIERE-TINDALL, Vol.1, p.5 (1986)
- 30 - A.A. LAMOLA et F.M. DOLIEDEN  
Photochem. Photobiol. 31, 597 (1980)
- 31 - J. MOAN, T. CHRISTENSEN et B.B. JACOBSEN  
Photobiochem. Photobiophys. 7, 349 (1984)
- 32 - D.R. BICKERS, R. DIXIT et R. MUKHTAR  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 108, 1032 (1982)
- 33 - J.F. EVENSEN et J. MOAN  
Br. J. Cancer. 45, 456 (1982)
- 34 - S.L. GIBSON et R. HILF  
Cancer Res. 43, 4191 (1983)
- 35 - R.J. FIEL, N. DATTA-GUPTA, E.H. MARK et J.C. HOWARD  
Cancer Res. 41, 3543 (1981)
- 36 - T.M.A.R. DUBBELMAN, A.L. VAN STEVENINCK et J. VAN STEVENINCK  
Biochem. Biophys. Acta 719, 47 (1982)
- 37 - a) B. GUTTER, W.T. SPECK et H.S. ROSE<sup>N</sup>KRANZ  
Biochem. Biophys. Acta 475, 307 (1977)  
b) I. ROSENTHAL  
Biophys. J. 11, 963 (1971)

- 38 - C.J. GOMER, N. RUCKER, A. BANERJEE et W.F. BENEDICT  
Cancer Res. 43, 2622 (1983)
- 39 - D. KESSEL  
Photochem. Photobiol. 39, 851 (1984)
- 40 - P. ROMANDINI, A. BAREL, G. JORI et T. TSANOV  
dans "Primary photo-processes in Biology and Medicine"  
Eds. R.V. BENSASSON, G. JORI, E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT  
Plenum Press, New-York, Vol. 85 p. 409 (1985)
- 41 - M.M. MATHEWS-ROTH  
Photochem. Photobiol. 40, 63 (1984)
- 42 - J. ROBERTS  
dans "Primary photo-processes in Biology and Medicine"  
Eds. R.V. BENSASSON, G. JORI, E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT  
Plenum Press, New-York, Vol. 85 p. 413 (1985)
- 43 - a) G.R. BUETTNER et M.J. NEED  
Cancer Lett. 25, 297 (1985)  
b) G.R. BUETTNER  
FEBS Lett. 177, 295 (1985)
- 44 - a) K.R. WEISHAUP, G.J. GOMER et T.J. DOUGHERTY  
Cancer Res. 36, 2326 (1976)  
b) J. MOAN, E.O. PETERSEN et T. CHRISTENSEN  
Br. J. Cancer 39, 398 (1979)  
c) A.G.K. STENSTROM, J. MOAN, G. GRUNBORG et T. EKLUND  
Photochem. Photobiol. 32, 349 (1980)  
d) C. EMILIANI et M. DELMELLE  
Photochem. Photobiol. 37, 485 (1983)
- 45 - a) T.G. TRUSCOTT  
dans "Primary photo-processes in Biology and Medicine"  
Eds. R.V. BENSASSON, G. JORI, E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT  
Plenum Press, New-York, Vol. 85 p. 309 (1985)  
b) A. GAUDEMER et J.B. VERLHAC  
Nouv. J. Chimie 8, 401 (1984)

- 46 - a) J.G. PARKER et W.D. STANBRO  
dans "Porphyrin localization and treatment of tumors"  
Eds. D.R. DOIRON et C.J. GOMER, A.L. LISS, New-York (1983)
- b) M. CRAW, R. REDMOND et T.G. TRUSCOTT  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I 80, 2293 (1984)
- 47 - a) S. CANNISTRARO et A. VAN DE VORST  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74, 1177 (1977)
- b) C.C. FELIX, K. RESZKA et R.C. SEALY  
Photochem. Photobiol. 37, 487 (1983)
- 48 - C. SCONFIENZA, A. VAN DE VORST et G. JORI  
Photochem. Photobiol. 31, 351 (1980)
- 49 - P.V. HARIHARAN, J. COURTNEY et S. ELECZKO  
Int. J. Radiat. Biol. 37, 691 (1980)
- 50 - a) D.A. PETERSON, S. Mc.KELVEY et P.R. EDMONDSON  
Med. Hypotheses 7, 201 (1981)
- b) G.R. BUETTNER et L.W. OBERLEY  
FEBS Lett. 121, 161 (1980)
- 51 - S.L. GIBSON, H.J. COHEN et R. HILF  
Photochem. Photobiol. 40, 551 (1984)
- 52 - a) D. MEW, C.K. WAT, G.H.N. TOWERS et J. LEVY  
J. Immunol. 130, 1473 (1983)
- b) A.M. OSEROFF  
Photochem. Photobiol. 41, 355 (1985)
- 53 - J.D. SPIKES  
dans "Primary photo-processes in Biology and Medecine"  
Eds. R.V. BENSASSON, G. JORI, E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT  
Plenum Press, New-York, Vol. 85 p. 209 (1985)
- 54 - J.D. SPIKES  
Photochem. Photobiol. 43, 681 (1986)
- 55 - D. KESSEL et C.J. DUTTON  
Photochem. Photobiol. 40, 403 (1984)
- 56 - R.S. BODANESS et D.S. KING  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 126, 346 (1985)

- 57 - a) D. MAUZERALL et G. FEHER  
Biochim. Biophys. Acta. 88, 658 (1964)
- b) J.H. FUHRHOP et T. LUMBANTOBING  
Tetrahedron Lett., 2815 (1970)
- c) H. SCHEER et J.J. KATZ  
Proc. Natl. Acad. Sci. 71, 1626 (1974)
- d) D.G. WHITTEN  
dans "Porphyrins and Metalloporphyrins"  
Ed. K.M. SMITH, chap. II, Elsevier-Amsterdam (1975)
- e) Y. HAREL et J. MANASSEN  
Photochem. Photobiol. 31, 451 (1979)
- f) J.A. MERCER-SMITH, A. RAUDINO et D.C. MAUZERALL  
Photochem. Photobiol. 42, 239 (1985)
- 58 - R.F.X. WILLIAMS et P. HAMBRIGHT  
Bioorg. Chem. 9, 537 (1978)
- 59 - R.B. WOODWARD  
Ind. Chim. Belg., 1293 (1962)
- 60 - G.N. LA MAR et F.A. WALKER-JENSEN  
dans "The porphyrins" Ed. D. DOLPHIN, VOL. IV, chap. 2, Acad. Press —  
New-York (1979)
- 61 - J.H. FUHRHOP et D. MAUZERALL  
J. Am. Chem. Soc. 91, 4174 (1969)
- 62 - P. WORTHINGTON, P. HAMBRIGHT, R.F.X. WILLIAMS, J. REID,  
C. BURNHAM, A. SHAMIN, J. TURAY, D.M. BELL, R. KIRKLAND,  
R.G. LITTLE, N. DATTA-GUPTA, U. EISNER  
J. Inorg. Biochem. 12, 281 (1980)
- 63 - D.K. LAVALEE  
Coord. Chem. Rev. 61, 55 (1985)
- 64 - R.H. FELTON  
dans "The porphyrins" Ed. D. DOLPHIN, vol. V, chap. 3, Acad. Press —  
New-York (1979)
- 65 - D.G. DAVIS  
dans "The porphyrins" Ed. D. DOLPHIN, vol. V, chap. 4, Acad. Press —  
New-York (1979)

- 66 - R. BONNET, C. LAMBERT, E.J. LAND, P.A. SCOURIDES, R.S. SINCLAIR,  
et T.G. TRUSCOTT  
Photochem. Photobiol. 38, 1 (1983)
- 67 - G. TOLLIN  
J. Phys. Chem. 80, 2274 (1976)
- 68 - M.E. FRINK et G. FERRAUDI  
Chem. Phys. Lett. 124, 576 (1986)
- 69 - H. ELLUL, A. HARRIMAN et M.C. RICHOUX  
J. Chem. Soc. Dalton Trans. 503 (1985)
- 70 - M.E. FRINK, D.K. GEIGER et G.J. FERRAUDI  
J. Phys. Chem. 90, 1924 (1986)
- 71 - a) I.G. LOPP, R.W. HENDREN, P.D. WILDES et D.G. WHITTEN  
J. Am. Chem. Soc. 92, 6440 (1970)  
b) J.K. ROY, A. CARROL et D.G. WHITTEN  
J. Am. Chem. Soc. 96, 6349 (1974)  
c) E.I. KAPINUS, M.M. ALEKSANKINA et I.I. DILUNG  
J. Photochem. 21, 125 (1982)  
d) E.I. KAPINUS, M.M. ALEKSANKINA, V.P. STARYI, V.I. BOGHILLO  
et I.I. DILUNG  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 81, 631 (1985)  
e) A. LABLACHE-COMBIER  
Bull. Soc. Chim., 12, 479 (1975)
- 72 - J.K. ROY et D.G. WHITTEN  
J. Am. Chem. Soc. 94, 7162 (1972)
- 73 - P.R. DROUPADI et V. KRISHNAN  
Photochem. Photobiol. 39, 161 (1984)
- 74 - L.V. NATARAJAN, L.R. HUMPHREYS et R. CHANG  
Spectr. Lett. 18, 219 (1985)
- 75 - P.R. DROUPADI et V. KRISHNAN  
J. Phys. Chem. 89, 909 (1985)
- 76 - G.R. SEELY  
Photochem. Photobiol. 27, 639 (1978)

- 77 - L.I. PARAMONOVA, Y. NAUSH, V.D. KRESLAVSKII et Y.M. STOLOVITSKII  
Biophys. 27, 199 (1982)
- 78 - D. REHM et A. WELLER  
Ber. Bunsenges. Physik. Chem. 73, 834 (1969)
- 79 - a) G. TOLLIN et G. GREEN  
Biochim. Biophys. Acta 60, 524 (1962)  
b) K.P. QUINLAN  
J. Phys. Chem. 72, 1797 (1968)
- 80 - J.R. HARBOUR et G. TOLLIN  
Photochem. Photobiol. 19, 147 (1974)
- 81 - G.S. NAHOR , J. RABANI et F. GRIESER  
J. Phys. Chem. 85, 697 (1981)
- 82 - a) A. HARRIMAN, G. PORTER et P. WALTERS  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. I , 79, 1335 (1983)  
b) A. HARRIMAN, P. NETA et M.C. RICHOUX  
J. Phys. Chem. 90, 3444 (1986)  
c) P. NETA, M.C. RICHOUX, A. HARRIMAN et L.R. MILGROM  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 82, 209 (1986)  
d) M.C. RICHOUX, P. NETA et A. HARRIMAN  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 82, 201 (1986)  
e) M.C. RICHOUX, P. NETA , P.A. CHRISTENSEN et A. HARRIMAN  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 82, 235 (1986)
- 83 - P.A. CHRISTENSEN, A. HARRIMAN, G. PORTER et P. NETA  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 80, 1451 (1984)
- 84 - P. NETA et A. HARRIMAN  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 81, 123 (1985)
- 85 - A.A. LAMOLA, T. YAMANE et A.M. TROZZOLO  
Science 179, 1131 (1973)
- 86 - S.R. FAHRENHOLTZ, F.H. DOLEIDEN, A.M. TROZZOLO et A.A. LAMOLA  
Photochem. Photobiol. 20, 505 (1974)
- 87 - A.A. SCHOTHORST, J. VAN. STEVENINCK, L.N. WENT et D. SUURMOND  
Clin. Chim. Acta 28, 41 (1970)

- 88 - G.S. COX et D.G. WHITTEN  
J. Am. Chem. Soc. 104, 516 (1982)
- 89 - J.H. FUHRHOP et D. MAUZERALL  
Photochem. Photobiol. 13, 453 (1971)
- 90 - K.P. QUINLAN et E. FUJIMORI  
Photochem. Photobiol. 6, 665 (1967)
- 91 - A.K. BANERJEE et G. TOLLIN  
Photochem. Photobiol. 5, 315 (1966)
- 92 - R. LIVINGSTONE et P.J. Mc. CARTIN  
J. Am. Chem. Soc.; 85, 1571 (1963)
- 93 - G. CAUZO, G. GENNARI, G. JORI et J.D. SPIKES  
Photochem. Photobiol. 25, 389 (1977)
- 94 - A. HARRIMAN  
J. Photochem. 29, 139 (1985)
- 95 - Y. HAREL et D. MEYERSTEIN  
J. Am. Chem. Soc. 96, 2720 (1974)
- 96 - J.A. MERCER-SMITH et D.C. MAUZERALL  
Photochem. Photobiol. 39, 397 (1984)
- 97 - P. NETA  
J. Phys. Chem. 85, 3678 (1981)
- 98 - M.C. RICHOUX, P. NETA, A. HARRIMAN, S. BARAL et P. HAMBRIGHT  
J. Phys. Chem. 90, 2462 (1986)
- 99 - D. MAUZERALL  
dans "The porphyrins", Ed: D. DOLPHIN, Vol. V, chap. 2, Acad. Press.  
New-York (1979)
- 100 - V.A. UMRIKHINA et A.A. KRASNOVSKII  
Biokh. 34, 84 (1969)
- 101 - M. TOMKIEWICZ et M.P. KLEIN  
Proc. Natl. Acad. Sci. 70 , 143 (1973)
- 102 - A.A. LAMOLA, M.L. MANION, H.D. ROTH et G. TOLLIN  
Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 3265 (1975)
- 103 - G.L. CLOSS  
dans "Chemically Induced Magnetic Polarisation" Eds. L.T. MUUS,  
P.W. ATKINS, K.A. Mc. LAUGHLAN, chap: XX, 357 (1977)



- 104 - K. MARUYAMA, H. FURUTA et T. OTSUKI  
Chem. Lett. 857 (1980)
- 105 - K. MARUYAMA, H. FURUTA et T. OTSUKI  
Chem. Lett. 1509 (1981)
- 106 - Y.V. GLAZKOV, A.G. ZHURAVLEV, A.M. SHUL'GA et L.A. KHIL'MANOVICH  
Zhu. Priklad. Spektr. 25, 133 (1976)
- 107 - G.L. CLOSS et E.V. SITZMANN  
J. Am. Chem. Soc. 103, 3217 (1981)
- 108 - K. MARUYAMA, H. FURUTA et T. OTSUKI  
Chem. Lett. 709 (1981)
- 109 - K. MARUYAMA et H. FURUTA  
Chem. Lett. 645 (1986)
- 110 - A.G. ZHURAVLEV, A.M. SHUL'GA et G.P. GURINOVICH  
Zhu. Priklad. Spektr. 29, 1062 (1978)
- 111 - K. MARUYAMA ET H. FURUTA  
Chem. Lett. **473** (1986)
- 112 - K. MARUYAMA et H. FURUTA  
Chem. Lett. 243 (1986)
- 113 - K. MARUYAMA, H. FURUTA et A. OSUKA  
Chem. Lett. 475 (1986)

CHAPITRE III

ETUDE PAR C.I.D.N.P.  $^1\text{H}$  ET  $^{13}\text{C}$  DES PHOTOREACTIONS

## INDUITES DANS LES SYSTEMES PORPHYRINES-DERIVES

## QUINONIQUES ET PORPHYRINES-NUCLEOBASES.

I - INTRODUCTION

Comme nous l'avons exposé dans le chapitre II, certains effets primaires qui résultent de l'action photosensibilisante des porphyrines en photomédecine s'avèrent bénéfiques et permettent l'utilisation de ces produits en photochimiothérapie des cancers. Mais leur action se révèle également néfaste en raison d'effets secondaires indésirables qui provoquent une photo-allergie rémanente après traitement.

Pour étudier l'origine de ces différents effets occasionnés par les porphyrines *in vivo*, on réalise des travaux *in vitro* afin de déterminer si ces composés modifient par voie photochimique une molécule biologique prise isolément. Dans l'affirmative, on essaie ensuite de préciser les mécanismes ainsi que les produits obtenus. La transposition de ces résultats *in vivo* est souvent délicate du fait de la simplification des modèles utilisés. Toutefois, les éléments qu'ils fournissent sont indispensables au photobiologiste pour permettre d'élucider le mécanisme d'action de ces substances, *in vivo*, et d'expliquer la réponse biologique résultante.

Les mécanismes de phototoxicité des porphyrines sont de deux types : i) l'un direct où la molécule dans un état excité réagit directement avec le substrat biologique (ce sont souvent des réactions radicalaires) ii) l'autre indirect où c'est une autre molécule qui réagit (photoproduit ou espèce oxygène activée) (fig. III-1). Le mécanisme indirect a été le plus étudié car il est responsable de la majorité des effets phototoxiques des porphyrines. Toutefois les opinions restent controversées à ce sujet. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés essentiellement dans notre travail à étudier le mécanisme direct grâce à l'apport de la technique de photo-C.I.D.N.P. qui permet de mettre en évidence des réactions de type I décrites dans le chapitre précédent.

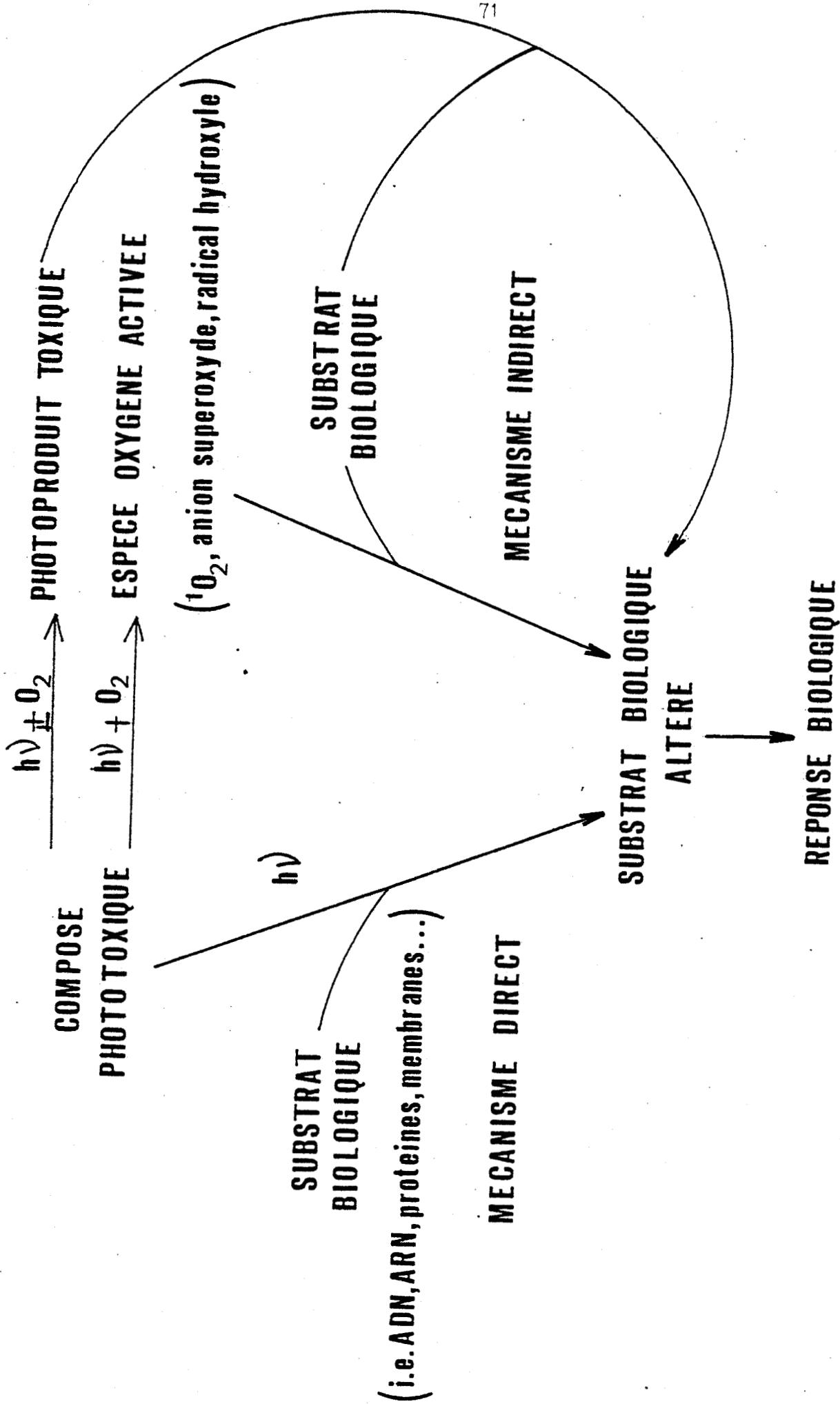


Figure III-1:

Mécanismes de phototoxicité.

Cette technique avait été appliquée antérieurement à l'étude du système d'intérêt biologique : chlorophylle-quinone (cf. chap II, par. IV-4). Bien que ces travaux restèrent très ponctuels, ils auront permis de mettre en évidence le rôle essentiel joué par les processus de transfert de charge dans ce système, et dans des systèmes analogues où le sensibilisateur était une porphyrine.

Dans notre travail, nous nous sommes intéressés au comportement photochimique de solutions aqueuses de dérivés porphyriniques, seuls ou en présence de substrats biologiques cibles. Les travaux réalisés par J. MARKO (1) sur des dérivés de phénothiazines et furocoumarines dans ce laboratoire, ont également révélé un aspect original de la technique de photo-C.I.D.N.P.; à savoir que cette dernière pouvait constituer un test simple et rapide d'évaluation de la phototoxicité de ces substances. Dans cette optique nous avons également tenté d'évaluer la photoactivité radicalaire de différentes porphyrines et essayé de comparer celle-ci avec leur pouvoir photosensibilisant.

La première partie de notre travail a été consacrée à l'étude photochimique de l'interaction du dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) et de certains de ses constituants (hématoporphyrine, protoporphyrine) avec différents agents électro-donneurs.

L'HpD est en effet l'agent le plus utilisé en photochimiothérapie des cancers. De plus comme c'est un mélange complexe de plusieurs porphyrines dont l'action photodynamique semble différente, nous avons tenté de comparer la photoactivité de certains de ses constituants. Enfin il était également intéressant de comparer nos résultats à ceux préalablement obtenus sur des systèmes analogues par RPE (2a-b) ou C.I.D.N.P. (3a-f).

Dans la seconde partie de notre travail, nous avons étendu notre étude aux systèmes porphyrines synthétiques hydrosolubles/bases des acides nucléiques. L'intérêt de l'utilisation de ces porphyrines réside en plusieurs points.

Le premier est lié à la pureté de ces produits. Car dans le cas de l'HpD nous irradiions un mélange de porphyrines et les effets observés en C.I.D.N.P. sont la résultante de l'action photochimique de toutes ces porphyrines. Nous pouvons faire également la même observation pour les échantillons d'hématoporphyrine IX qui contiennent

de la protoporphyrine et de la vinylhydroxyéthyldeutéroporphyrine en faible quantité (4)..

L'utilisation des porphyrines hydrosolubles permet, d'autre part, de s'affranchir des phénomènes d'agrégation. En effet l'hématoporphyrine, la protoporphyrine (5a) ainsi que l'HpD (5b) forment des agrégats importants en solution aqueuse, ce qui est préjudiciable à l'observation d'effets de C.I.D.N.P. sur ces produits.

Enfin, certaines substances antitumorales sont connues pour leurs capacités à dégrader l'ADN (6). De même, certains travaux ont montré que l'ADN est une des cibles biologiques de l'action photodynamique des porphyrines (cf. chap II). Le mécanisme d'action de ces composés est responsable de coupures simple et double brins (7a-c). Ces dernières sont en particulier moins facilement réparées par les ligases. En conséquence elles sont plus favorables à promouvoir des effets néfastes qui peuvent conduire à la nécrose de la cellule. GUTTER (7a) a également observé que ces lésions étaient dues à une perte des bases guanine résultant d'une photooxydation de ce résidu. Le mécanisme photochimique qui conduit à ce processus n'est pas encore établi. Bien qu'il soit admis que le mécanisme de type II faisant intervenir l'oxygène singulet soit prépondérant dans ce genre de réaction, il n'est pas exclu qu'un mécanisme radicalaire en soit également responsable.

De plus les porphyrines hydrosolubles ont une grande affinité pour l'ADN (8a). En particulier, la porphyrine cationique TMePyPH<sub>2</sub> est capable de s'intercaler au niveau des paires de bases guanine-cytosine (8b). KOBAYASHI (9) a montré que les propriétés intercalantes des sensibilisateurs favorisaient les réactions de transfert de charge qui nécessitent la proximité spatiale du sensibilisateur et du substrat. Ces porphyrines, au vu de leurs propriétés sensibilisantes, peuvent être de nouveaux agents sélectifs et efficaces dans la destruction des cellules cancéreuses.

Dans la première partie de ce chapitre, nous exposerons les résultats que nous avons obtenus; dans la seconde, nous ferons un commentaire sur la nature des mécanismes proposés à la suite des informations apportées par les différents spectres de C.I.D.N.P.

## II - RESULTATS EXPERIMENTAUX

### 1) Protocole expérimental :

Les expériences réalisées ont consisté à enregistrer le spectre R.M.N  $^1\text{H}$  ou  $^{13}\text{C}$  au cours de l'irradiation d'une solution contenant la porphyrine seule ou en présence de substrat. Nous avons utilisé un système de filtres optiques pour irradier sélectivement la porphyrine dans une de ses bandes d'absorption [bande de SORET ( $\approx 400$  nm) ou bandes Q ( $\approx 600$  nm)]. Nous avons choisi ces deux longueurs d'onde, d'une part parce que ce sont celles qui sont généralement utilisées en photochimiothérapie, d'autre part pour noter les différences éventuelles de réactivité comme l'ont démontré certains auteurs (10).

Nous avons étudié leurs photoréactions principalement en solution aqueuse ( $\text{D}_2\text{O}$ ) ou alcoolique (méthanol- $\text{D}_4$ ). Ces solvants se rapprochent le plus des conditions biologiques de solubilisation des porphyrines dans les cellules.

Tous les travaux précédents de C.I.D.N.P. concernant les porphyrines ont été réalisés dans des solvants non polaires tels que le chloroforme ou le benzène. Toutefois pour des raisons de solubilité nous n'avons pu obtenir des résultats satisfaisants dans ces solvants.

### 2) Irradiation des porphyrines seules en solution :

En solution, l'irradiation du système porphyrine/substrat induit des effets de C.I.D.N.P. qui proviennent à la fois de la photo-réactivité des porphyrines seules en solution et de leur interaction avec le substrat. Afin de différencier ces deux phénomènes, nous avons étudié dans un premier temps la photoréactivité des porphyrines seules en solution.

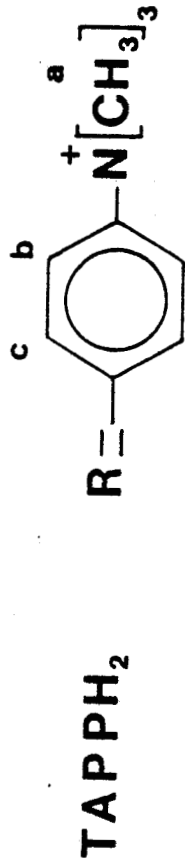
Les formules des différentes porphyrines utilisées et leurs abréviations sont données dans le tableau II-4 en ce qui concerne les dérivés de l'hématoporphyrine; celles des porphyrines hydrosolubles sont regroupées sur la figure III-2.

Les porphyrines synthétiques sont des dérivés de la porphine substituée en position méso par des groupements hydrophiles cationiques et anioniques\*.

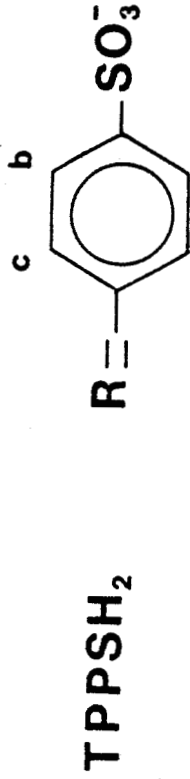
\* Pour des raisons de commodité, nous ferons abstraction des charges portées par les bases libres des porphyrines lorsque ces dernières seront écrites sous forme abrégée.



Meso-tetra (4-N-methylpyridyl) porphyrine (chlorure et tosylate)



Meso-tetra (4-N,N',N''-trimethylaminophenyl) porphyrine (chlorure)



Meso-tetra (4-sulfonatophenyl) porphyrine (sel de sodium)

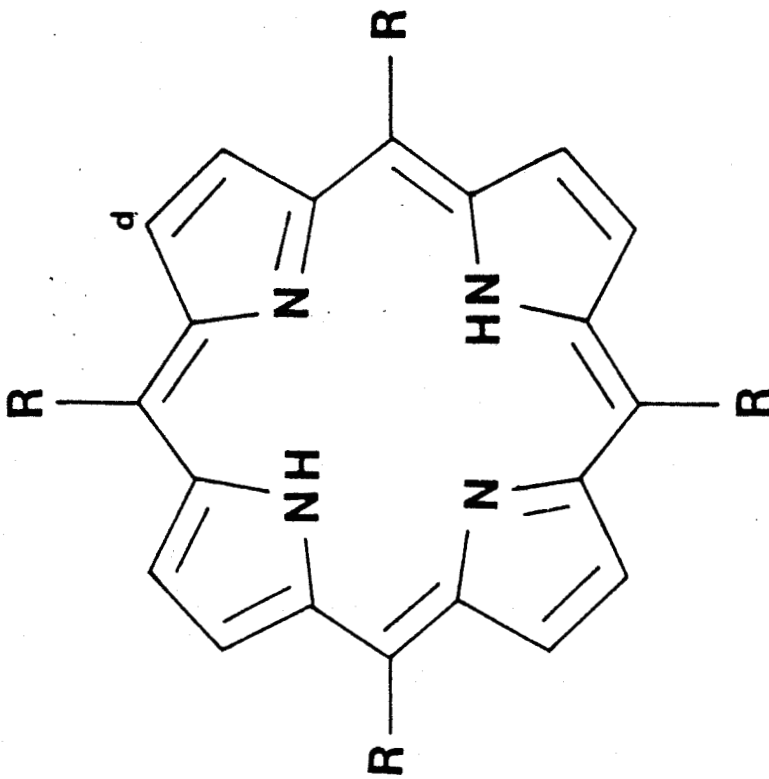


Figure III-2:

Formules des porphyrines synthétiques hydrosolubles.



• L'irradiation de l'Hp, de la PP et de l'HpD en solution aqueuse ( $2 \times 10^{-3}M$ ) a montré un phénomène intéressant d'élargissement des raies ("broadening"). Nous avons également observé que pour des concentrations supérieures à  $10^{-2}M$  ces effets disparaissent.

Dans le cas de l'HpD il est nécessaire de travailler à pH légèrement acide ( $pH \approx 5-6$ ) et d'augmenter le nombre d'accumulations pour observer les signaux R.M.N.

En solution méthanolique, ce phénomène est atténué. Toutefois il est intéressant de noter que ces produits sont plus solubles dans ce solvant. En effet en solution aqueuse il se forme facilement des agrégats; ainsi pour des concentrations de l'ordre de  $10^{-5}M$ , 60% d'Hp se trouve sous forme de dimère (2a).

• L'irradiation des porphyrines hydrosolubles a montré qu'elles possédaient chacune une réactivité différente. La porphyrine anionique  $TPPSH_2$  ne montre pas d'effet de C.I.D.N.P. en milieu acide. En milieu basique les protons pyrroliques et aromatiques de ce composé montrent un phénomène d'élargissement des raies analogue à celui observé sur Hp.

Par contre les signaux des porphyrines cationiques  $TMePyPH_2$  et  $TAPPH_2$  sont polarisés de façon similaire en milieu acide. La figure III-3 présente le spectre de C.I.D.N.P.  $^1H$  obtenu lors de l'irradiation de la  $TMePyPH_2$  à  $pD = 4$ .

- Les protons  $\beta$ -pyrroliques d (singulet à  $\delta = 9,3$  ppm) sont en absorption exaltée (A), ainsi que les protons  $\alpha$ -pyridiniques c (doublet à  $\delta = 9,1$  ppm). Au niveau des protons  $\beta$ -pyridiniques b (doublet à  $\delta = 9,5$  ppm) il est difficile de se prononcer sur la nature de la polarisation puisque celle-ci est très faible.

- Les protons N-méthyliques (singulet à  $\delta = 4,9$  ppm) montrent de l'émission E.

En milieu basique, ces polarisations disparaissent également sous l'effet d'un élargissement des raies.

Les spectres de R.M.N., pris après irradiation, sont identiques aux spectres de départ : il n'y a donc pas eu dégradation de ces produits.

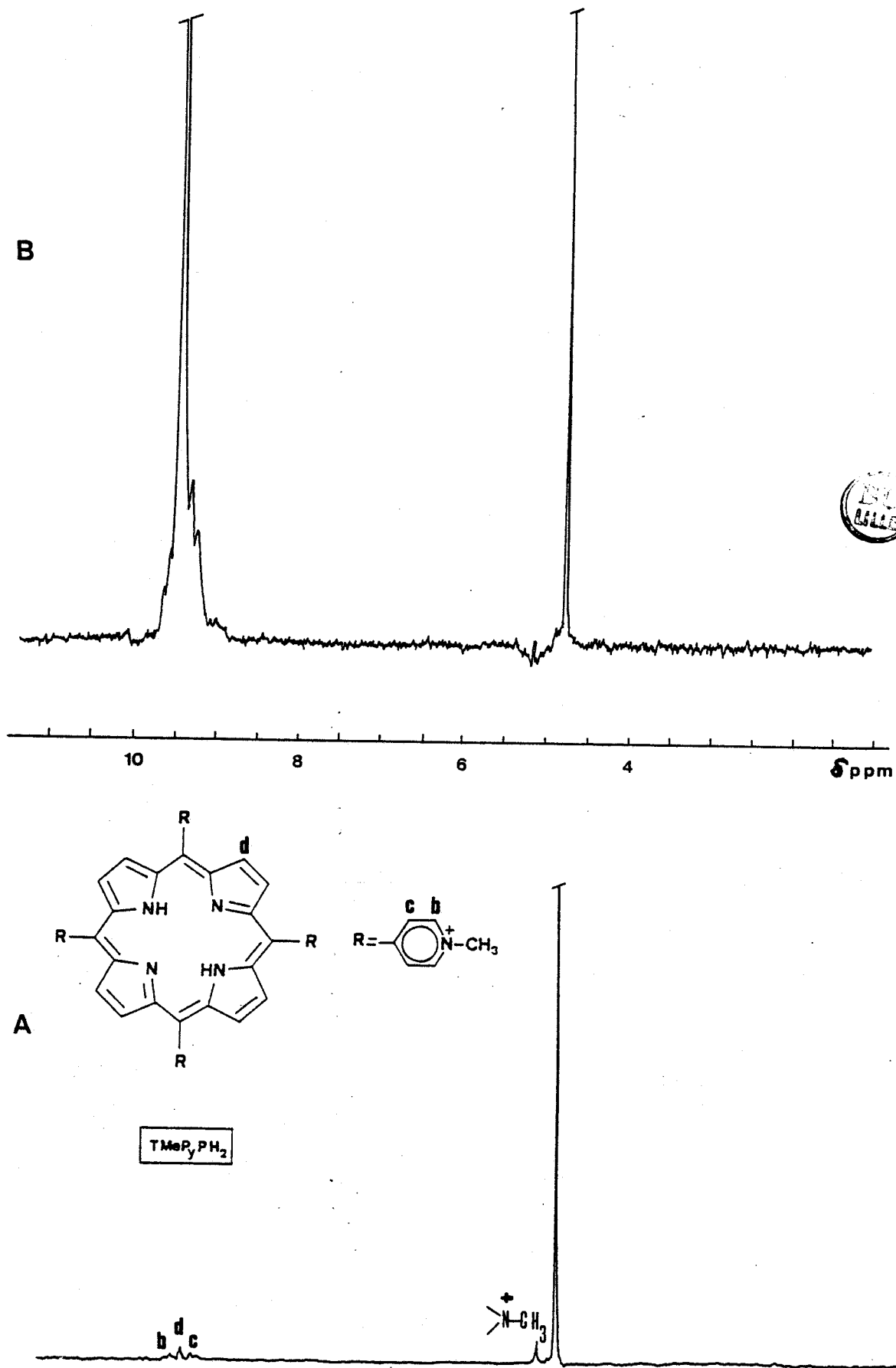


Figure III-3:

Spectre CIDNP- $^1\text{H}$  :  $\text{TMePyPH}_2(\text{Chlorure})-\text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{pD}=4$ . A) Avant irradiation B) Pendant irradiation.

### 3) Irradiation en présence des agents électro-donneurs :

Les formules des agents électro-donneurs utilisés dans cette étude sont présentées sur la figure III-4.

La figure III-5 montre les spectres  $^1\text{H}$  pris avant et pendant irradiation d'une solution aqueuse d'Hp et de L-Dopa en milieu légèrement acide (pD = 5).

En plus de l'effet d'élargissement des raies observé au cours de l'irradiation de la porphyrine seule, cette dernière montre de faibles polarisations sur certains de ses protons :

- protons 5,10,15,20 ( $\delta = 10,8 - 10,1$  ppm) en absorption exaltée
- protons méthyliques en position 2,7,12,18 (signal centré à  $\delta = 3,9$  ppm) en émission

La L-Dopa montre également de fortes polarisations.

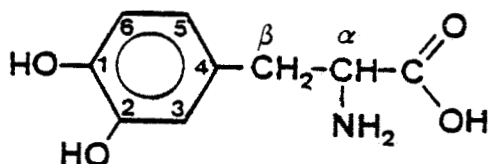
- protons aromatiques 3,5,6 (multiplet centré à  $\delta = 6,5$  ppm) en émission (E)
- protons  $\beta\text{-CH}_2$  (multiplet à  $\delta = 3,2$  ppm) en absorption exaltée (A)

On note également qu'au cours de cette photoréaction aucun signal autre que ceux des produits initialement en solution ne montre d'effets de C.I.D.N.P. et que le spectre de R.M.N. du mélange pris après irradiation est identique au spectre de départ. Ce résultat est également obtenu pendant l'addition de plusieurs FID (96) au cours d'une irradiation prolongée (5 mn). L'intensité des polarisations varie peu dans ce cas par rapport à une irradiation de courte durée (6s).

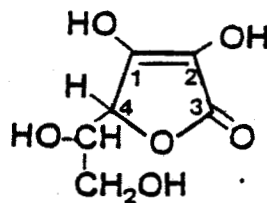
En milieu basique (pD = 9-10) l'intensité des signaux de C.I.D.N.P. observés au niveau de la L-Dopa est moins importante qu'à pD acide (fig. III-6). On note également un faible élargissement des raies. Des résultats identiques ont été obtenus avec les agents électro-donneurs suivants : catéchol, pyrogallol, para-phénylènediamine, acide ascorbique et en présence des différentes porphyrines citées plus haut. Ceux-ci sont résumés dans le tableau III-1.

Par contre dans le cas de l'hydroquinone, on observe lors de l'irradiation de ce produit en présence d'Hp de nouveaux signaux polarisés (fig. III-7). MARUYAMA *et al.* (11) ont récemment indiqué

L dopa



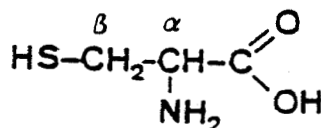
acide ascorbique



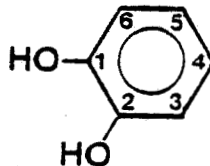
para phénylènediamine



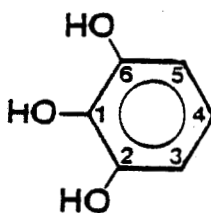
cystéine



catéchol



pyrogallol



hydroquinone



glutathion

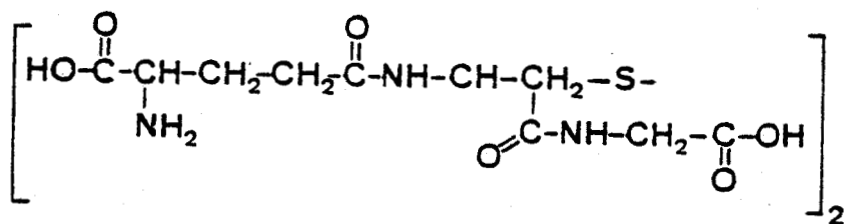


Figure III-4:

Formules des composés électro-donneurs utilisés.

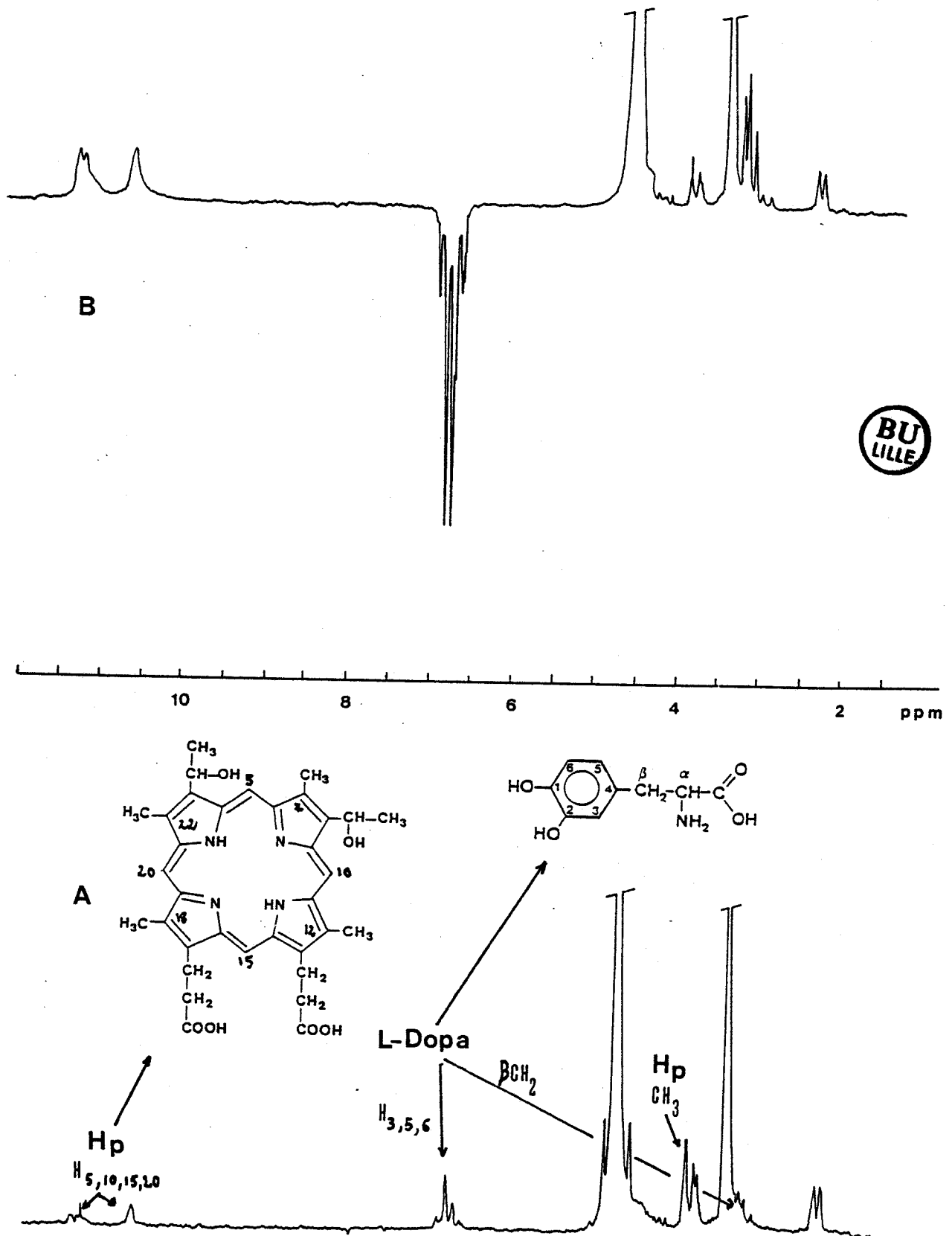


Figure III-5:

Spectre CIDNP- $^1\text{H}$  : Hp - L-Dopa -  $\text{D}_2\text{O}$ ,  $\rho\text{D}=5$ ,  $\text{NS}=96$ . A) Avant irradiation B) Pendant irradiation.

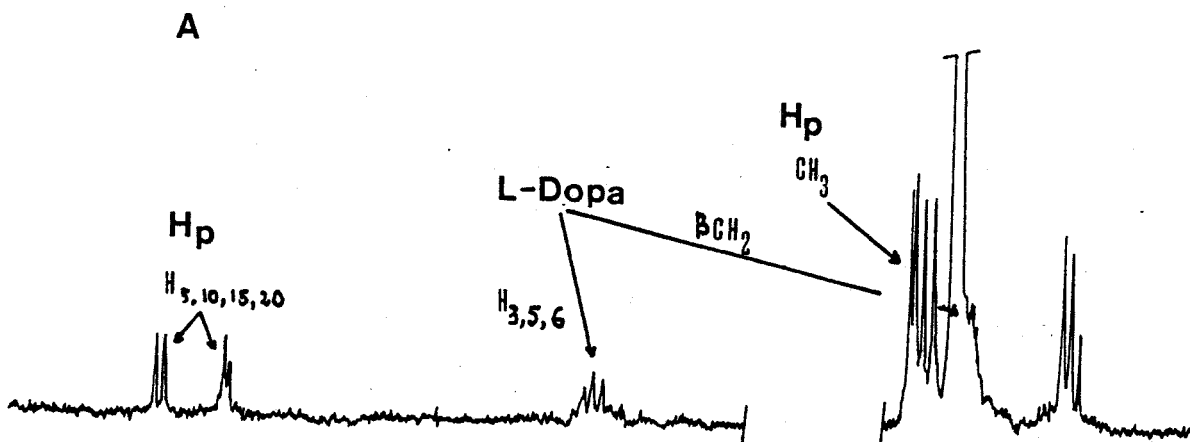
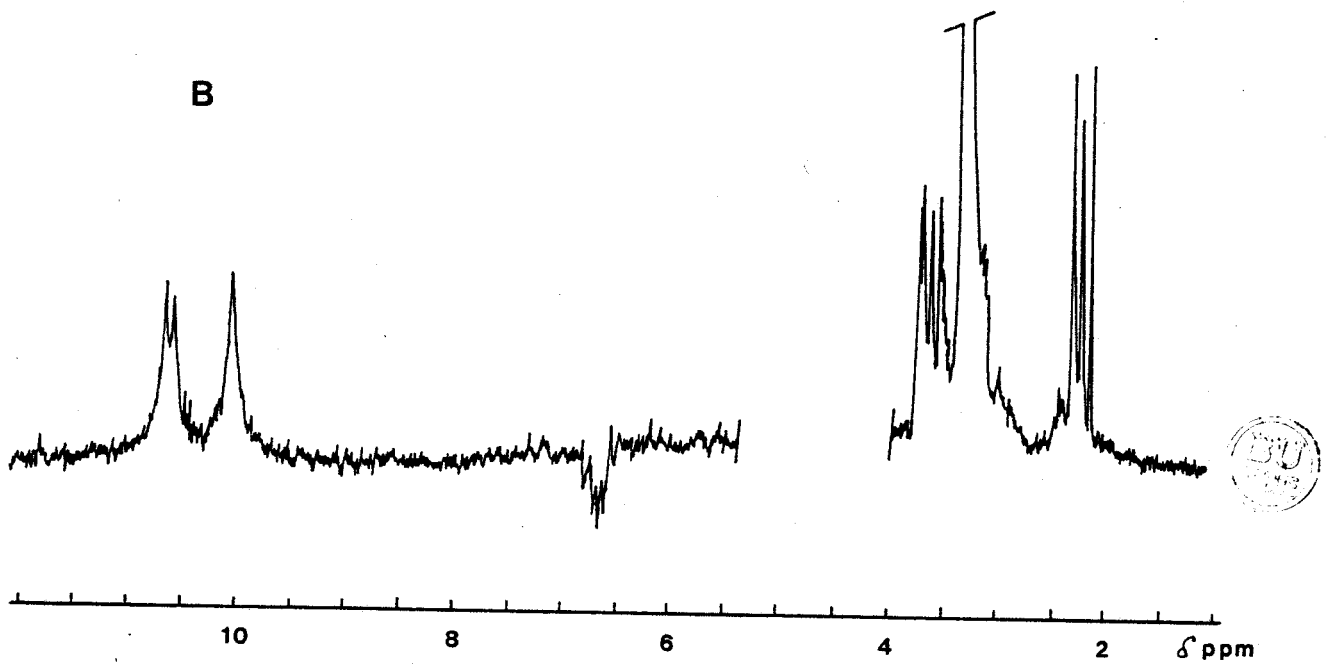


Figure III-6:

Spectre CIDNP-<sup>1</sup>H : Hp - L-Dopa - D<sub>2</sub>O, pD=9, NS=96. A) Avant irradiation B) Pendant irradiation.

Milieu $D_2O - CD_3 OD$	ACIDE	BASIQUE
L-DOPA	- H-3,5,6 (multiplet à $\delta = 6,5$ ppm) : E (F) - $CH_2-\beta$ (multiplet à $\delta = 3,2$ ppm) : A (F)	Polarisations identiques mais atténuées
ACIDE ASCORBIQUE	- H-4 (doublet à $\delta = 4,9$ ppm) : E (f)	rien
CATECHOL	- H-3,4,5,6 (multiplet à $\delta = 7$ ppm) : E (F)	E (f) + B
PYROGALLOL	- H-4,5,6 (multiplet à $\delta = 6,9$ ppm) : E (F)	E (f) + B
PARAPHENYLENE DIAMINE	- H-2,3,5,6 (singulet à $\delta = 6,8$ ppm) : E (F)	E (f) + B
CYSTEINE	rien	rien
GLUTATHION	rien	rien
HYDROQUINONE	- H-2,3,5,6 (singulet à $\delta = 6,7$ ppm) : E (F) - Benzoquinone E (F)	E (f) + B Idem

Tableau III-1:

Polarisations observées (RMN- $^1H$ ) au cours de l'irradiation de différents agents réducteurs en présence de porphyrine (Hp, Pp, HpD). F=Fort; f=Faible; A=Absorption; E=Emission; B="Broadening".

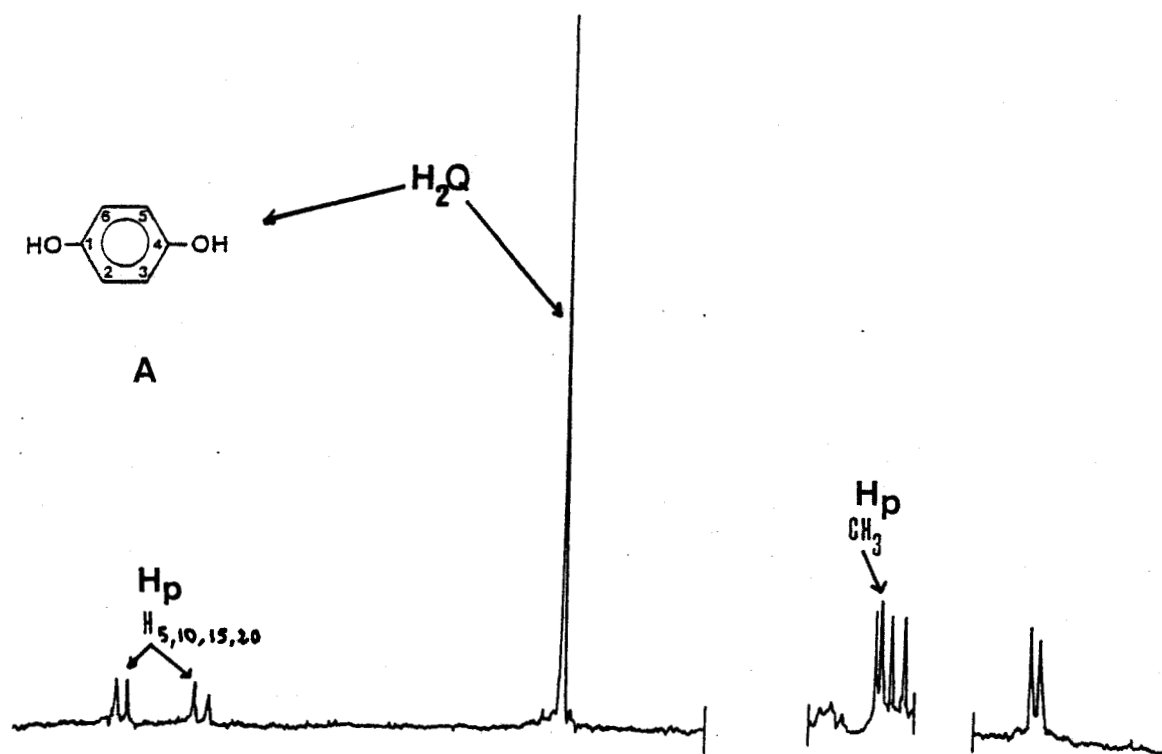
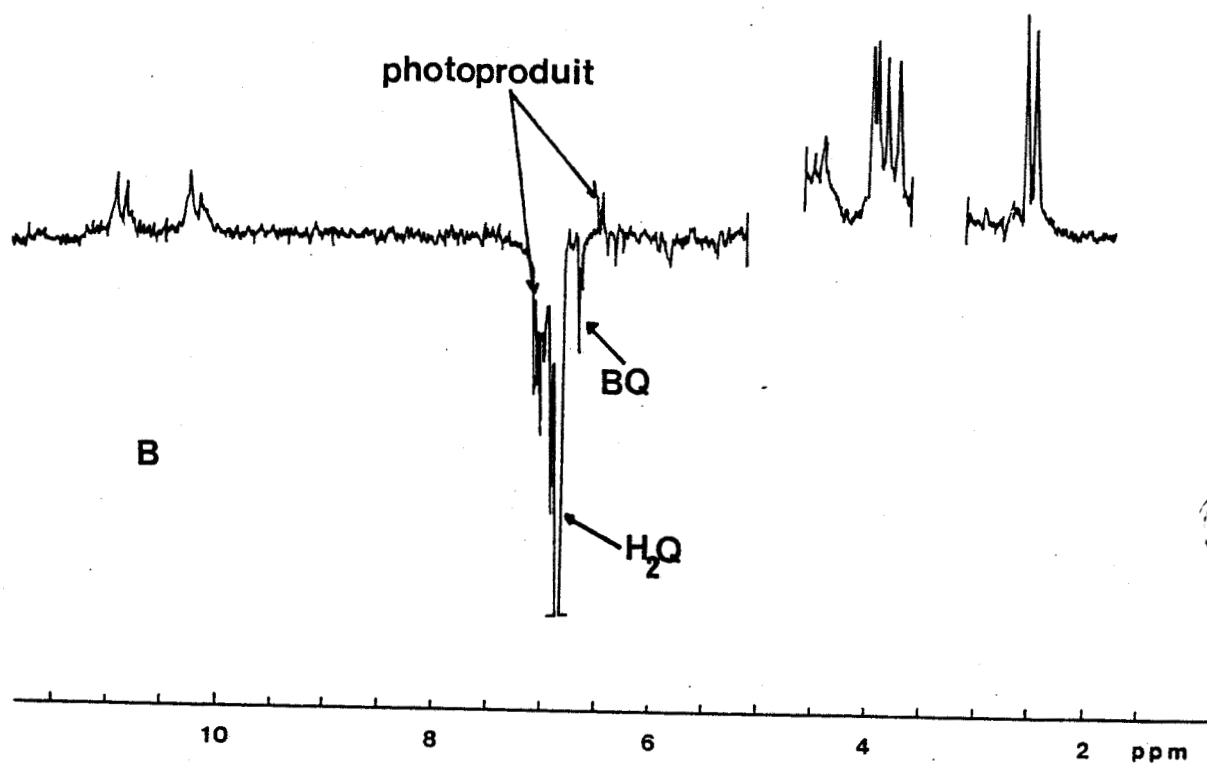


Figure III-7:

Spectre CIDNP-<sup>1</sup>H : Hp - Hydroquinone(H<sub>2</sub>Q) - D<sub>2</sub>O, pD=7, NS=96.  
 A) Avant irradiation B) Pendant irradiation. BQ=p-benzoquinone.



qu'au cours de l'irradiation de la p-hydroxyphényl-5 tris-p-tolyl-10,15,20 porphyrine en présence de benzoquinone dans le benzène, il se formait des adduits entre la benzoquinone et la porphyrine au niveau du substituant hydroxyphényle du cycle. De la même façon, nous avons attribué les nouveaux signaux à la formation de photoproduits similaires. Le spectre pris après irradiation montre essentiellement la formation d'un photoproduit que nous avons caractérisé comme étant la benzoquinone ( $\delta = 6,5$  ppm). Les photoproduits montrant des signaux de C.I.D.N.P. en absorption exaltée ou en émission à  $\delta = 6,3; 6,5$  et  $6,9$  ppm n'apparaissent pas sur le spectre après irradiation. On peut donc considérer que ceux-ci se retrouvent à l'état de traces en solution.

Enfin les agents électro-donneurs soufrés que sont la cystéine et le glutathion ne montrent aucun effet de C.I.D.N.P.

Tous les effets de C.I.D.N.P. observés au cours de ces différentes irradiations résultent d'un effet net. Car, nous obtenons des spectres de C.I.D.N.P. identiques, au cours d'enregistrements avec des angles de pulse de  $90^\circ$  et de  $30^\circ$  (1). Nous n'avons donc pas d'effets de multiplet.

Les différentes irradiations effectuées à 400 nm et à 600 nm ne montrent pas de différences importantes au niveau de la nature des effets de C.I.D.N.P.. Toutefois l'intensité des polarisations est légèrement atténuée à 600 nm. La transmission des filtres utilisés étant égale à ces deux longueurs d'onde, on peut attribuer cette différence aux valeurs des coefficients d'extinction moléculaire qui sont très différentes dans les deux cas.

Nous n'avons noté aucune différence sur l'intensité des polarisations des substrats lors de l'irradiation avec l'HpD, Hp et PP.

Lors de l'irradiation des systèmes porphyrines hydrosolubles/agents électro-donneurs, nous avons obtenu des polarisations identiques à celles observées avec Hp sur les substrats. En contrepartie, les polarisations sur ces porphyrines sont plus intenses que celles de Hp quand nous nous plaçons en milieu légèrement acide ( $pD \approx 4$ ).

Nous avons noté que la solution changeait sensiblement de couleur pendant l'irradiation (passage du rouge au brun). Cette coloration disparaît lentement après irradiation. De même le pD de la solution irradiée varie légèrement avant et après irradiation ( $\Delta pD \approx -0,4$ ).

Nous signalerons enfin que le dégazage préalable des solutions n'affecte pas les résultats exposés ci-dessus, donc que la photo-réaction n'est pas sensible à la présence d'oxygène dans le milieu.

#### 4) Etude par C.I.D.N.P. de la photoréaction de différentes porphyrines avec les nucléobases :

Pour des raisons évoquées au début de ce chapitre, nous nous sommes intéressés à l'étude par photo-C.I.D.N.P. de la photoréaction de différentes porphyrines hydrosolubles avec les bases puriques et pyrimidiques qui constituent l'A.D.N., ainsi qu'avec leurs nucléotides monophosphatés.

Les formules des bases utilisées sont représentées sur la figure III-8.

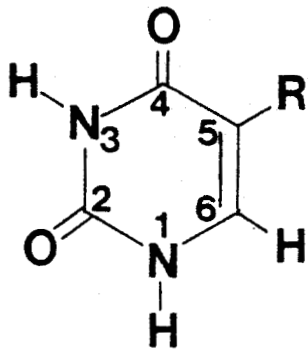
Cette étude montre que ces porphyrines réagissent sélectivement avec certaines bases des acides nucléiques et qu'un parallélisme intéressant du point de vue photoréactivité pouvait être établi par rapport à l'étude déjà effectuée dans ce laboratoire par J. MARKO (1) sur les phénothiazines.

Lorsque les porphyrines sont irradiées en présence des bases des acides nucléiques, elles n'induisent pas de polarisations sur la cytosine, la thymine, l'adénine dans un domaine de  $pD$  relativement large ( $1 < pD < 12,5$ ). Les nucléotides de ces bases ne montrent pas non plus de polarisations.

Par contre, comme nous pouvons le voir sur la figure III-9 la  $TMePyPH_2$  induit une polarisation sur la guanine : proton  $H_8$  (singulet à  $\delta = 7,8$  ppm) en émission. Nous avons noté que la polarisation, sur cette base, n'apparaît que dans des domaines particuliers de  $pD$  suivant la nature de la porphyrine utilisée (voir tableau III-2). Ainsi dans le cas présenté ci-dessus, cette polarisation n'apparaît que pour des valeurs de  $pD$  supérieures à 4.

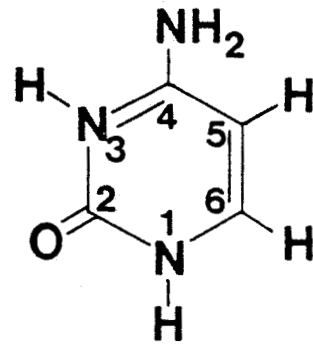
On observe également que l'intensité de cette polarisation augmente avec le  $pD$  (fig. III-10). Les porphyrines présentent des polarisations identiques à celles obtenues lors de leur photoréaction dans  $D_2O$ . Le cas de la  $TMePyPH_2$  est particulier car c'est le seul de ces dérivés qui induise des polarisations sur la guanine en milieu fortement acide  $pD < 3$  (fig. III-11); dans cet exemple le contre-ion de la  $TMePyPH_2$  est le tosylate.\*

\* Les comportements des deux dérivés de la  $TMePyPH_2$  (chlorure et tosylate) sont rigoureusement identiques. Nous avons également vérifié que l'anion tosylate n'induisait aucun effet de C.I.D.N.P. particulier.

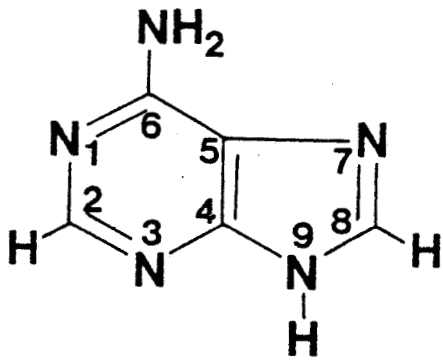


uracile :  $R=H$

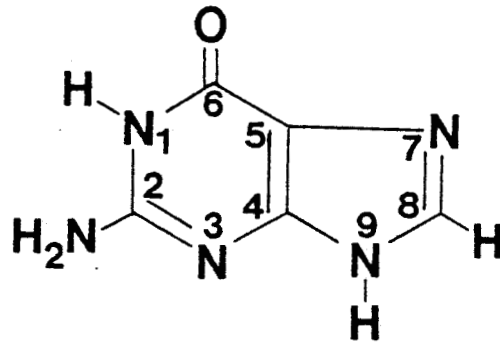
thymine :  $R=CH_3$



cytosine



adenine



guanine

ribose - phosphate \*

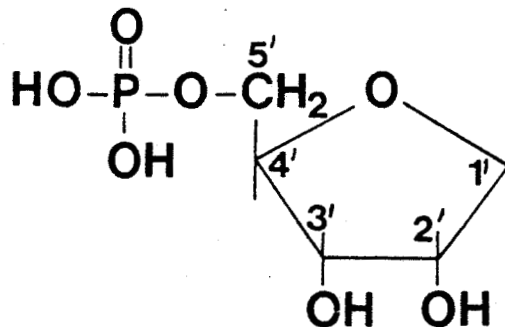


Figure III-8:

Formules des bases pyrimidiques et purique. Le groupement ribose-phosphate est respectivement lié à N-1 et N-9 sur les nucléotides pyrimidiques et puriques.

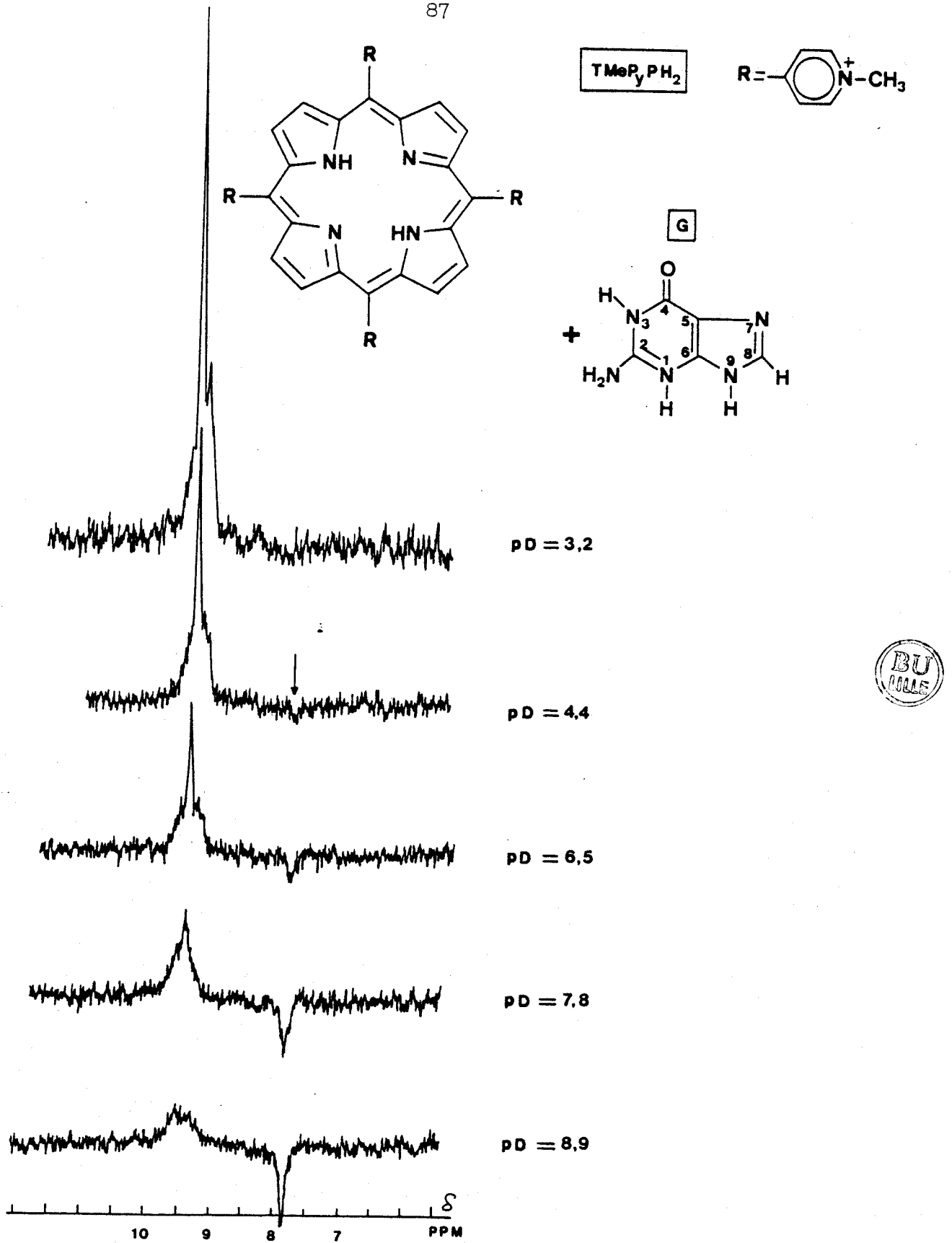


Figure III-9:

Spectres CIDNP- $^1\text{H}$  :  $\text{TMePyPH}_2$  (tosylate) - Guanine -  $\text{D}_2\text{O}$ . Evolution des différentes polarisations en fonction du pD. Le proton  $\text{H}_8$  de la guanine est indiqué par la flèche.

	TMePyPH <sub>2</sub>	TAPPH <sub>2</sub>	TPPSH <sub>2</sub>
CYTOSINE	/	/	/
THYMINE	/	/	/
ADENINE	/	/	/
GUANINE	H <sub>8</sub> δ = 7,8 pD > 4 pD < 3	H <sub>8</sub> (E) pD > 6	H <sub>8</sub> (E) pD > 11
GMP	H <sub>8</sub> (E) pD > 10 pD < 3	/	/
ETHYL-9 GUANINE	H <sub>8</sub> (E) pD > 10 pD < 3	/	/



Tableau III-2:

Domaines de pD pour lesquels des polarisations apparaissent sur les bases et leurs dérivés lorsque ceux-ci sont irradiés en présence des porphyrines suivantes (TMePyPH<sub>2</sub>; TAPPH<sub>2</sub>; TPPSH<sub>2</sub>).

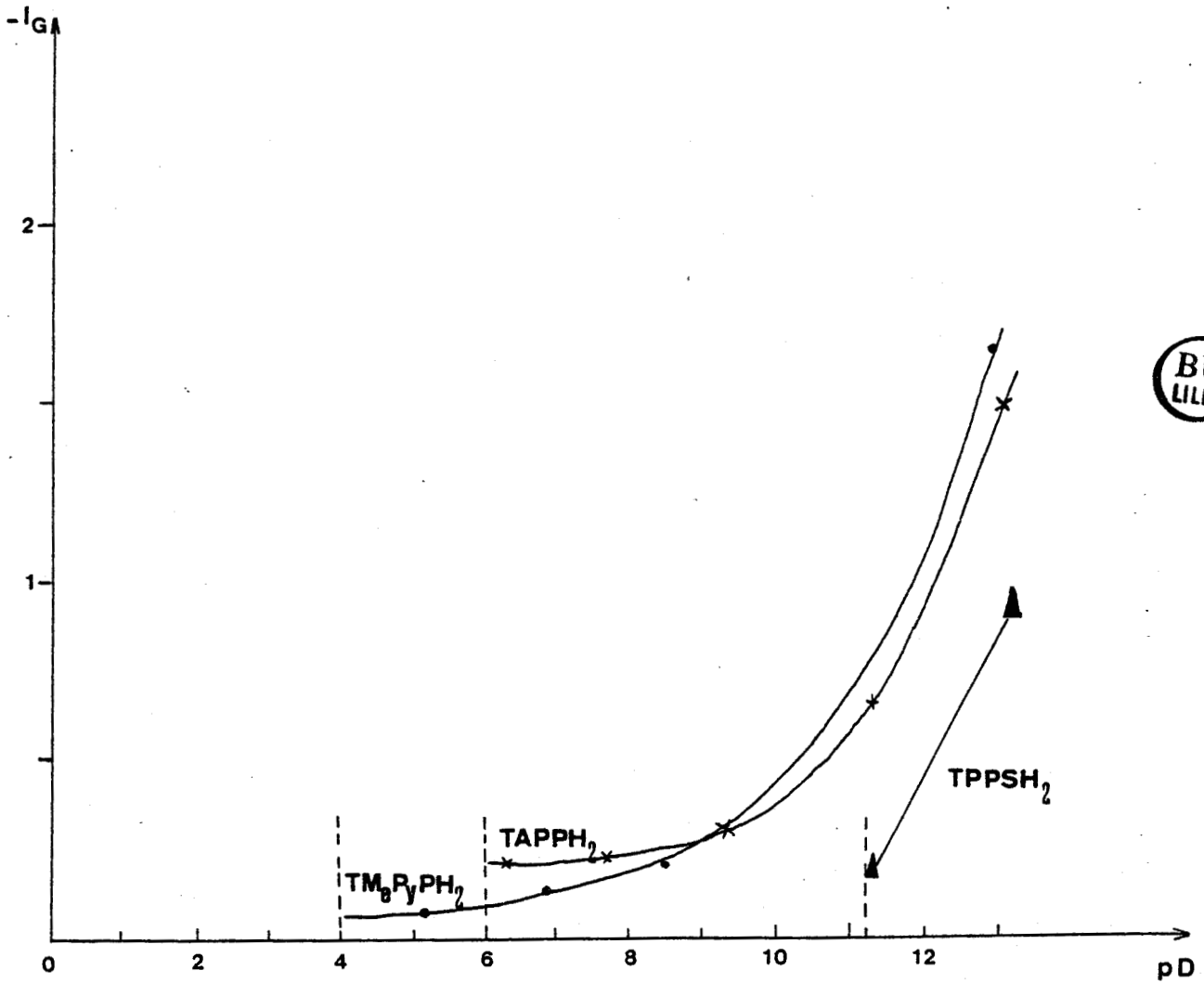


Figure III-10:

Evolution de l'intensité des polarisations sur le proton  $H_8$  de la guanine en fonction du  $pD$  suivant la nature de la  $H_8$  porphyrine utilisée.

$$I_9 = I_r - I_0 \quad \begin{cases} I_0 = \text{intensité de } H_8 \text{ avant irradiation} \\ I_r = \text{intensité de } H_8 \text{ pendant irradiation} \end{cases}$$

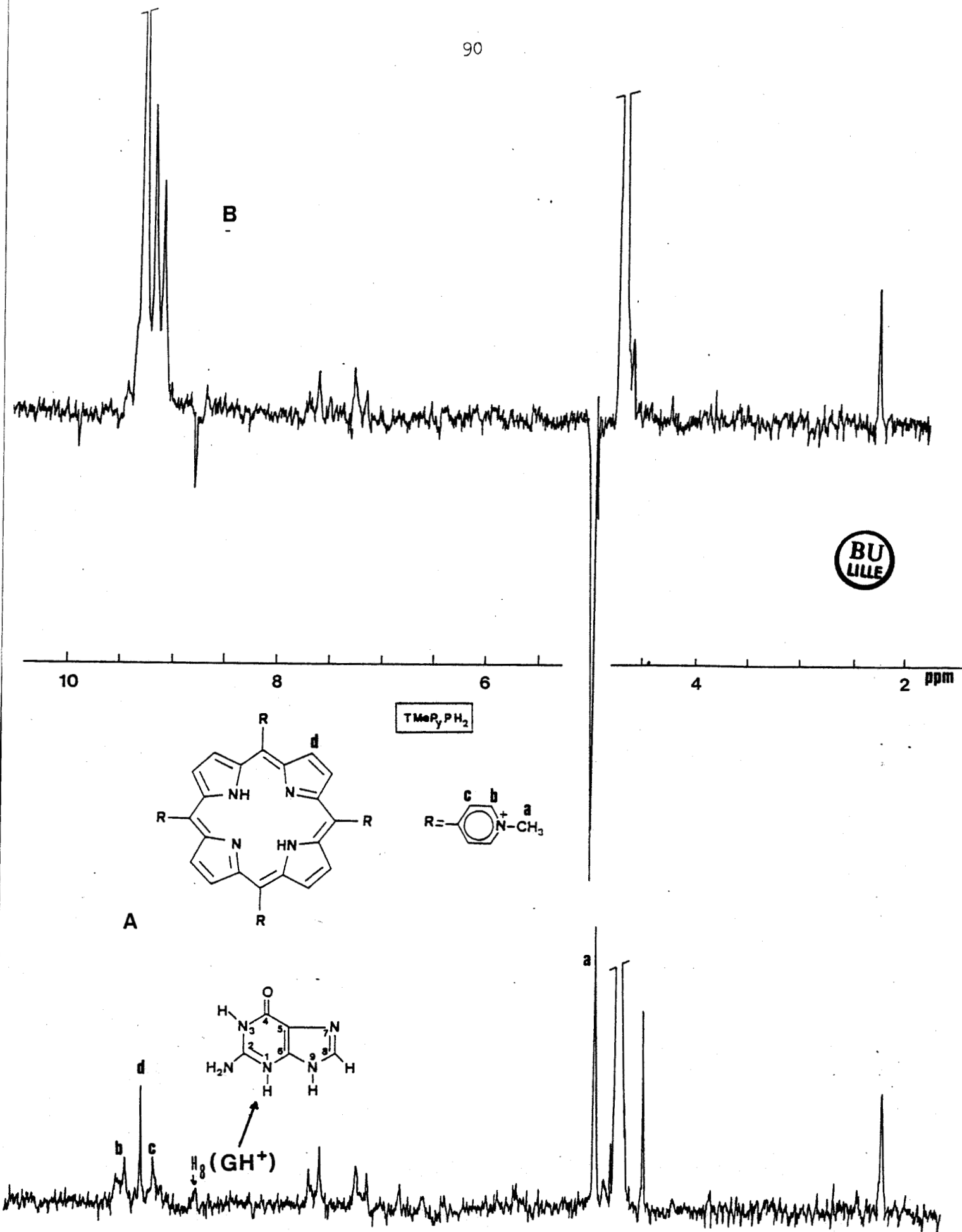


Figure III-11:

Spectre CIDNP-<sup>1</sup>H : TMePyPH<sub>2</sub>(tosylate) - guanine - D<sub>2</sub>O, pD=2, NS=1.  
 A) Avant irradiation B) Pendant irradiation.

Le signal correspondant à la guanine est alors à nouveau polarisé en émission, mais celui-ci est déplacé à  $\delta = 8,8$  ppm. Ceci est dû au fait que la guanine se retrouve sous forme protonée ( $\text{GH}^+$ ) à cette valeur de pD ( $\text{pK}_a = 3,3$  (12)). La porphyrine présente dans ce cas des polarisations beaucoup plus intenses que celles obtenues à  $\text{pD} > 4$ .

Des résultats analogues ont été obtenus sur le nucléotide de la guanine (5'-GMP) ainsi que sur l'éthyl-9 guanine. Toutefois, les polarisations sur ces composés apparaissent à des valeurs de pD plus élevées que celles qui sont mentionnées pour la guanine ( $\text{pD} > 8$ ).

Les spectres de C.I.D.N.P.  $^{13}\text{C}$  montrent également des polarisations sur la guanine (fig. III-12). On observe pour ces composés des polarisations en absorption exaltée pour les carbones  $\text{C}_5$  et  $\text{C}_8$ . Les glissements chimiques des carbones de ces deux produits ont été attribués par rapport aux données de la littérature (13a-b). La prise des spectres de photo-C.I.D.N.P. nécessite l'addition de 1600 FID. Dans les mêmes conditions d'enregistrement, le spectre  $^{13}\text{C}$  de la solution non irradiée ne montre pas de signaux apparents.

A la suite de ces différents résultats nous nous sommes intéressés à l'étude du comportement de ces porphyrines vis-à-vis d'un dinucléotide : la guanylyl-3' → 5' cytidine (GpC) dont la formule est représentée sur la figure III-13. Nous observons, pendant l'irradiation de ce substrat en présence de  $\text{TMePyPH}_2$  à une valeur de pD de 9, l'apparition d'un signal large à  $\delta = 6,5$  ppm en émission. Celui-ci correspond vraisemblablement au déplacement chimique du proton  $\text{H}_8$  de la partie guanine du dinucléotide. Nous n'avons pas pu déterminer le déplacement chimique réel de ce proton à cette valeur de pD étant donné la faible concentration du dinucléotide en solution. Toutefois sur les bases des spectres de RMN de l'éthyl-9 guanine où  $\text{H}_8$  résonne à  $\delta = 6,8$  ppm, et en tenant compte de l'effet de blindage de ce proton lors de la complexation par la  $\text{TMePyPH}_2$  (14), on peut s'attendre à une telle valeur de déplacement chimique de  $\text{H}_8$ . Pour des valeurs de pD inférieures à 9 on observe à la fois des polarisations sur la  $\text{TMePyPH}_2$  ainsi que sur le signal HOD de  $\text{D}_2\text{O}$ . Dans le cas où pD est supérieur à 9, la porphyrine est dégradée.



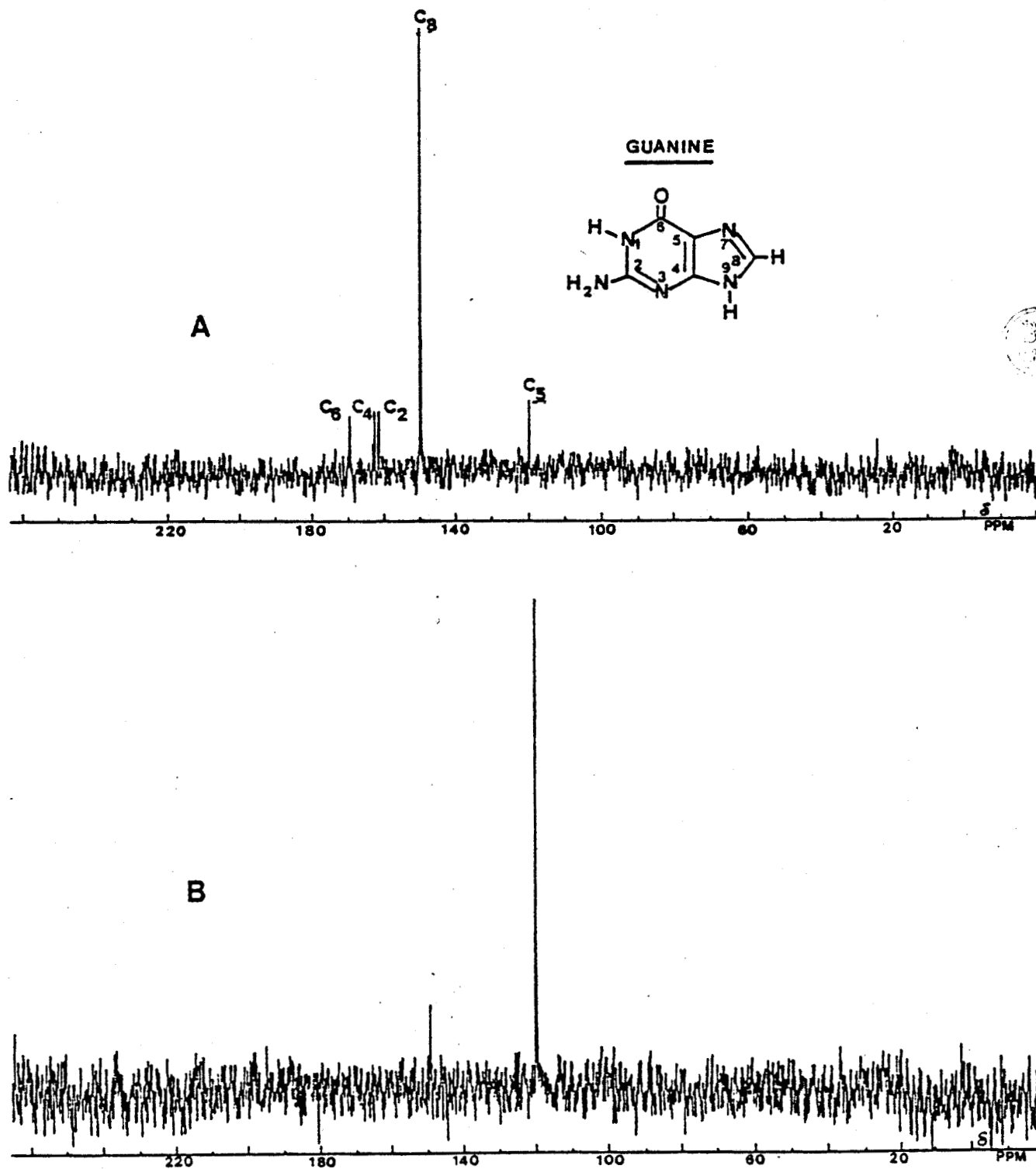


Figure III-12:

- A) Spectre RMN- $^{13}\text{C}$  : Guanine -  $\text{D}_2\text{O}$  -  $\text{pD}=11$  (NS= 96000).  
 B) Spectre CIDNP- $^{13}\text{C}$  : TMePyPH<sub>2</sub>(chlorure) - Guanine -  $\text{D}_2\text{O}$  -  $\text{pD}=11$  (NS=1600 ).

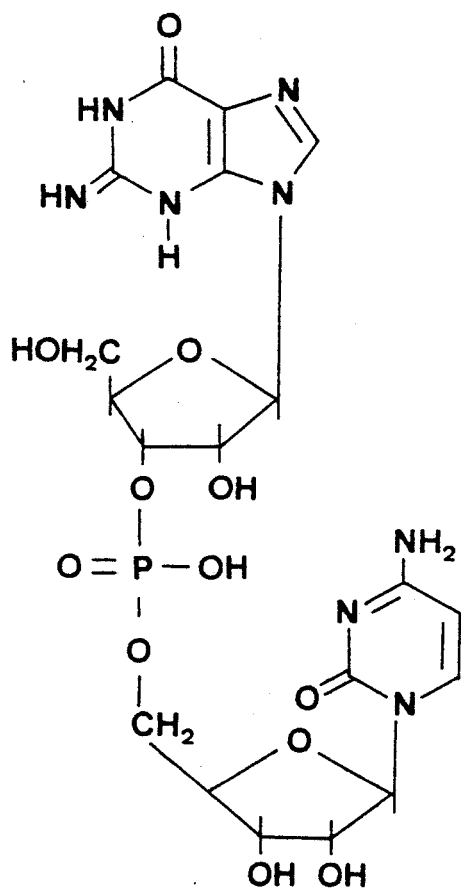


Figure III-13:

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

Des résultats similaires ont été obtenus avec HpD<sup>2+</sup> et Hp. Toutefois les effets de C.I.D.N.P. sur la guanine sont observés dans ce cas en milieu basique (pD = 11-12).

### III - INTERPRETATION DES RESULTATS

#### 1) Porphyrines seules :

CAUZZO *et al.* (15) ont détecté par photolyse éclair la formation du radical anion de l'hématoporphyrine dans des solutions diluées d'acide acétique. Le radical cation de cette porphyrine a également été mis en évidence lors de l'irradiation de cette porphyrine en solution aqueuse de Triton X-100 (16). Toutefois la nature du mécanisme par lequel ces radicaux-ions se forment en solution n'est pas encore élucidée. SMALLEY *et al.* (17) proposent dans le cas de l'octaéthylporphyrine de magnésium un processus d'annihilation triplet-triplet. Ce mécanisme fait intervenir selon ces auteurs un complexe de transfert de charge de haute énergie à l'état triplet. La dissociation de ce complexe en milieu polaire donnerait la paire de radicaux ions. Toutefois MAUZERALL *et al.* (18) proposent dans le cas de l'octaéthylporphyrine de zinc un processus de transfert de charge par réaction entre une porphyrine à l'état excité triplet et une autre à l'état fondamental. Il faut néanmoins noter que selon ces deux éventualités, la paire de radicaux-ions formée serait la même.

Nous avons également remarqué que les effets de C.I.D.N.P. sont influencés par la concentration de la porphyrine. Ceux-ci disparaissent au fur et à mesure que la concentration augmente. Ce phénomène ainsi que l'élargissement des signaux en milieu basique suggèrent également la formation d'une paire de radicaux-ions (19).

En effet on peut attribuer l'élargissement des raies (lors de l'irradiation des porphyrines seules en solution ou en présence de substrat) à des réactions d'échanges de nature différente :

- i) soit un transfert d'énergie entre deux molécules de porphyrines, l'une à l'état excité, l'autre à l'état fondamental



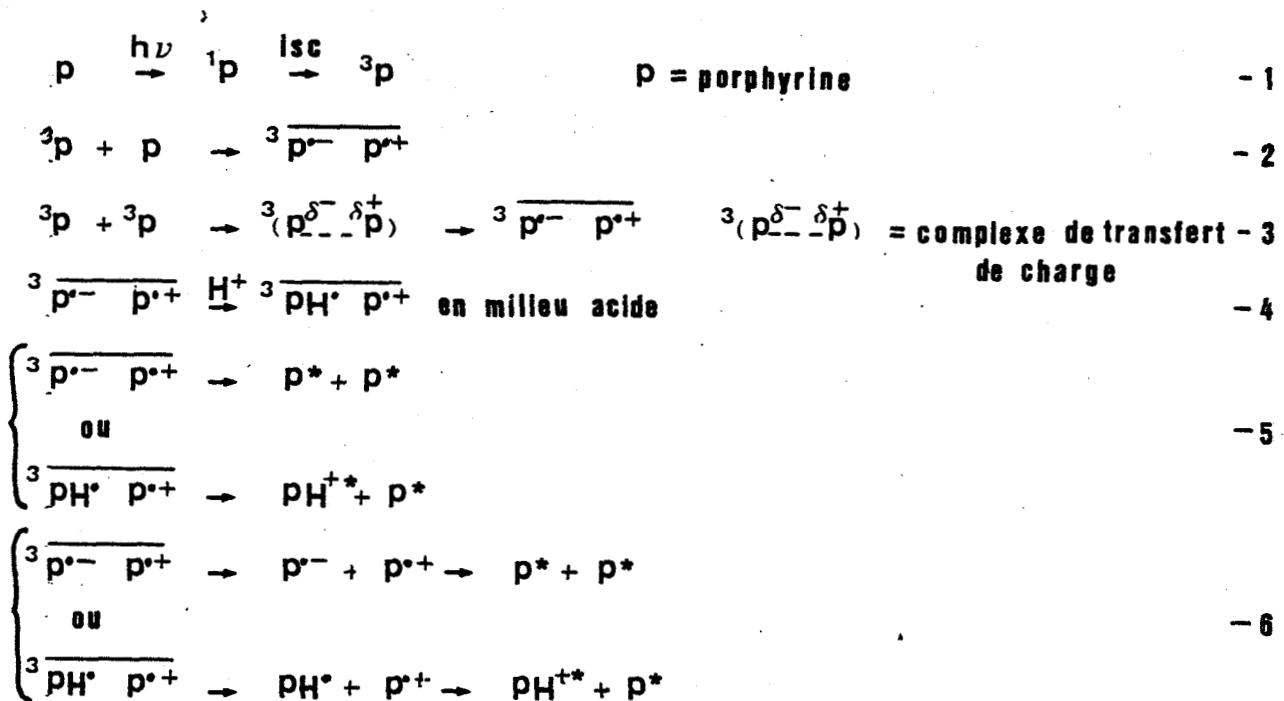
ou  ${}^3[PP] + P \rightarrow [PP] + {}^3P$  dans le cas d'une dimérisation

- ii) soit un transfert d'électron entre radicaux ions et molécules neutres



Ce genre de réactions a déjà été observé au cours de l'irradiation de la chlorophylle (cf. chap. II). Elles ont pour conséquence de diminuer le temps de relaxation spin-réseau ( $T_2$ ), mais affectent peu  $T_1$ . Les effets C.I.D.N.P. ne sont pas modifiés; toutefois l'élargissement des signaux devient important et ceux-ci disparaissent dans le bruit de fond du spectre de R.M.N.

D'après ces différentes constatations nous pouvons donc envisager le mécanisme suivant, que nous allons argumenter :



Sous l'action de la lumière la porphyrine est excitée dans un état singulet, puis passe dans l'état excité triplet par croisement intersystème (éq. 1). Cette molécule excitée peut réagir ensuite par un transfert de charge avec une molécule à l'état fondamental (éq.2), ou par un mécanisme d'annihilation triplet-triplet pour former un complexe de transfert de charge (éq.3). Ces deux mécanismes permettent la formation de la paire de radicaux ions à l'état triplet. En milieu acide, le radical anion de la porphyrine est susceptible de se protoner pour donner la paire  $\text{PH}^{\cdot}\text{P}^{\cdot+}$  (éq.4) (NETA et al. (20) ont déterminé un pK de 9,7 pour le radical-anion de la méso-tétra (carboxyphényl-4)porphyrine .

Les réactions qui conduisent aux radicaux-ions sont hautement réversibles puisqu'il n'y a pas de formation de photoproduits. Dans ces conditions, par transfert inverse au sein de la paire on reforme les produits de départ (produits de cage, éq.5). Les deux

porphyrines sont polarisées et les effets de C.I.D.N.P. résultent de la somme des polarisations (notées\*). De même ces paires peuvent donner les radicaux libres diffusant. Ceux-ci, par rencontre aléatoire peuvent à nouveau former les produits de départ (produits de fuite, éq.6). Selon les règles de Kaptein, les polarisations induites par cette étape seront normalement de signe opposé à celles obtenues à partir de l'équation 5 et devraient normalement annuler les effets C.I.D.N.P. Toutefois dans ce dernier cas, ces polarisations sont atténuées par un phénomène de relaxation des espèces réactives diffusantes (21-22b). Pour expliquer la différence de réactivité entre milieu acide et basique il faut donc tenir compte des paramètres électromagnétiques caractérisant chaque radical (constantes de couplage hyperfin et facteurs de Landé). Ainsi, si l'on considère les polarisations obtenues par la voie de cage, nous devrions avoir (selon les règles de Kaptein) pour l'effet net :  $\mu$  et  $\epsilon$  de même signe,  $\Delta g$  de signe contraire pour chacune des deux molécules de P polarisées (éq.5). Ce sont donc les valeurs des constantes de couplage hyperfin qui devraient déterminer le signe des polarisations. Nous avons vu que les polarisations disparaissent en milieu basique. Dans ce cas particulier la paire serait formée des radicaux-anion et cation de la porphyrine. Les constantes de couplage pour ces deux radicaux seraient donc de même signe et peu différentes. Par contre en milieu acide où les polarisations persistent, nous formons également la paire  $PH^{\cdot-} P^{\cdot+}$ . Les constantes de couplage hyperfin pour ces deux espèces doivent être alors soit de signes opposés soit de valeurs très différentes.

Un autre argument plaide en faveur de la formation de ces différentes paires. C'est le "broadening" observé en milieu basique qui est caractéristique de la formation de radicaux-ions.

Ces derniers sont susceptibles de réagir par dismutation (23-24) pour former le dianion ou le dication de la porphyrine selon l'étape suivante (cf. chap.II)



KAPTEIN (22a-b) a démontré que lors de l'irradiation des systèmes thymine/anthraquinone et flavines/acides aminés, ces réactions étaient responsables de l'absence de polarisations sur la thymine et sur les flavines. Selon cet auteur (22a), la disparition des effets de C.I.D.N.P. dans le cas d'une réaction de dismutation ( $D^{\cdot+} + D^{\cdot+} \rightarrow D + D^{2+}$ )

dépend de la concentration initiale en radical  $D^{\bullet+}$ . Tandis qu'au cours d'une réaction d'échange ( $D^{\bullet+} + D \rightarrow D + D^{\bullet+}$ ) la décroissance dépend de la concentration initiale en D. De fortes concentrations en ces deux espèces sont donc susceptibles de faire disparaître les polarisations. C'est ce que nous observons au cours de notre étude.

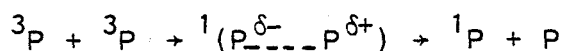
A ce stade il est difficile de déterminer quel est le mécanisme responsable de la formation de la paire de radicaux. Toutefois si l'on se base sur des considérations énergétiques liées à l'équation de REHM et WELLER, le transfert de charge, entre une molécule à l'état triplet et une autre dans l'état fondamental, semble improbable. En effet l'énergie libre de la paire de radicaux-ions peut être estimée, en négligeant le terme coulombien associé au solvant, à 2 eV (25). L'état triplet de ces porphyrines (cf. chap. II) se situe à 1,44 eV. Dans ces conditions l'énergie libre de formation de la paire est positive, le processus est endothermique. Il faut donc admettre que ces porphyrines réagissent par un mécanisme d'annihilation triplet-triplet. On peut alors également estimer  $\Delta G$  en ne tenant pas compte du terme coulombien ( $\frac{e^2}{\epsilon r} \ll \Delta E_{\text{redox}}$ ).

$$\text{nous avons : } \underline{\Delta G = \Delta E_{\text{redox}} - 2 E_{(T-S_0)}}$$

Le deuxième terme de l'équation de REHM et WELLER prend en compte la formation du complexe de transfert de charge (17).

Soit  $\Delta G \approx -0,8$  eV. Dans ces conditions la formation de la paire de radicaux ions à l'état triplet est énergétiquement possible. Ceci explique aussi l'absence de polarisations en solvant non polaire.

On peut également envisager selon ce processus, la formation d'un complexe de transfert de charge à l'état singulet. Celui-ci par dissociation donnerait une molécule de porphyrine dans l'état singulet (cf. chap. II).



Toutefois un transfert électronique entre cette molécule excitée et une autre à l'état fondamental est défavorable d'un point de vue énergétique. En effet, l'état singulet de ces molécules est inférieur à 2 eV (1,83 eV et 1,92 eV pour la TMePyPH<sub>2</sub> et la TPPSH<sub>2</sub> (26));  $\Delta G$  serait donc positif.

Ces considérations énergétiques rejoignent différents travaux concernant la photooxydation ou la photoréduction des porphyrines (cf. chap. II). Ceux-ci ont montré que c'est l'état triplet de ces produits qui est responsable de leur photoactivité.

La différence de comportement entre les dérivés cationique et anionique en milieu acide s'expliquerait par le fait que le  $\text{TPPSH}_2$  dimérise en solution aqueuse (27) et que dans ces conditions les signaux de C.I.D.N.P. pour ce composé sont fortement affectés. L'état excité triplet de ce composé serait désactivé par le processus suivant :



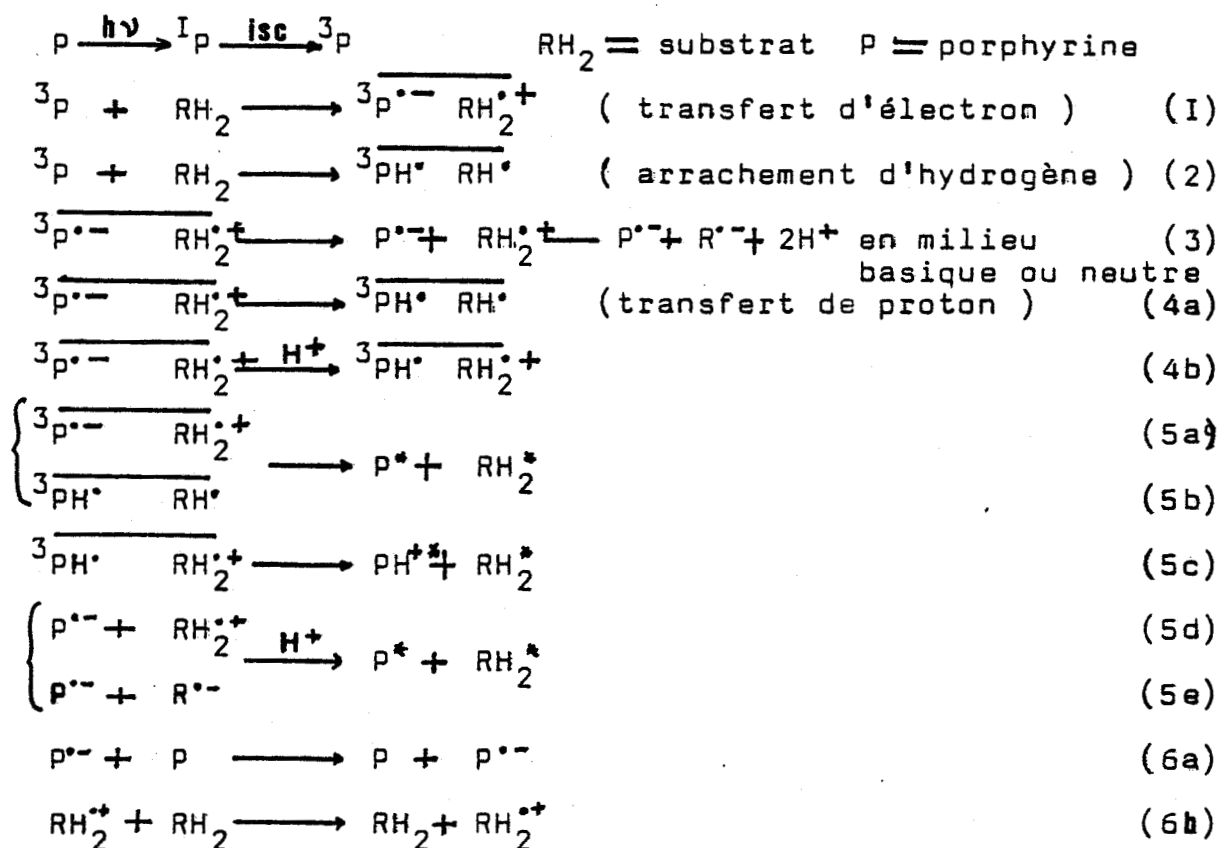
Un phénomène analogue serait également responsable de l'absence de polarisations sur le dérivé de l'hématoporphyrine et ses constituants (5a-b).

## 2) Interaction porphyrines/agents électro-donneurs :

Dans nos conditions expérimentales nous observons des polarisations intenses sur différents substrats lorsqu'ils sont irradiés en présence de porphyrine. Ces polarisations disparaissent après irradiation. Ces résultats suggèrent la possibilité d'un transfert de charge hautement réversible entre la porphyrine et le substrat.

Les travaux de CLOSS et MARUYAMA (cf. chap II) sur des systèmes analogues ont conduit ceux-ci à envisager l'hypothèse d'un double mécanisme faisant intervenir comme étape initiale le transfert d'électron ou l'arrachement d'hydrogène. SEALY (2á) a mis en évidence par RPE, la formation du radical-anion de la porphyrine et des radicaux-anions des différents agents réducteurs lors d'une irradiation en solution aqueuse.

Ces considérations nous amènent à proposer le schéma réactionnel suivant :



La polarisation de spin nucléaire (notée \*) est créée par recombinaison des radicaux au sein de la paire (éq. 5a-c) ou par rencontre diffusive de ceux-ci (éq. 5d-e). Toutefois cette dernière contribution est atténuée par des phénomènes de relaxation (21).



Plusieurs arguments permettent de confirmer les différentes étapes de ce schéma réactionnel.

La formation du radical-cation de la paraphénylène-diamine a été observée en RPE par SEALY (2a) lors de l'irradiation de Hp. Par C.I.D.N.P. ROTH (28) a également démontré que dans le cas du système porphyrine-hydroquinone, la paire était formée de radicaux-ions.

Le fait que nous observons un léger élargissement des raies en milieu basique sur le substrat provient de réactions d'échanges (éq. 6a-b) (la déprotonation est facilitée en milieu basique éq. 3). Ceci confirme la formation d'une paire de radicaux-ions (28).

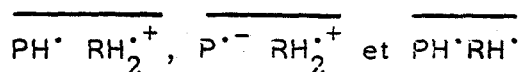
En milieu acide l'intensité des polarisations augmente sur le substrat. Ceci laisse suggérer qu'en plus du transfert d'électron initial viennent se superposer d'autres mécanismes tels que : l'arrachement d'hydrogène (éq. 2), le transfert de proton au sein de la paire (éq. 4a) ou la protonation du radical anion en milieu acide (éq. 4b). Ces différentes voies réactives donnent naissance à des polarisations de mêmes signes sur le substrat (cf. discussion sur l'application des règles de KAPTEIN).

Cependant pour expliquer ce phénomène, MARUYAMA (29) et UEDA (10) ont proposé la formation d'un complexe de transfert de charge porphyrine-substrat en milieu acide.

Dans ces conditions, si ce complexe existe en solution nous devrions obtenir selon UEDA (10) une variation importante des polarisations en milieu neutre suivant la longueur d'onde d'excitation. Or nous obtenons pratiquement les mêmes intensités de polarisation à 400 et 600 nm. De plus dans le cas éventuel de la formation de ce complexe, nous devrions l'observer par R.M.N., ce qui n'est pas le cas même pour des temps d'irradiation de l'ordre de 10 min. Enfin selon MATAGA (30), un milieu polaire tel que l'eau défavorise la formation d'un complexe de transfert de charge et favorise la formation des radicaux-ions par dissociation du complexe. La variation de coloration de la solution (passage du rouge pourpre au brun), que nous observons pendant irradiation, indique une protonation de la porphyrine. En effet, la base libre et le diacide conjugué de ces porphyrines ont respectivement une coloration rouge pourpre et verte en solution aqueuse (31). Ce résultat ainsi que la baisse de pD notée au cours de l'irradiation plaident en faveur d'une réaction telle que 5c (polarisation d'une espèce  $\text{PH}^{+*}$ ).

Appliquons à présent la règle de Kaptein concernant l'effet net (cf. chap. 1) à ce schéma réactionnel.

Considérons par exemple la nature de la polarisation dans le cas particulier de la para-phénylènediamine (cf. Tableau III-1). Les paires radicalaires qui sont formées entre ce substrat et la porphyrine sont de trois natures différentes :



Le radical-anion des porphyrines possède des valeurs de  $g$  inférieures à 2,003 (2,0022 pour l'hématoporphyrine (2a); 2,0027 pour la tétraphénylporphyrine (34)). Les données RPE (35) sur les radicaux cations de différentes porphyrines montrent également que les valeurs des facteurs  $g$  sont inférieures à 2,003. Les radicaux neutres des porphyrines sont peu décrits dans la littérature.

HAREL et al. (36) proposent pour le radical neutre de la tétraphénylporphyrine une valeur de  $g$  de 2,0024. Généralement cette valeur est comprise entre celles des radicaux cation et anion. On peut donc estimer que le radical neutre de Hp aura également une valeur du facteur  $g$  inférieure à 2,003. Celui du radical-cation de la paraphénylène-diamine est plus élevé :  $g = 2,0031$ ; par suite  $\Delta g > 0$

- la réaction étant réversible, l'origine des polarisations se fait à partir d'une réaction de recombinaison au sein de la cage ( $\epsilon > 0$ )
- la constante de couplage hyperfin est négative ( $a_H < 0$ ) (cf. Tableau III-3) d'où  $\Gamma = \mu \cdot \epsilon \cdot \Delta g \cdot a_H = - (E)$ , cette relation permet de rendre compte de la valeur de  $\mu$  :  $\underline{\mu > 0}$ .

Nous en déduisons donc que l'état précurseur de la paire est un état triplet. Ce résultat est confirmé par d'autres travaux (2a,15,16) qui montrent que c'est l'état triplet des porphyrines qui est responsable de leur photoréactivité. ROTH et al. (28) ont également pu démontrer par C.I.D.N.P. que seul l'état triplet de l'octaéthylporphyrine pouvait induire la formation de paires radicalaires en présence d'hydroquinone. L'interaction de l'état singulet de cette porphyrine avec ces substrats résulterait selon ces auteurs en une dissipation d'énergie n'incluant pas la formation de paires d'ions ayant une durée de vie suffisamment longue pour être détectée par C.I.D.N.P.

Si l'on se réfère aux valeurs des facteurs  $g$  et des constantes

de couplage des différents substrats qui sont indiquées dans le tableau III-3, on vérifie que les polarisations observées sont en accord avec la règle de Kaptein pour l'effet net, dans tous les cas de formation des paires proposées ( $\text{PH}^\bullet \text{RH}^\bullet$ ,  $\text{P}^{\bullet-} \text{RH}_2^{\bullet+}$ ,  $\text{PH}^\bullet \text{RH}_2^{\bullet+}$ ).

Il est difficile de se prononcer sur l'interprétation des polarisations obtenues sur les porphyrines car celles-ci sont trop faibles. De faibles valeurs des constantes de couplage hyperfin (3b) peuvent expliquer ce résultat. Peu de données dans la littérature concernent les valeurs de constantes de couplage hyperfin des radicaux-ions des porphyrines. Toutefois FELTON (35) a pu, par des calculs (SCF-MO), déterminer les densités de spin des différents carbones dans le radical-anion des porphyrines (fig. III-14). Selon cet auteur les carbones méso ainsi que les carbones situés en position 7, 12 et 18 ont une densité électronique de spin positive. Les constantes de couplage hyperfin des atomes d'hydrogène portés par les carbones 5, 10, 15, 20 seront donc négatives. Dans le cas des groupements méthyles portés par les carbones 7, 12 et 18 on peut s'attendre à ce que les protons méthyliques aient des constantes de couplage hyperfin positives. La règle de Kaptein pour l'effet net appliquée dans ce cas à ces différents protons confirme les polarisations observées sur Hp.

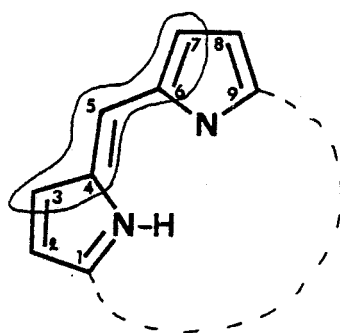
Ce résultat est confirmé par le fait que MARUYAMA et al. (3f) ont observé des polarisations identiques sur "l'octyl porphyrine" lors de l'irradiation de ce composé en présence p-méthoxyphénol dans le benzène grâce à l'apport d'une technique plus fine : la C.I.D.N.P. résolue dans le temps. Cette dernière permet de s'affranchir des réactions d'échange et de dismutation (cf chap. 1) qui pendant une irradiation continue affectent fortement l'intensité des polarisations (22b). Par contre, en milieu acide, les porphyrines hydrosolubles montrent des polarisations beaucoup plus intenses que celles de l'Hp en présence de ces substrats. Ce résultat peut s'expliquer par une délocalisation différente du nuage électronique dans les radicaux de ces porphyrines qui va entre autre modifier les valeurs des constantes de couplage hyperfin. Nous proposerons une explication plus approfondie de cet effet dans le chapitre suivant.

L'absence de polarisations sur les dérivés soufrés s'explique par le fait que le transfert électronique n'est pas envisageable d'un point de vue énergétique. Par contre, le potentiel d'oxydation des autres agents électrodonneurs est suffisamment bas pour que le transfert d'électron soit réalisable (37). Les potentiels de réduction de Hp et de PP sont respectivement de -1.33V et de -1,25 V par rapport à l'électrode au calomel saturé dans le chlorure de méthylène (38). Ces valeurs sont inférieures dans l'eau à 0,2 V par comparaison avec des résultats électrochimiques concernant la TPP (39).

	RADICAL ANION	RADICAL NEUTRE	RADICAL CATION
CATECHOL	$a(H_{3,6}) = -0,75$ $a(H_{4,5}) = -3,75$ $g = 2,0045$ (43)	$a(H_3) = +1,2$ $a(H_5) = -1,2$ $a(H_4) = -7$ $a(H_6) = -3$ $g = 2,0043$ (43)	$a(H_{3,6}) = +0,25$ $a(H_{4,5}) = -4,85$ $g = 2,00355$ (43)
DOPA			/
PYROGALLOL	$a(H_3) = +0,95$ $a(H_4) = -5,5$ (65) $a(H_5) = -0,95$ $g = 2,0045$	$a(H_3) = -1,5$ $a(H_4) = -7,9$ (66) $a(H_5) = -1,5$ $g = 2,00454$	$a(H_3) = -1$ $a(H_4) = -7$ (66) $a(H_5) = -1$ $g = 2,0036$
HYDROQUINONE	$a(H_o) = -2,37$ $a(H_m) = -2,37$ (43) $g = 2,00455$	$a(H_o) = -5,05$ $a(H_m) = +0,35$ (43) $g = 2,0043$	$a(H_o) = -2,25$ $a(H_m) = -2,25$ (43) $g = 2,0035$ ou $2,0031$
ACIDE ASCORBIQUE			/
P-PHENYLENEDIAMINE			$a(H) = -2,11$ (67) $g = 2,0031$ (2a)

Tableau III-3:

Facteurs de Landé (g) et constantes de couplages hyperfin (a) des agents électro-donneurs.



	$\varphi$
C <sub>3</sub>	-0,001
C <sub>4</sub>	0,014
C <sub>5</sub>	0,083
C <sub>6</sub>	0,063
C <sub>7</sub>	0,066

Figure III-14 :

Densité de spin électronique ( $\varphi$ ) des atomes de carbone du radical anion de la porphyrine selon FELTON (35).

Le potentiel d'oxydation de la cystéine (Cys) dans l'eau est supérieur à 1 V (40).

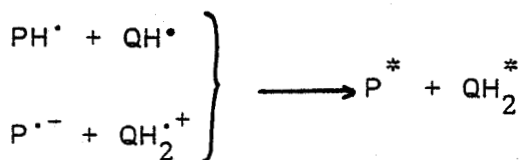
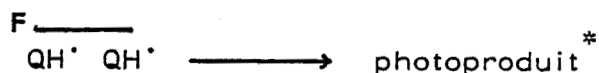
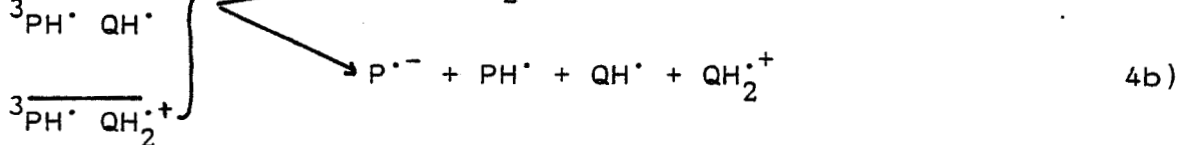
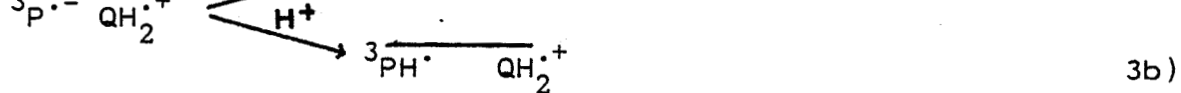
Selon REHM et WELLER (cf. chap II), on peut estimer l'énergie libre de la paire  ${}^3\text{PP}^{\cdot-} \text{Cys}^{\cdot+}$  par l'équation suivante :

$$\Delta G' = E^{\text{ox}}(\text{Cys}) - E^{\text{red}}(\text{PP}) - \frac{e^2}{\epsilon r}$$

On admet généralement que la valeur moyenne de  $\frac{e^2}{\epsilon r}$  en solution est de 7 Å. Ainsi dans l'eau le terme coulombien  $\frac{e^2}{\epsilon r}$  est estimé à 0,03 eV. Dans ces conditions, l'énergie de cette paire est supérieure à 46,6 kcal/mole. Le niveau d'énergie de l'état triplet de PP étant de 35,9 kcal/mole (41) le transfert d'électron est thermodynamiquement impossible dans ce cas. Il en sera de même pour le glutathion dont le potentiel d'oxydation doit être sensiblement le même que celui de la cystéine.

On peut également envisager un arrachement d'hydrogène entre ces substrats et la porphyrine. Toutefois lors de l'irradiation du glutathion en présence d'hématoporphyrine, SEALY (2a) n'a pu observer par R.P.E. le radical neutre ( $\text{RS}^{\cdot}$ ) en solution. Ceci laisse supposer que si il y a formation de cette espèce, elle possède un temps de relaxation trop court pour être détecté par R.P.E. De même, il n'existe aucun exemple dans la littérature concernant des effets de C.I.D.N.P. induits par des radicaux  $\text{RS}^{\cdot}$ . On peut supposer que cette espèce ne puisse être retenue dans des processus de paires radicalaires conduisant à des effets de C.I.D.N.P. du fait de ses temps de relaxation excessivement courts. Cette raison fut également avancée par KAPTEIN (1) dans le cas de radicaux alcoxy ( $\text{RO}^{\cdot}$ ).

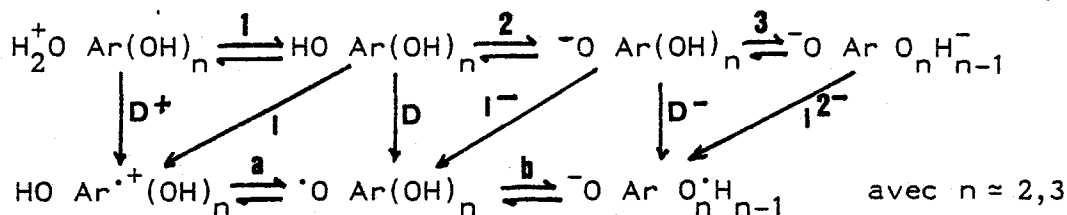
Enfin, considérons le cas particulier de l'hydroquinone ( $\text{H}_2\text{Q}$ ) pour lequel nous avons observé des polarisations provenant de la benzoquinone et de photoproduits. Par analogie avec les travaux de MARUYAMA et al. (42) on peut attribuer leur formation à des réactions de recombinaison et de dismutation des radicaux neutres  $\text{HQ}^{\cdot}$ ; nous aurions alors le mécanisme suivant :



Nous n'avons pas pu déterminer la structure du photoproduit obtenu au cours de ces réactions car celui-ci n'a pu être isolé vu les faibles quantités de produits utilisés en C.I.D.N.P. La formule de ce photoproduit pourrait correspondre à celle proposée par MARUYAMA et al. (42) : le trihydroxy-2,4',5 diphényléther.

Les effets de C.I.D.N.P. observés sur les agents électro-donneurs dépendent du pD de la solution. Nous avons démontré que ceux-ci pouvaient être dûs à la formation de différentes paires radicalaires. Il est difficile de se prononcer a priori sur la contribution aux polarisations induites par ces différentes paires. Toutefois on peut rendre compte de la stabilité d'une espèce radicalaire par rapport à une autre en comparant les différents couples acido-basiques de celles-ci (43).

Dans le cas des dérivés quinoniques du type  $\text{HOAr}(\text{OH})_n$  on peut écrire les équilibres suivants :



L'énergie libre qui correspond à chaque équilibre ou réaction peut être reliée au pK suivant la relation :

$$\Delta G(V) = 2,303 RT \text{ pK}(V)$$

où V fait référence aux lettres et chiffres qui caractérisent chaque équilibre ou réaction.

On en déduit successivement :

- i)  $\text{pK}(1) - \text{pK}(D) = -\text{pK}(a)$
- ii)  $\text{pK}(I^-) - \text{pK}(D) = -\text{pK}(2)$
- iii)  $\text{pK}(D^-) - \text{pK}(I^-) = +\text{pK}(b)$

Les données de la littérature nous donnent accès aux différents pK des équilibres :

$$\text{pK}(1) < 0 \quad (\text{pK}_1 \approx -6,75 \text{ pour le phénol (43)})$$

$$\text{pK}(2) \approx 9-10 \quad (\text{pK}_2 \approx 9,85 \text{ pour l'hydroquinone (44)})$$

$$\text{pK}(3) > 11 \quad (\text{pK}_3 \approx 11,4 \text{ pour l'hydroquinone (44)})$$

$$\text{pK}(a) < 0 \quad (\text{pK}(a) = -1,6 \text{ et } -0,75 \text{ respectivement pour le catéchol et l'hydroquinone (43)})$$

$$\text{pK}(b) \approx 4-5 \quad (\text{pK}(b) = 4,3 \text{ pour l'hydroquinone (44)}).$$

A partir des relations exposées ci-dessus nous pouvons déduire d'un point de vue thermodynamique :

$$(i) \text{ pK}(I) \gg \text{pK}(D)$$

L'arrachement d'hydrogène est légèrement favorisé par rapport au transfert d'électron pour la molécule neutre.

$$(ii) \text{ pK}(I^-) \ll \text{pK}(D)$$



Le transfert d'électron est fortement favorisé pour le mono-anion par rapport à un arrachement d'hydrogène sur la molécule neutre.

(iii)  $pK(D^-) > pK(I^-)$

le transfert d'électron est favorisé par rapport à l'arrachement d'hydrogène pour le mono-anion.

Ces résultats suggèrent qu'en passant d'un milieu acide à un milieu neutre ou basique on va favoriser le transfert d'électron par rapport à l'arrachement d'hydrogène sur ces substrats. En milieu acide, les polarisations sur les substrats résultent de la somme de celles induite par les deux mécanismes cités ci-dessus. Au fur et à mesure que le pD de la solution augmente, l'intensité de ces polarisations s'atténue puisque la contribution aux effets de C.I.D.N.P. par un arrachement d'hydrogène diminue. De même, dans le cas de la para-phénylènediamine nous aurons une prépondérance d'un mécanisme par rapport à l'autre suivant le pD de la solution. Pour une valeur de pD supérieure au  $pK(1)$  de ce produit ( $pK(1) \approx 4$  (43)) le transfert d'électron est favorisé. Dans le cas contraire, c'est l'arrachement d'hydrogène sur la monocation qui est le mécanisme prépondérant.

### 3) Interactions porphyrines/nucléobases :

Les résultats obtenus sur les nucléobases sont complémentaires de ceux obtenus par J. MARKO (1) lors d'une étude similaire avec les phénothiazines. En effet les bases pyrimidiques et l'adénine sont polarisées en présence de phénothiazines. Par contre la guanine ne montre pas de polarisation. Une réaction de transfert électronique de la phénothiazine vers les bases permet d'interpréter ce comportement. Ceci laisse supposer que dans le cas des porphyrines nous avons un transfert inverse : la guanine y joue le rôle de donneur, les porphyrines celui d'accepteur. La paire centrale serait donc formée des radicaux ions  $PH_2^{\bullet-}$  et  $G^{\bullet+}$ .

Plusieurs arguments permettent de justifier ce transfert électronique ainsi que les différentes observations expérimentales faites sur les bases. Dans nos conditions, nous n'observons que des polarisations sur la guanine (G). Les porphyrines, indépendamment de leur photoréactivité dans l'eau ne montrent pas d'effets de C.I.D.N.P. résultant de leur interaction avec G du moins pour des valeurs de pD

supérieures au  $pK_3$  des porphyrines. De plus aucun photoproduit n'est décelable. Ceci suggère que la réaction conduisant aux polarisations sur G doit être fortement réversible. Ces polarisations sont donc obtenues par recombinaison des radicaux au sein de la paire.

Le GMP ainsi que l'éthyl-9-guanine sont également polarisés en milieu basique. La position N-9 est la plus réactive pour les purines dans le cas d'un arrachement d'hydrogène (45); dans ces conditions l'arrachement d'un atome d'hydrogène n'est pas envisageable.

Si nous analysons les données fournies par les spectres de photo C.I.D.N.P.  $^{13}C$  on remarque que ce sont les carbones  $C_5$  et  $C_8$  de la guanine et du GMP qui sont polarisés. Des calculs théoriques de densité de spin (INDO) (46) prévoient que cette densité est la plus élevée pour les carbones  $C_5$ ,  $C_6$  et  $C_8$  dans le cas du radical-cation de la guanine ( $C_5$  (+ 28%);  $C_6$  (- 24%);  $C_8$  (+ 23%)). En ce qui concerne le radical-anion, celle-ci est essentiellement localisée sur  $C_4$ ,  $C_6$ ,  $C_8$  et  $C_2$  ( $C_4$  (+ 37%);  $C_6$  (+ 23 %);  $C_8$  (-21 %);  $C_2$  (+ 20%)) et elle n'est que de -8% sur  $C_5$ . De même la répartition dans le radical neutre est la suivante :  $C_4$  (+ 17%);  $C_8$  (+ 9%);  $C_6$  (- 9%);  $C_2$  (+ 8%);  $C_5$  (+ 2%). Puisque dans nos spectres de C.I.D.N.P.  $^{13}C$  les carbones  $C_8$  et  $C_5$  ont des polarisations de même signe et que le carbone  $C_5$  est très fortement polarisé on peut en conclure que l'espèce à l'origine de la polarisation de la guanine est son radical-cation. La guanine jouerait bien le rôle de donneur d'électron au cours de la réaction.

On peut également estimer l'énergie libre de formation de la paire de radicaux-ions  $PH_2^{\cdot-} G^{\cdot+}$  par l'intermédiaire de l'équation de REHM et WELLER.

Dans ce cas :

$$\Delta G = E_{\frac{1}{2}}^{ox}(G) - E_{\frac{1}{2}}^{red}(PH_2) - \frac{e^2}{\epsilon r} - E_{(T_1 - S_0)}$$

En première approximation nous allons considérer que le potentiel de réduction de la porphyrine est indépendant du pD. Une étude plus approfondie du caractère énergétique de la réaction sera proposée plus loin. Cette hypothèse ne modifie pas les constatations que nous allons faire.

Sur les tableaux III-4 et III-5, sont représentés les potentiels rédox des différents couples  $PH_2/PH_2^{\cdot-}$  et  $B^{\cdot+}/B$ .

$E_{\text{RED}}(P/P)$ $\equiv$ $E_{1/2}^{\text{RED}}(P)$ en eV	$E_{\text{OX}}(B/B^{*+})$ $\equiv$ $E_{1/2}^{\text{OX}}(G)$ en eV	$E(T_1 - S_0)$ en eV	$\frac{e^2}{\epsilon r}$ en eV	pH <sup>a</sup> calculé	pH <sup>b</sup> mesuré
$\text{TMR}_y\text{PH}_2^{4+}, 4\text{Cl}^-$ - 0,55 <sup>c</sup>	1,12 - 0,06 pH <sup>d</sup> (pour $0 < \text{pH} \ll 12$ )	≈ 1,44	0,03 (DANS L'EAU)	> 3,1	≈ 4
$\text{TAPPH}_2^{4+}, 4\text{Cl}^-$ - 0,67 <sup>c</sup>					
$\text{TPPSH}_2^{4-}, 4\text{Na}^+$ - 1,09 <sup>c</sup>					



Tableau III-4:

- a) pH à partir duquel l'enthalpie libre de formation de la paire de radicaux ions (AG) devient négative.  
 b) pH expérimental à partir duquel nous observons des polarisations sur la guanine.  
 c) D'après RFX.WILLIAMS et P.HAMBRIGHT dans Bioinorg.Chem 9,537(1978)  
 d) D'après G.DRYHURST dans Topics in current chemistry 34,53(1972)

	$E_{(D/D^+)}$ $=$ $E_{1/2}^{ox}(G)$ en eV	$\Delta G'$ calculé en eV
GUANINE	0,81 <sup>a</sup> (pH=4)	- 0,095
ADENINE	1,04 <sup>a</sup> (pH=4)	0,135
CYTOSINE	1,24 <sup>b</sup>	0,335
THYMINE	1,80 <sup>b</sup>	0,895



Tableau III-5:

Valeurs calculées du  $\Delta G'$  pour les nucléobases à partir de l'équation de REHM et WELLER.

a) Potentiels d'oxydation d'après G.DRYHURST dans Topics in current chemistry 34,52(1972).

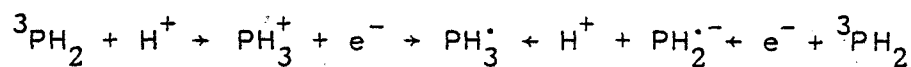
b) Potentiels d'oxydation calculés à partir du potentiel d'ionisation de ces produits: d'après N.S.HUSH, A.S.CHEUNG Chem.Phys.Lett.34, II(1975) et L.L.MILLER, G.D.NORD-BLOM, E.A.MAYEDA J.Org.Chem.37,916(1972).

Avec les bases pyrimidiques et l'adénine, il n'y a pas de réaction car leur potentiel d'oxydation est trop élevé ( $\Delta G > 0$ ). Ce qui confirme l'absence de polarisation sur ces produits par photo C.I.D.N.P.

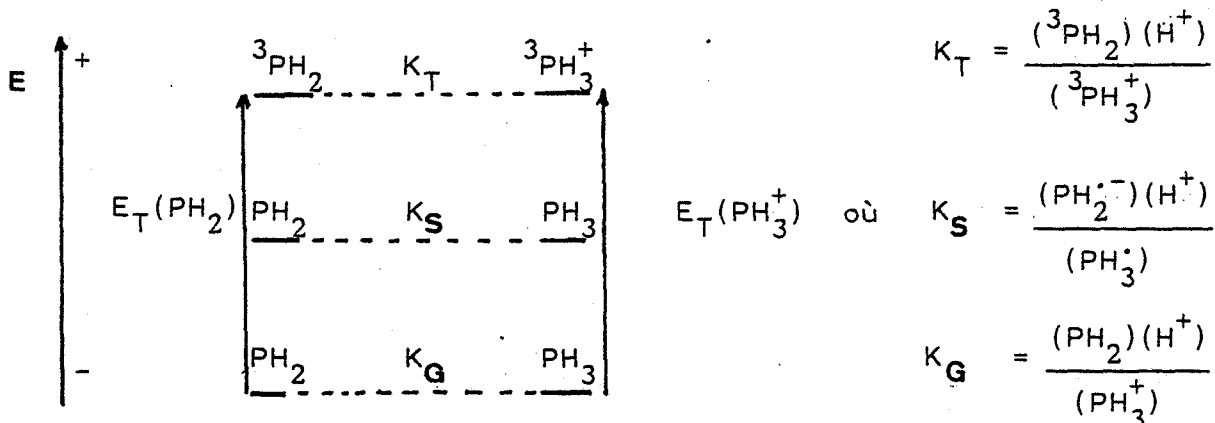
Par contre dans le cas de la guanine la réaction devient thermodynamiquement possible. Le potentiel d'oxydation de ce composé dépend du pD (Tableau III-4). On peut alors calculer le pD à partir duquel  $\Delta G$  devient négatif pour chaque porphyrine. Comme le montre le tableau III-4 il existe une bonne corrélation entre les résultats théoriques obtenus par la relation de REHM et WELLER et les résultats expérimentaux indiquant le domaine de pD pour lequel les polarisations sont effectivement observées.

Toutefois à ce stade, il est nécessaire de tenir compte de l'influence du pD sur le potentiel de réduction de la porphyrine. Le potentiel rédox de l'état excité triplet de  $PH_2$  n'est pas le même que celui de l'état fondamental. La différence de réactivité entre milieu acide et milieu basique suggère que les formes acide et basique de l'état triplet des porphyrines ont des potentiels de réduction différents.

En effet considérons le système d'équations rédox suivant qui met en évidence les différentes voies de formations de l'espèce  $PH_3^{\bullet}$  :



On peut déduire les relations (1) et (2) du schéma énergétique suivant :



$$E_T(PH_3^+) = E_T(PH_2) + 2,3 \times \frac{RT}{F} (pK_G - pK_T) \quad (1)$$

$$E_{\frac{1}{2}}^{\circ}(PH_3^+/PH_3^{\bullet}) = E_{\frac{1}{2}}^{\circ}(PH_2/PH_2^{\bullet-}) + 2,3 \times \frac{RT}{F} (pK_S - pK_G) \quad (2)$$

Ainsi en présence d'un donneur d'électron (R) possédant un potentiel d'oxydation indépendant du pD on peut rendre compte de la différence de réactivité des espèces acide et basique de la porphyrine dans l'état triplet.

En effet :

$$\Delta G_{\text{acide}} = E_{\frac{1}{2}}^{\text{ox}} (\text{R}^{\cdot+} / \text{R}) - E_{\frac{1}{2}}^{\text{red}} (\text{PH}_3^+ / \text{PH}_3) - E_T(\text{PH}_3^+)$$

$$\Delta G_{\text{basique}} = E_{\frac{1}{2}}^{\text{ox}} (\text{R}^{\cdot+} / \text{R}) - E_{\frac{1}{2}}^{\text{red}} (\text{PH}_2 / \text{PH}_2^{\cdot-}) - E_T(\text{PH}_2) - \frac{e^2}{\epsilon r}$$

Le terme coulombien est nul dans la première expression, compte tenu de la charge positive portée par la porphyrine (47).

Par suite :

$$\underline{\Delta G_a - \Delta G_b = 0,059 (pK_T - pK_S) + \frac{e^2}{\epsilon r}}$$

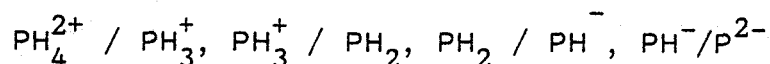
or  $\Delta pK = pK_T - pK_S \approx -4(20)$  et  $\frac{e^2}{\epsilon r} \approx 0,03 \text{ eV}$  (valeur calculée dans l'eau)

d'où  $\Delta G_a - \Delta G_b \approx -4,7 \text{ kcal/mole.}$

Cette différence indique que le transfert d'électron sera plus facile en milieu acide. Ce résultat est en accord avec d'autres travaux (48-49) qui montrent que c'est la molécule protonée dans son état excité qui est la plus réactive.

Toutefois, si l'on considère le domaine de pD pour lequel nous observons des polarisations, il faut normalement tenir compte de tous les couples acido-basique de la porphyrine.

Rappelons que la porphyrine ( $\text{PH}_2$ ) possède quatre couples acido-basiques :



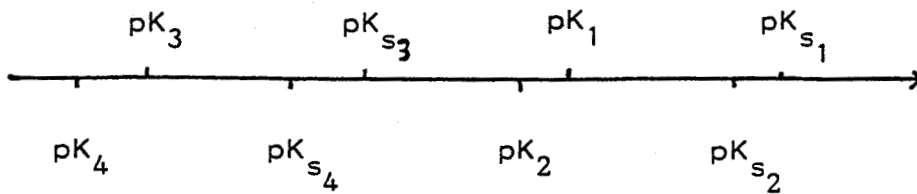
auxquels correspondent quatre pK ( $pK_i = -\log \frac{(\text{PH}_{i-1})^{(i-3)+} (\text{H}^+)}{(\text{PH}_i)^{(i-2)+}$ )

La différence entre le pK à l'état fondamental ( $pK_G$ ) et de l'état triplet ( $pK_T$ ) est relativement faible en ce qui concerne le couple  $\text{PH}_3^+ / \text{PH}_2$  ( $\Delta pK = pK_T - pK_G \approx -0,1$  (50)). En première approximation nous allons négliger la

différence et considérer que  $pK_T \approx pK$  pour tous ces couples.

Les formes réduites de ces espèces ( $pK_S$ ) possèdent également un  $pK$  qui est généralement plus élevé (20) que celui des formes oxydées ( $\Delta pK \approx pK_G - pK_S \approx 4$ ). Les espèces protonées  $PH_2$  et  $PH_3^+$  ont des  $pK$  très voisins (51)  $pK_4 - pK_3 \approx 0,2$ . Il en va de même pour les espèces  $PH^-$  et  $P^{2-}$ . Par contre la différence de  $pK$  entre les couples  $PH^{3+}/PH_2$  et  $PH_2/PH^-$  est relativement importante  $\Delta pK \approx 9$  (52).

Sur ces considérations on peut proposer l'échelle relative suivante pour les  $pK$  des différentes espèces.



Considérons à présent le potentiel de réduction du couple  $PH_2/PH_2^{\bullet -}$  :

$$E = E^\circ (PH_2 / PH_2^{\bullet -}) + \frac{RT}{F} \log \frac{(PH_2)}{(PH_2^{\bullet -})}$$

Dans le milieu nous pouvons écrire globalement :

$$(ox)_0 = (PH_2) + (PH_3^+) + (PH_4^{2+}) + (P^{2-}) + (PH^-)$$

soit

$$PH_2 = (ox)_0 \frac{K_4 K_3 (H^+)^2}{(H^+)^4 + K_4 (H^+)^3 + K_4 K_3 (H^+)^2 + K_4 K_3 K_2 (H^+) + K_1 K_2 K_3 K_4}$$

De même :  $(red)_0 = (PH_2^{\bullet -}) + (PH_3^{\bullet -}) + (PH_4^{\bullet +}) + (P^{\bullet 3-}) + (PH^{\bullet 2-})$

$$K_{s4} K_{s3} (H^+)^2$$

soit  $(PH_2^{\bullet -}) = (red)_0$

$$\frac{K_{s4} K_{s3} (H^+)^2}{(H^+)^4 + K_{s4} (H^+)^3 + K_{s4} K_{s3} (H^+)^2 + K_{s4} K_{s3} K_{s2} (H^+) + K_{s1} K_{s2} K_{s3} K_{s4}}$$

Dans ces conditions :

$$E = E_{\frac{1}{2}}^\circ (PH_2 / PH_2^{\bullet -}) + \frac{RT}{F} \log \frac{(Ox)_0}{(red)_0} + \frac{RT}{F} \log \frac{K_4 K_3}{K_{s4} K_{s3}} + A$$

$$A = \frac{RT}{F} \log \frac{(H^+)^4 + Ks_4(H^+)^3 + Ks_4Ks_3(H^+)^2 + Ks_4Ks_3Ks_2(H^+) + Ks_4Ks_3Ks_2Ks_1}{(H^+)^4 + K_4(H^+)^3 + K_4K_3(H^+)^2 + K_4K_3K_2(H^+) + K_4K_3K_2K_1}$$

Au potentiel de demi-vague on a  $\log \frac{(ox)_o}{(red)_o} = 0$

Si l'on se place alors dans des domaines particuliers de pH nous pouvons écrire successivement :

$$pH \ll pK_4$$

$$E = E_{\frac{1}{2}}^{\circ} (PH_2/P\dot{H}_2^{\cdot-}) + 0,059 (pKs_4 + pKs_3 - pK_4 + pK_3)$$

$$pK_4 \ll pH \ll pK_3$$

$$E = E_{\frac{1}{2}}^{\circ} (PH_2/P\dot{H}_2^{\cdot-}) + 0,059 (pKs_4 + pKs_3 - pK_3) - 0,059 pH$$

$$pK_3 \ll pH \ll pKs_4$$

$$E = E_{\frac{1}{2}}^{\circ} (PH_2/P\dot{H}_2^{\cdot-}) + 0,059 (pKs_4 + pKs_3) - 0,118 pH$$

$$pKs_4 \ll pH \ll pKs_3$$

$$E = E_{\frac{1}{2}}^{\circ} (PH_2/P\dot{H}_2^{\cdot-}) + 0,059 pKs_4 - 0,059 pH$$

$$pKs_3 \ll pH \ll pK_2$$

$$E = E_{\frac{1}{2}}^{\circ} (PH_2/P\dot{H}_2^{\cdot-})$$

$$pK_2 \ll pH \ll pK_1$$

$$E = E_{\frac{1}{2}}^{\circ} (PH_2/P\dot{H}_2^{\cdot-}) + 0,059 pK_2 - 0,059 pH$$

A partir de la connaissance des valeurs des pK (tableau III-6) des porphyrines et du potentiel de réduction  $E_{\frac{1}{2}}^{\circ} (PH_2/P\dot{H}_2^{\cdot-})$  (tableau III-4) nous pouvons calculer les potentiels de réduction de ces différentes espèces. De même nous pouvons remonter à la valeur du  $\Delta G$  de formation de la paire de radicaux-ions  $P^{\cdot-} G^{\cdot+}$ . Sur la figure III-15 sont représentées les variations du  $\Delta G$  de chaque paire en fonction du pH. On remarque également que les valeurs de pD pour lesquelles celui-ci est négatif, correspondent sensiblement aux domaines de pD pour lesquels nous obtenons des polarisations sur la guanine lorsque le pD est supérieur au  $pK_3$  de la porphyrine. Toutefois pour des valeurs de  $\Delta G$  supérieures à -4 kcal/mole,



	pK4	pK3
TMePyPH <sub>2</sub>	0,6 (a)	1,6 (a)
TAPPH <sub>2</sub>	3,4 (a) 2,7 (b)	3,6 (a) 2,9 (b)
TPPSH <sub>2</sub>	4,7 (a)	4,9 (a)

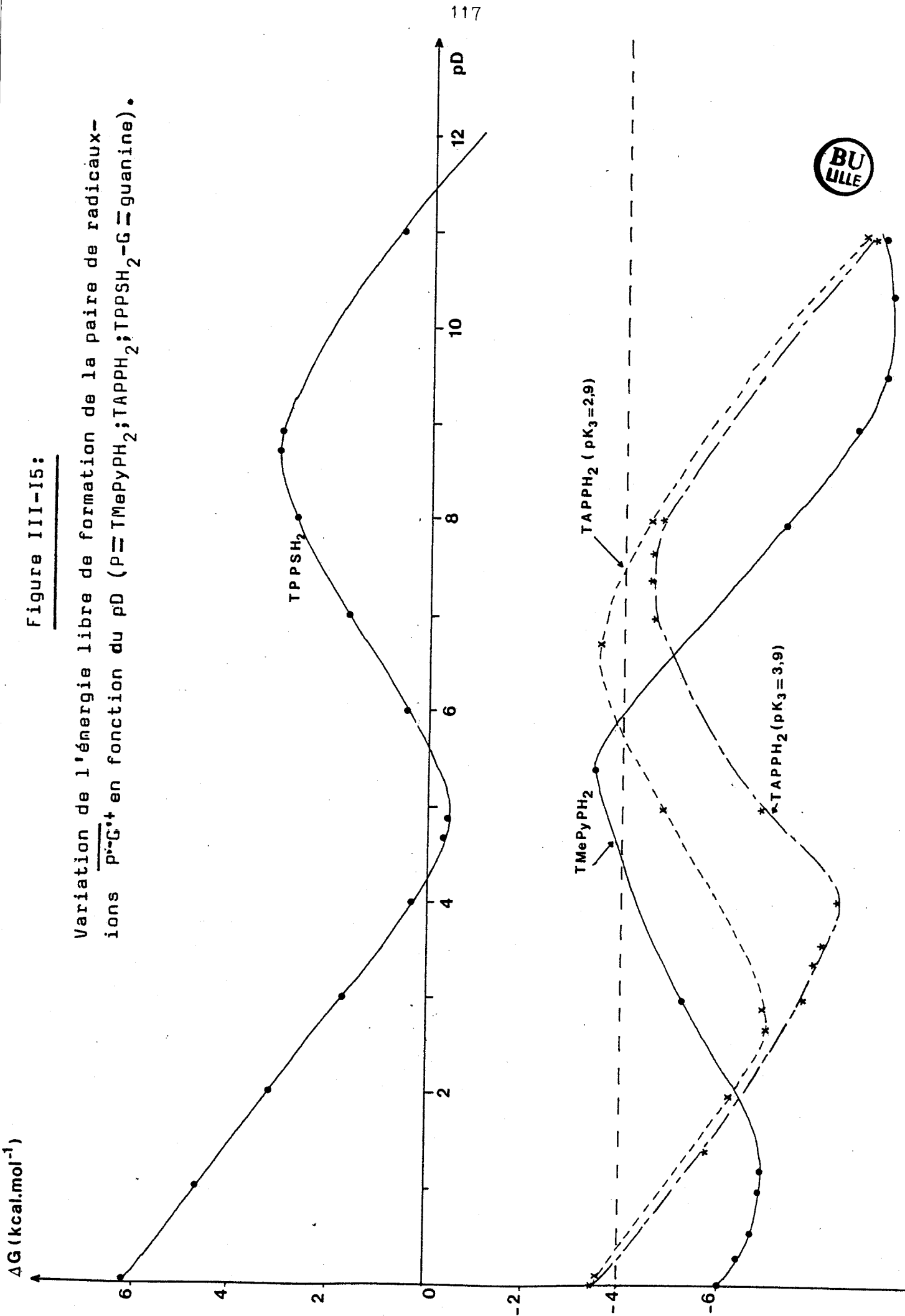


Tableau III-6:

Valeurs des différents pK des porphyrines synthétiques hydrosolubles.  
 a) D'après A.HARRIMAN, M.C.RICHOUX J.Photochem.27,205(1984).  
 b) D'après N.DATTA-GUPTA, D.MALAKAR, V.O.JONES, T.WRIGHT Chem.Lett. I659(1986).

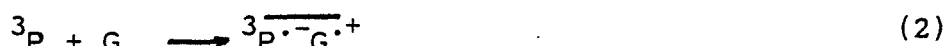
Figure III-15:

Variation de l'énergie libre de formation de la paire de radicaux-ions  $P^{\cdot-}G^{\cdot+}$  en fonction du pD ( $P \equiv TMePyPH_2; TPPSH_2; TAPPH_2-G \equiv$  guanine).



il est difficile de déterminer si le transfert d'électron est énergétiquement possible puisqu'il faut tenir compte de l'énergie libre d'activation de la réaction  $\Delta G_0$  (cette dernière n'est pas nulle pour  $\Delta G = 0$  et varie en fonction du pD et de la nature de la porphyrine (47)).

Ces différents arguments nous amènent à proposer le mécanisme suivant :



Un mécanisme analogue a été proposé par Kaptein (55) lors de l'étude du système Flavine/guanine. Dans ce cas, la guanine est polarisée en absorption exaltée du fait d'une différence de facteurs  $g$  négative ( $g_G < g_{\text{Flavine}}$ ). Une polarisation inverse sur ce produit, dans le cas de la photosensibilisation par les porphyrines confirme également la nature du transfert d'électron. Les polarisations qui proviennent de paires de fuites (éq. 5) sont atténuées par la relaxation (55). Par suite les effets de C.I.D.N.P. sont dûs essentiellement à la recombinaison au sein de la paire (éq. 3).

Enfin si l'on considère la règle de KAPTEIN pour l'effet net,

$$\Gamma_{ne} = \mu \cdot \epsilon \cdot \Delta g \cdot a_i$$

$\Gamma_{ne}$  est négatif puisque nous observons une polarisation en émission sur le proton  $H_8$  de la guanine

$\epsilon$  est positif parce que les polarisations proviennent d'une réaction de cage

$\Delta g$  est positif car le radical cation de la guanine possède un facteur  $g$  supérieur à celui du radical-anion de la porphyrine (les valeurs de  $g$  sont respectivement de 2,0039 (53) pour la guanine et 2,0027 (54) pour la porphyrine (par comparaison avec la TPP)).

$a_{H_8}$  est négatif dans le cas de la guanine. En effet les calculs INDO conduisent à une valeur positive pour le carbone  $C_8$ ; en conséquence le proton  $H_8$  aura une constante de couplage hyperfin négative (55).

En affectant dans l'équation ci-dessus les paramètres de leurs signes, nous obtenons une valeur positive pour  $\mu$ . La réaction se fait donc à partir de l'état triplet des porphyrines (généralement c'est l'état réactif des porphyrines).

Nous aboutissons également à la même conclusion dans le cas de l'application de cette règle aux polarisations observées sur les spectres de C.I.D.N.P.  $^{13}\text{C}$ .

$$\Gamma_{\text{neC}_5, \text{C}_8} = +; \Delta g = +; a_{\text{C}_5, \text{C}_8} = +; \epsilon = +; \text{ soit } \underline{\mu > 0}$$

La forte polarisation en absorption exaltée sur  $\text{C}_5$ , exclut la participation du radical neutre ainsi que celle du radical anion puisque dans ces deux cas  $a_{\text{C}_5} \ll a_{\text{C}_8} \approx a_{\text{C}_4} \approx a_{\text{C}_6} \approx a_{\text{C}_2}$ , ces trois derniers noyaux n'étant pas polarisés. Par contre elle confirme la participation du radical cation ( $a_{\text{C}_5} > a_{\text{C}_8} \gg 0$ ). Ce résultat est d'autant plus logique que c'est la guanine qui est la base la plus facilement oxydable (56).

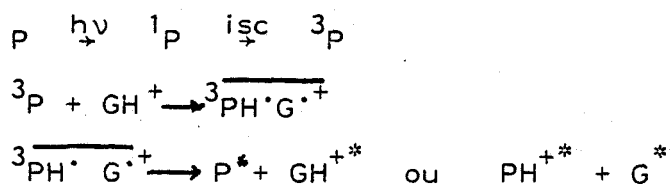
Dans le cas du GMP ou du GpC on peut également évoquer un mécanisme analogue. Le fait que la polarisation obtenue sur ces produits soit observée à partir de valeurs de pD plus élevée que dans le cas de la guanine s'explique effectivement par le fait que ces composés possèdent un potentiel d'oxydation plus élevé (12).

Par exemple :

$$[E^{\circ}_{\text{Guanosine}}(\text{V}) \approx 1,18 - 0,03 \text{ pH pour } 3 < \text{pH} < 12 \quad (57)]$$

Ainsi dans le cas de la  $\text{TMePyPH}_2$ ,  $\Delta G$  devient négatif pour un pD de 8,5 si l'on envisage un transfert d'électron avec la guanosine. Ce qui est en accord avec nos résultats expérimentaux.

Cependant la polarisation très intense observée sur la guanine en milieu très acide ( $\text{pD} < 2$ ) ne peut s'expliquer par l'étude énergétique effectuée ci-dessus. En conséquence, il faut admettre dans ce cas un mécanisme différent. Ce dernier ferait intervenir une réaction d'arrachement d'hydrogène, la guanine étant protonée à cette valeur de pD, et se trouvant donc sous la forme  $\text{GH}^+$ .



La nature de la polarisation observée sur la guanine (proton  $H_8$  en émission) est en effet compatible avec la formation du radical-cation de ce composé.

Les fortes polarisations observées sur la porphyrine à pD acide, semblent également confirmer la participation du radical  $PH^{\bullet}$  à la paire. Ce résultat est à rapprocher de l'étude effectuée dans la première partie de ce chapitre sur le système hématoporphyrine-donneur d'électron. Dans ce cas nous observons sur Hp en milieu acide de faibles polarisations qui provenaient soit d'une réaction d'arrachement d'hydrogène, soit à la formation de  $PH^{+\bullet}$ . Tandis qu'en milieu neutre ou basique celles-ci disparaissaient.

Considérons enfin les cas de Hp et HpD, qui provoquent des polarisations sur la guanine à des valeurs de pD très basique. Ce phénomène peut s'expliquer par les potentiels de réduction de ces produits plus élevés que celui de la TMePyPH<sub>2</sub> ( $E^{red}(P) \approx 1$  V. (38)). L'énergie libre de formation de la paire de radicaux-ions ne sera par conséquent négative qu'à partir des valeurs de pD plus élevées.

#### IV - CONCLUSION

L'étude par C.I.D.N.P.  $^1H$  et  $^{13}C$  de la photoréaction des porphyrines seules en solution ou en présence d'agents électro-donneurs a permis de mettre en évidence des réactions de transfert d'électron principalement ainsi que d'arrachement d'hydrogène dans certaines conditions particulières. C'est la première fois que des polarisations ont pu être observées par C.I.D.N.P.  $^1H$  sur des porphyrines quand celles-ci sont étudiées seules en solution et soumises à une irradiation lumineuse continue (58).

L'analogie entre les polarisations induites sur les agents électro-donneurs par l'HpD, l'Hp et la PP indique que le même mécanisme de transfert de charge intervient dans tous les cas. Les processus primaires à l'origine de la photoréactivité de ces produits paraissent donc identiques. Ceci laisse suggérer que ce n'est pas un constituant porphyrinique particulier de l'HpD qui réagit, mais que le transfert de charge est un phénomène général concernant le noyau tétrapyrrolique. Ces réactions font intervenir l'état excité triplet des porphyrines. Dans

le cas particulier où les porphyrines sont substituées en position  $\beta$ -pyrrolique, l'influence des effets inductifs des substituants au niveau de la charge des atomes d'azote centraux sera faible. Cette charge conditionne en effet la réactivité du cycle en terme de réaction photo-rédox (cf chap. II). Par conséquent on peut s'attendre à ce que ces porphyrines aient la même réactivité d'un point de vue radicalaire.

Nous avons également noté que ces réactions sont réversibles, sauf dans le cas particulier de l'hydroquinone, et qu'elles sont influencées par le pD de la réaction.

Il est intéressant de noter la réactivité de ces porphyrines vis-à-vis de la L-Dopa et du catéchol. En effet, ces composés sont des agents précurseurs de la synthèse *in vivo* de la mélanine et de ses dérivés et sont incorporés au sein de ces polymères. Certains travaux (59a-b) ont montré que la photodestruction de l'eumélanine et de la phéomélanine s'accompagnait de la formation de radicaux dérivant de la photooxydation de ces composés et de la réduction de l'oxygène moléculaire en ion superoxyde et eau oxygénée. MAGNUS (60) a mis en évidence le caractère phototoxique de l' $\alpha$ -métyldopa. Ces résultats ont abouti à démontrer la toxicité potentielle liée à la photodégradation de la mélanine. Dans ces conditions, il est intéressant de noter que la photosensibilisation de la peau qui intervient après traitement photochimiothérapeutique par les porphyrines peut être occasionnée par un mécanisme de photooxydation des dérivés de la Dopa qui constituent la mélanine. Les radicaux ainsi formés peuvent ensuite réagir avec les protéines (61).

En ce qui concerne l'étude par photo-C.I.D.N.P. du système porphyrines hydrosolubles/nucléobases nous avons également mis en évidence une réaction de transfert d'électron réversible dans laquelle la porphyrine joue le rôle d'accepteur. Cette réaction met ainsi en jeu le radical anion de la porphyrine et le radical cation de la guanine. Les autres bases ne réagissent pas par ce processus. Cette étude a également mis en valeur l'importance des processus photo-rédox qui vont gouverner d'un point de vue énergétique la direction du transfert d'électron. Les porphyrines cationiques (TMePyPH<sub>2</sub>, TAPP<sub>2</sub>) possèdent des potentiels de réduction plus bas que la TPPSH<sub>2</sub> ou Hp, et favoriseront en conséquence le transfert d'électron. Certains sensibilisateurs, sont connus pour provoquer des coupures sur l'ADN au niveau de la guanine.

Il a été démontré par exemple que la thiopyronine agissait dans ce sens par un mécanisme radicalaire faisant intervenir le radical cation de la guanine (62). En conséquence, on peut supposer que pour les porphyrines un mécanisme analogue à celui proposé dans notre étude soit à l'origine des effets observés sur l'ADN lors de sa photosensibilisation par ces dérivés. Dans une première étape, la porphyrine excitée dans l'état triplet réagit avec la guanine pour former une paire de radicaux-ions. Le radical cation de la guanine peut ensuite réagir suivant deux voies différentes : il peut soit être désactivé par une réaction de recombinaison, soit donner des produits de photoréactions au cours d'une réaction irréversible avec l'oxygène ou d'autres substrats présents dans le système. Bien que notre étude ait mis en évidence un transfert d'électron réversible entre porphyrine et guanine, il n'est pas exclu, étant donné la faible solubilité de la guanine en solution aqueuse, que celle-ci soit dégradée en solution et que les photoproduits ainsi formés ne soient pas détectés par R.M.N.. CADET et al. (63) ont pu déterminer les taux relatifs des photoproduits formés par des mécanismes type I et type II lors de la photooxydation de la di-o-acétyl-3',5' deoxy-2' guanosine par l'hématoporphyrine : ceux-ci sont respectivement de 53% (type I) et 47% (type II). Il n'est donc pas impossible que l'étape primaire conduisant à la formation des photoproduits par un mécanisme de type I soit un transfert d'électron analogue à celui que nous avons mis en évidence par C.I.D.N.P..

En milieu neutre, seules la TMePyPH<sub>2</sub> et la TAPPH<sub>2</sub> peuvent générer le radical cation de la guanine. La TPPSH<sub>2</sub>, l'Hp et l'HpD ne donnent pas de réaction de transfert d'électron avec la guanine dans ces conditions. Ceci est en accord avec les travaux de KAWANISHI et al. (64) qui excluent la possibilité d'une photooxydation de l'ADN par un mécanisme de transfert d'électron pour Hp en milieu neutre. En ce qui concerne les porphyrines cationiques, PRASEUTH et al. (70c) ont démontré que la TAPPH<sub>2</sub> photosensibilisait l'ADN plasmidien superenroulé (pBr 322) par un mécanisme de type II. Par contre dans le cas de la TMePyPH<sub>2</sub>, en présence d'un inhibiteur d'oxygène singulet (NaN<sub>3</sub>), ils observent quand même une photooxydation de l'ADN. Ceci suggère qu'en plus d'un mécanisme de type II, TMePyPH<sub>2</sub> peut également réagir par un mécanisme radicalaire. La différence de réactivité entre la TAPPH<sub>2</sub> et la TMePyPH<sub>2</sub> peut alors s'expliquer par le fait que seule la TMePyPH<sub>2</sub> est capable de s'intercaler au niveau des paires guanine-cytosine (8b). La proximité substrat-porphyrine favoriserait dans ces conditions le transfert électronique qui serait une étape préalable à la dégradation de la guanine.

**BIBLIOGRAPHIE**  
-----

- 1 - J. MARKO  
Thèse de doctorat ès-Sciences Physiques, Université de Lille I,  
chaps. III, IV (Mai 1986)
- 2 - a) C.C. FELIX, K. RESZKA et R.C. SEALY  
Photochem. Photobiol. 37, 487 (1983)  
b) K. RESZKA et R.C. SEALY  
Photochem. Photobiol. 39, 293 (1984)
- 3 - a) Y.V. GLAZKOV, A.G. ZHURAVLEV, A.M. SHUL'GA et L.A. KHILMANOVICH  
Zhu. Priklad. Spektr. 25, 133 (1976)  
b) A.G. ZHURAVLEV, A.M. SHUL'GA et G.P. GURINOVITCH  
Zhu. Priklad. Spektr. 29, 1062 (1978)  
c) K. MARUYAMA, H. FURUTA et T. OTSUKI  
Chem. Lett., 709 (1981)  
d) K. MARUYAMA et H. FURUTA  
Chem. Lett., 243 (1986)  
e) K. MARUYAMA et H. FURUTA  
Chem. Lett., 473 (1986)  
f) K. MARUYAMA et H. FURUTA  
Chem. Lett., 645 (1986)
- 4 - D. KESSEL  
Photochem. Photobiol. 36, 99 (1982)
- 5 - a) S.B. BROWN, M. SHILLOCK et P. JONES  
Biochem. J. 153, 279 (1976)  
b) T.J. DOUGHERTY, D.G. BOYLE, K.R. WEISHAUP  
B.A. HENDERSON, W.R. POTER, D.A. BELNIER et K.E. WITYK  
dans "Porphyrin photosensitization"  
Eds. D. KESSEL et T.J. DOUGHERTY, pp 3-13 Plenum Press, New-York (1983)
- 6 - K.T. DOUGLAS  
Chem. Ind. 20, 738 (1984)



- 7 - a) B. GUTTER, W.T. SPECK et H. ROSENKRANZ  
Biochim. Biophys. Acta 475, 307 (1977)
- b) R.J. FIEL, N. DATTA-GUPTA, E.H. MARK et J.C. HOWARD  
Cancer Res. 41, 3543 (1981)
- c) D. PRASEUTH, A. GAUDEMER, J.B. VERLHAC, I. KRALJIC,  
I. SISOEFF et E.G. VILLE  
Photochem. Photobiol. 44, 717 (1986)
- 8 - a) R. J. FIEL et B.R. MUNSON  
Nucl. Ac. Res. 8, 2825 (1980)
- b) R.F. PASTERNAK, A. ANTEBI, B. EHRLICH, D. SIDNEY  
E.J. GIBBS, S.L. BASSNER et L.M. DEPOY  
J. Mol. Catal. 23, 235 (1984)
- 9 - K. KOBAYASHI et T. ITO  
Photochem. Photobiol. 25, 385 (1977)
- 10 - T. UEDA, A. TANAKA, M. IGARASHI et H. HARADA  
Spectrochim. Acta 42A, 209 (1986)
- 11 - K. MARUYAMA, M. FURUTA, A. OSUKA  
Chem. Lett., 475 (1986)
- 12 - S.V. JOVANOVIC et M.G. SIMIC  
J. Phys. Chem. 90, 974 (1986)
- 13 - a) L.G. PURNELL et D.J. HODGSON  
Org. Magn. Res. 10, 1 (1977)
- b) D.E. DORMAN et J.D. ROBERTS  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 65, 19 (1970)
- 14 - R.F. PASTERNAK, E.J. GIBBS, A. GAUDEMER, A. ANTEBI, S. BASSNER,  
L. DE POY, D.H. TURNER, A. WILLIAMS, F. LAPLACE, M.H. LANSARD,  
C. MERIENNE et N. PERREE-FAUVET  
J. Am. Chem. Soc. 107, 8179 (1985)
- 15 - G. CAUZZO, G. GENNARI, G. JORI et J.D. SPIKES  
Photochem. Photobiol. 25, 389 (1977)
- 16 - R. BONNET, C. LAMBERT, E.J. LAND, P.A. SCOURIDES, R.S. SINCLAIR  
et T.G. TRUSCOTT  
Photochem. Photobiol. 38, 1 (1983)

- 17 - J.F. SMALLEY, S.W. FELDBERG et B.S. BRUNTSCHWIG  
J. Phys. Chem. 87, 1757 (1983)
- 18 - S.G. BALLARD et D.C. MAUZERALL  
J. Phys. Chem. 72, 933 (1980)
- 19 - H.D. ROTH, M.L.M. SCHILLING, T. MUKAI et T. MIYASHI  
Tetrahedron Lett. 24, 5815 (1983)
- 20 - P. NETA, A. SCHERZ et H. LEVANON  
J. Am. Chem. Soc. 101, 3624 (1979)
- 21 - R. KAPTEIN, K. DIJKSTRA, F. MÜLLER, C.G. VAN SCHAGEN  
et A.J.W.G. VISSER  
J. Magn. Reson. 31, 17 (1978)
- 22 - a) J. KEMMINK, A.P.M. EKER et R. KAPTEIN  
Photochem. Photobiol. 44, 137 (1986)  
b) P.J. HORE et R. KAPTEIN  
N.M.R. Spectroscopy : New Methods and Applications,  
Ed. G.C. LEVY, Amer. Chem. Soc. Washington D.C., p. 285 (1982)
- 23 - C.Y. LEE et G. LEVIN  
J. Phys. Arom. 83, 3165 (1979)
- 24 - A. HARRIMAN, G. PORTER et P. WALTERS  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1, 79, 1335 (1983)
- 25 - D.G. DAVIS  
dans "The porphyrins", Ed. D. DOLPHIN, Vol. V, chap. 4  
Acad. Press-New York (1979)
- 26 - K. KALYANASUNDARAM et M. NEUMANN-SPALLART  
J. Phys. Chem. 86, 5163 (1982)
- 27 - A. CORSINI et O. HERRMANN  
Talanta 33, 335 (1986)
- 28 - H.D. ROTH et M. MANION-SCHILLING  
With IUPAC Symposium on PHOTOCHEMISTRY pp. 279-282,  
AIX-EN-PROVENCE (1976)
- 29 - K. MARUYAMA, H. FURUTA et T. OTSUKI  
Chem. Lett., 857 (1980)

- 30 - N. MATAGA  
J. Mol. Struct. 135, 279 (1986)
- 31 - K. KALYANASUNDARAM  
Inorg. Chem. 23, 2453 (1984)
- 32 - A. HOFMANOVA, E. BIENVENUE, P. SETA et M. MOMENTEAU  
Photochem. Photobiol. 44, 87 (1986)
- 33 - Y.B. YEVSTIGNEYEV, A.A. KAZAKOVA et B.A. KISELEV  
Biofiz. 18, 53 (1973)
- 34 - D. MAUZERALL et G. FEHER  
Biochim. Biophys. Acta 79, 430 (1964)
- 35 - J. FAJER et M.S. DAVIS  
dans "The porphyrins", Ed. D. DOLPHIN, Vol. IV, chap. 4,  
Acad. Press - New-York (1979)
- 36 - Y. HAREL et J. MANASSEN  
Photochem. Photobiol. 23, 337 (1976)
- 37 - R.A. NASH, D.M. SKAUEN et W.C. PURDY  
J. Am. Pharm. Ass; 47, 433 (1958)
- 38 - R.H. FELTON  
dans "The Porphyrins", Ed. D. DOLPHIN, Vol. V, chap. 3,  
Acad. Press - New-York (1979)
- 39 - K.M. KADISH, M.M. MORRISON  
J. Am. Chem. Soc. 98, 3326 (1976)
- 40 - V. BRABEC et V. MORNSTEIN  
Biophys. Chem. 12, 159 (1980)
- 41 - M. GOUTERMAN et G.E. KHALIL  
J. Mol. Spectrosc. 53, 88 (1974)
- 42 - K. MARUYAMA, H. FURUTA et A. OSUKA  
Tetrahedron 42, 6149 (1986)
- 43 - W.T. DIXON et D. MURPHY  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. 2, 72, 1221 (1976)
- 44 - H. MUSSO  
dans "Oxidative coupling of phenols" Eds. W.I. TAYLOR et A.R. BATTERSBY,  
chap. 1, p. 65 MARCEL DEKKER, Inc; New-York (1967)

- 45 - K. KASAMA, A. TAKEMATSU et A. SHIGEYOSHI  
J. Phys. Chem; 86, 2420 (1982)
- 46 - S.M. ADAMS et H.C. Box  
J. Chem. Phys. 63, 1185 (1975)
- 47 - E. VOGELMANN, S. SCHREINER, W. RAUSMER et H.E.A. KRAMER  
Z. Physik. Chem. Neue Folge Bd.101, 21 (1976)
- 48 - A. HARRIMAN  
J. Photochem. 29, 139 (1985)
- 49 - D. MAUZERALL  
dans "The Porphyrins" Ed. D. DOLPHIN, Vol. V, chap. 2  
Acad. Press - New-York (1979)
- 50 - V.S. CHIRVONYI  
Izvest. Akad. Nauk SSSR 39, 2400 (1975)
- 51 - A. HARRIMAN et M.C. RICHOUX  
J. Photochem. 27, 205 (1984)
- 52 - P. HAMBRIGHT  
Inorg. Chem. 16, 2987 (1977)
- 53 - D.M. CLOSE, E. SAGSTUEN et W.H. NELSON  
J. Chem. Phys. 82, 4386 (1985)
- 54 - R.H. FELTON et H. LINSCHITZ  
J. Am. Chem. Soc. 88, 1113 (1966)
- 55 - R. KAPTEIN, K. NICOLAY et K. DIJKSTRA  
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1092 (1979)
- 56 - G. LOBER et L. KITTLER  
Photochem. Photobiol. 25, 215 (1977)
- 57 - G. DRYHURST  
Anal. Chim. Acta 57, 1374 (1971)
- 58 - D. LE NOUEN, 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

- 59 - a. C.C. FELIX, J.S. HYDE, T. SARANA et R.C. SEALY  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84, 335 (1978)
- b. M.R. CHEDEKEL, S.K. SMITH, P.W. POST, A. POKARA et D.L. VESSEL  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5395 (1978)
- 60 - I.A. MAGNUS  
dans "Dermatological Photobiology", Ed. BLACKWELL, p. 214 +  
Londres (1976)
- 61 - N.J. DEMOL, G.M.J. BEIJERSBERGEN VAN HENEGOUWEN et K.W. GERRITSMA  
Photochem. Photobiol. 29, 7 (1979)
- 62 - F.A. GOLLMICK et H. BERG  
Photochem. Photobiol. 16, 447 (1972)
- 63 - J. CADET, C. DECARROZ, S.Y. WANG et W.R. MIDDEN  
Isr. J. Chem. 23, 420 (1983)
- 64 - S. KAWANISHI, S. INOVE, S. SANO et H. AIBA  
J. Biol. Chem. 261, 6090 (1986)
- 65 - W.T. DIXON, M. MOGHINI et D. MURPHY  
J. Chem. Soc. Faraday Trans II 70, 1713 (1974)
- 66 - W.T. DIXON et D. MURPHY  
J. Chem. Soc. Perkin II, 1823 (1976)
- 67 - A.T. BULLOCK et C.B. HOWARD  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II, 71, 1008 (1975).

CHAPITRE IV

**ETUDE PAR PHOTO-C.I.D.N.P. DE  
L'INTERACTION DES PORPHYRINES AVEC DIFFERENTS  
ACIDES AMINES AROMATIQUES**

**I - INTRODUCTION**

L'utilisation du dérivé de l'hématoporphyrine (HpD) en photochimiothérapie des cancers repose sur sa capacité à photosensibiliser les tissus atteints de lésions malignes pour conduire à leur dégradation.

Au niveau cellulaire, la principale cible associée au processus photodynamique des porphyrines est la membrane cellulaire (1). Au niveau moléculaire, de récentes études (2) ont montré que les effets phototoxiques les plus importants qui sont responsables de la dégradation de la membrane proviennent d'une détérioration des protéines qui la constituent. En particulier, certains acides aminés, tels que le tryptophane, l'histidine ou la cystéine, subissent une réaction de photooxydation qui conduit à la dégradation de ces résidus. Il a cependant été montré que l'état excité triplet des porphyrines était efficacement inhibé au cours de la réaction (3). Il est généralement admis que cette désactivation se fait selon un mécanisme de type II. Toutefois, certains auteurs (4-5) ont proposé que cette désactivation pouvait également se faire selon une réaction de transfert de charge entre porphyrine et acide aminé aromatique ; en particulier dans le cas du tryptophane.

Afin d'approfondir plus en détail ce mécanisme, nous nous sommes intéressés à l'étude par photo CIDNP de l'interaction de différents acides aminés (tryptophane, histidine, L-Dopa, tyrosine) avec les porphyrines citées dans le chapitre précédent. D'un point de vue expérimental nous avons retenu le système [filtre/eau/acide aminé/porphyrine] pour notre étude. L'utilisation d'un filtre coupant les longueurs d'onde au-dessous de 330 nm (au-delà desquelles la tyrosine et les autres acides aminés n'absorbent pas) s'est avérée nécessaire. En effet, il s'est avéré qu'irradiés par tout le spectre d'émission de la lampe nous servant de source

excitatrice, la tyrosine ainsi que le tryptophane présentaient des effets de CIDNP indépendamment de la présence de la porphyrine. En présence du filtre, seule la porphyrine peut induire pendant l'irradiation des polarisations sur ces résidus aromatiques.

Les formules des acides aminés aromatiques utilisés dans cette étude sont présentées sur la figure IV-1.

Les porphyrines sont celles qui ont été citées dans le chapitre précédent.

Nous avons également étendu notre étude aux dérivés métallés de ces porphyrines (MP où M = Zn(II), Pd(II), Fe(II), Co(II), Ni(II)) afin de comparer leur photoréactivité par voie radicalaire et d'effectuer un parallélisme avec leur photoréactivité par un mécanisme de type II.

Nous allons exposer ici, les résultats et les informations que nous avons pu extraire des différents spectres obtenus.

## II - RESULTATS

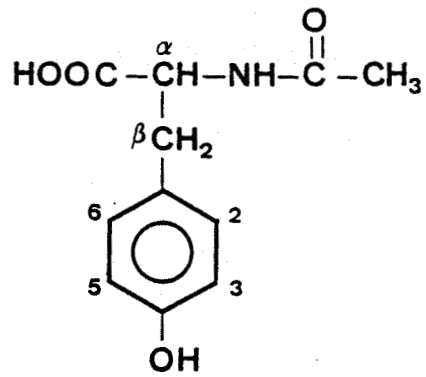
Les acides aminés aromatiques, irradiés en présence de porphyrines, montrent des polarisations importantes qui dépendent à la fois de la nature de la porphyrine utilisée et du pD de la solution. De même, les porphyrines non métallées sont fortement polarisées. Les polarisations obtenues sur ces différentes espèces sont notées dans les tableaux IV-1 et IV-2 à titre d'exemple avec la tyrosine.

### 1) Cas de la Tyrosine

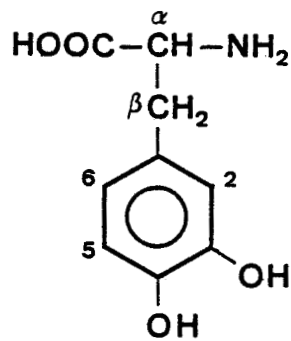
La figure IV-2 montre un exemple de spectre obtenu avec la TMePyPH<sub>2</sub> et la tyrosine (TyrOH) en milieu acide (pD  $\approx$  4).

Si on compare ce spectre avec ceux obtenus avec les autres porphyrines on constate que les polarisations observées sur TyrOH sont toujours les mêmes :

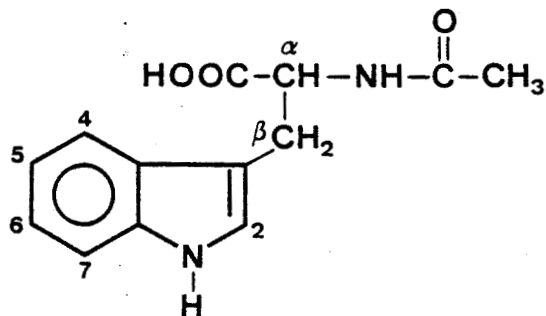




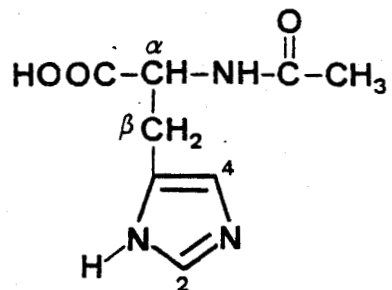
N-acétyltyrosine



dihydroxy-3,4 phénylalanine (L-Dopa)



N-acétyltryptophane



N-acétylhistidine

Figure W.-I:

Formules des acides aminés.

solvant = D <sub>2</sub> O	TMR <sub>y</sub> PH <sub>2</sub> <sup>4+</sup> , 4 Cl <sup>-</sup>	TAPPH <sub>2</sub> <sup>4+</sup> , 4 Cl <sup>-</sup>	TPPSH <sub>2</sub> <sup>4+</sup> , 4 Cl <sup>-</sup>
Polarisations des porphyrines hydrosolubles en présence de N-acétyltyrosine	- CH <sub>3</sub> a E (F)  - Hb AE(f)+E  - Hc A (F)+AE  - Hd A (F)	- CH <sub>3</sub> a —  - Hb E (f)+AE  - Hc A (F)+AE  - Hd A (F)	- Hb B  - Hc B  - Hd A (f) + B

Tableau IV-I:

Polarisations observées sur les porphyrines en présence de N-acétyltyrosine. E : émission; A : absorption; AE : absorption-émission; B : "broadening"; f : forte; f : faible.



Polarisations des acides aminés aromatiques			
solvant	N-acétyltyrosine	N <sub>α</sub> -acétylhistidine	N <sub>α</sub> -acétyltryptophane
$\text{D}_2\text{O}$	$-\text{CH}_2(\beta) \text{ A(F)}$ $-\text{H}_{3,5} \text{ E(F)+AE}$ $-\text{H}_{2,6} \text{ AE(f)+A}$	$-\text{CH}_2(\beta) \text{ A(f)}$ $-\text{H}_4 \text{ E(F)}$ $-\text{H}_2 \text{ E(F)}$	$-\text{CH}_2(\beta) \text{ A(F)}$ $-\text{H}_2 \text{ E(F)}$ $-\text{H}_{4,6} \text{ E(f)}$
sensibilisateur			
$\text{TMPyPH}_2, 4\text{Cl}^{4+}$			

Tableau IV-2:

Polarisations observées sur les acides aminés en présence de  $\text{TMepYpH}_2$ .



- Emission (E) pour les protons 3,5 du cycle aromatique (doublet centré à  $\delta = 6,78$  ppm)
- Absorption exaltée (A) pour les protons méthyléniques  $\beta\text{CH}_2$  (multiplet à  $\delta = 2,75$  ppm)
- Effet de multiplet (AE) faible sur les protons aromatiques 2,6 (doublet centré à  $\delta = 7,05$  ppm).

Les porphyrines non métallées (TMePyPH<sub>2</sub>, TAPPH<sub>2</sub>, TPPSH<sub>2</sub>) montrent également de fortes polarisations :

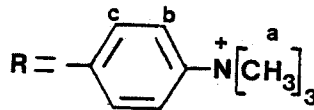
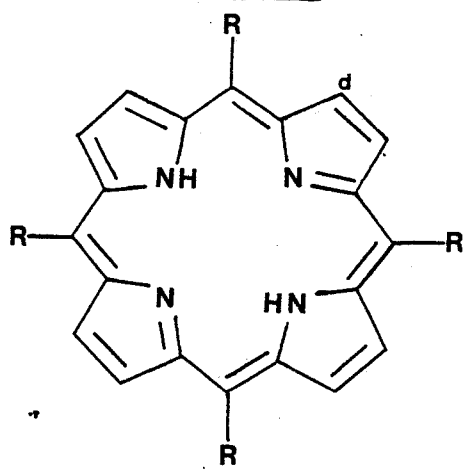
- protons pyrroliques d en forte absorption exaltée
- protons aromatiques c également en absorption exaltée
- protons aromatiques b effet AE + E (cas de la TAPPH<sub>2</sub> (figure IV-3)) ou effet E + AE (effet de multiplet difficile à caractériser) (cas de la TMePyPH<sub>2</sub> (figure IV-2)).

Dans le cas de la TMePyPH<sub>2</sub>, les protons N-méthyliques a sont également en forte émission. Nous avons noté qu'au fur et à mesure que le pH augmentait, les polarisations sur ces porphyrines disparaissent sous l'effet d'un "broadening". Celles sur la tyrosine persistent mais diminuent en intensité (figure IV-2 et IV-4).

Nous avons également observé que l'allure des signaux des protons aromatiques de la TyrOH était fortement perturbée par la présence des porphyrines avant irradiation.

Cette influence provient principalement d'un phénomène d'association entre ces deux espèces. Celui-ci fera l'objet d'une étude complète dans le paragraphe suivant. Ainsi, comme nous le montre la figure IV-5, on observe que ces signaux dépendent principalement du rapport des concentrations (r) entre porphyrine et tyrosine ( $r = (\text{TyrOH})/(\text{PH}_2)$ ).

- pour  $r > 1$  les protons aromatiques de TyrOH apparaissent sous la forme d'un spectre AA'BB' (le couplage diminue quand r se rapproche de 1)
- pour  $r < 1$  le spectre RMN est réduit à une seule raie indiquant l'équivalence magnétique de ces protons (spectre A<sub>4</sub>). La diminution du rapport r s'accompagne alors d'un déplacement de cette raie vers les champs forts.

TAPPH<sub>2</sub>

N-acétyltyrosine

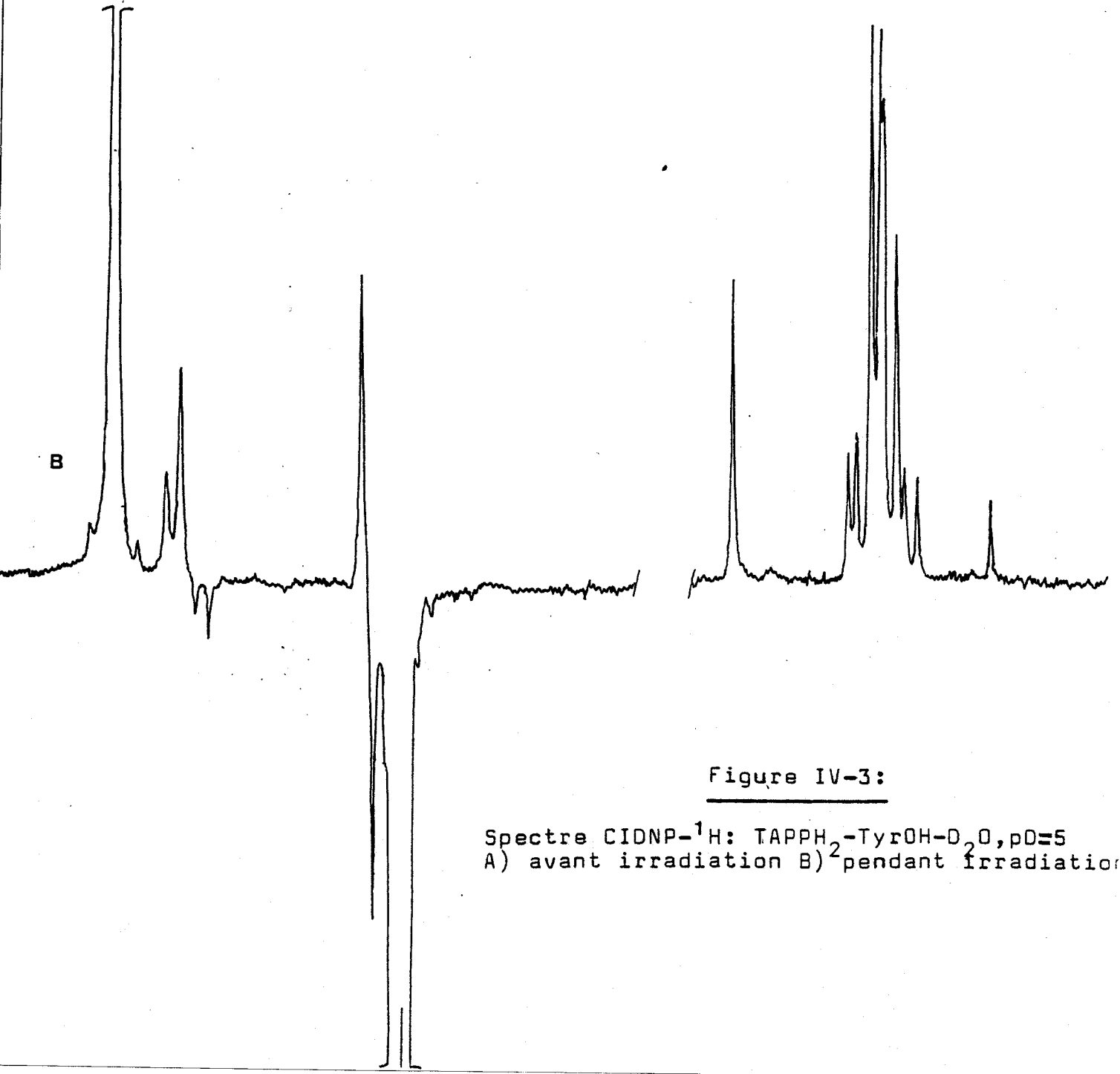
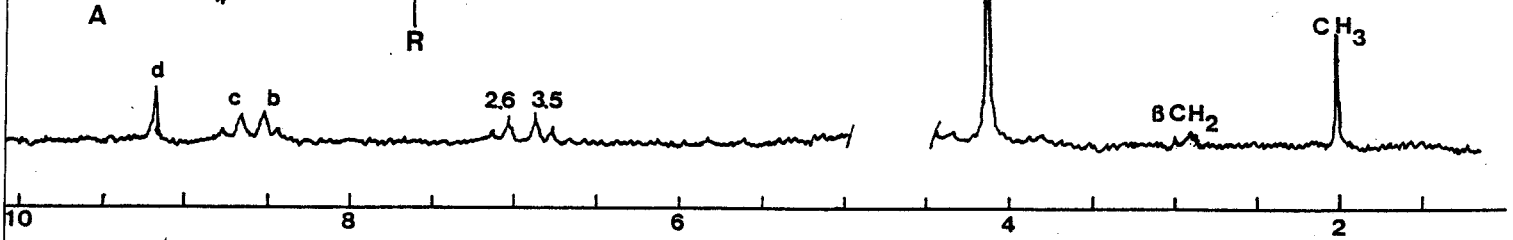
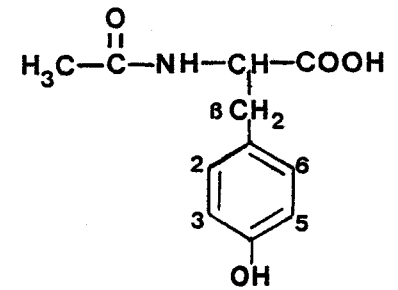
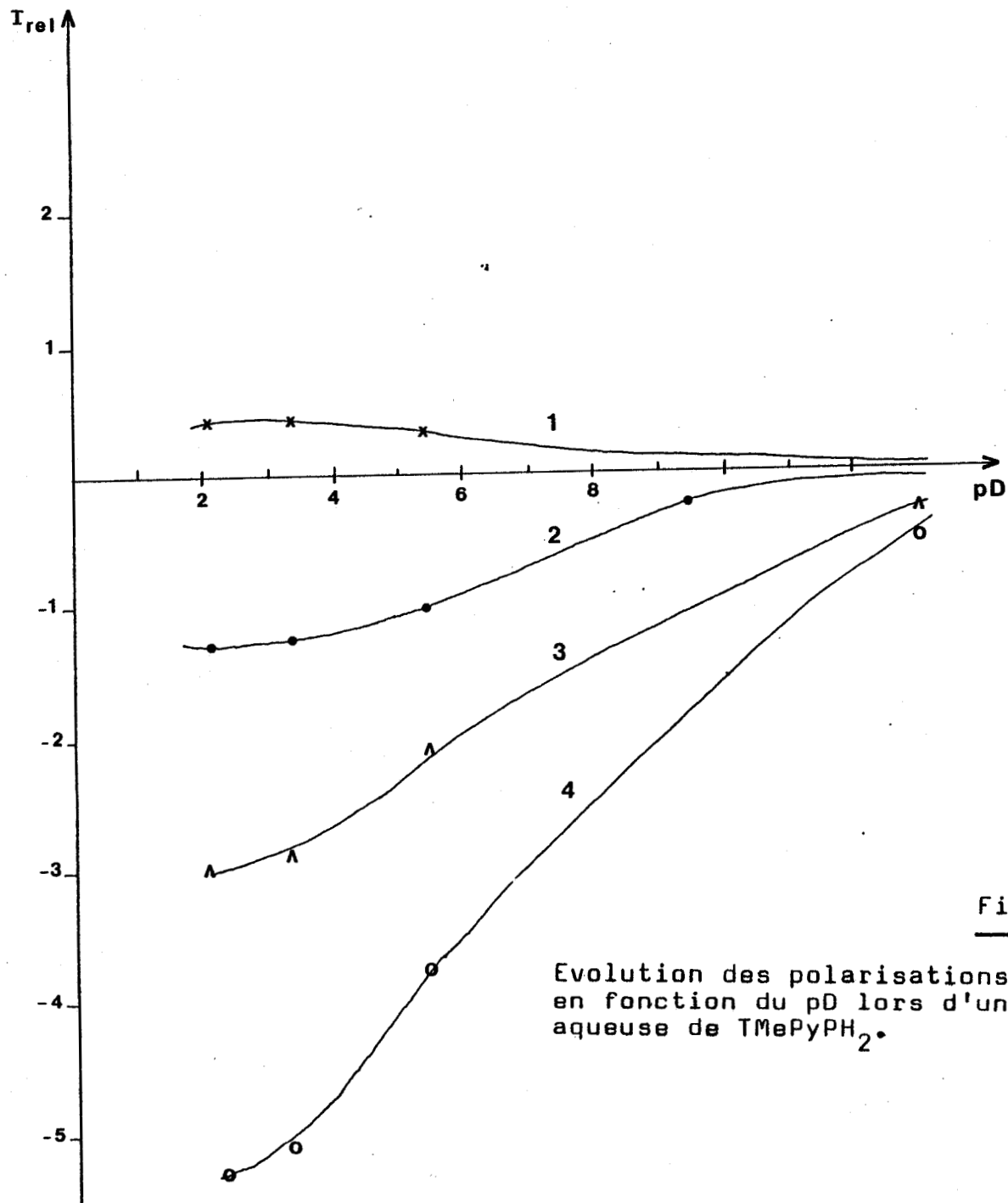


Figure IV-3:

Spectre CIDNP-<sup>1</sup>H: TAPPH<sub>2</sub>-TyrOH-D<sub>2</sub>O, pD=5  
 A) avant irradiation B) pendant irradiation



Spectre CIDNP  
de TyrOH

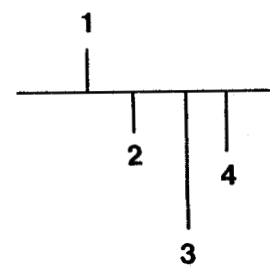


Figure IV-4:

Evolution des polarisations des protons  $H_{2,6}$  et  $H_{3,5}$  de la TyrOH en fonction du pD lors d'une irradiation  $2,6$  en  $3,5$  solution aqueuse de TMePyPH<sub>2</sub>.



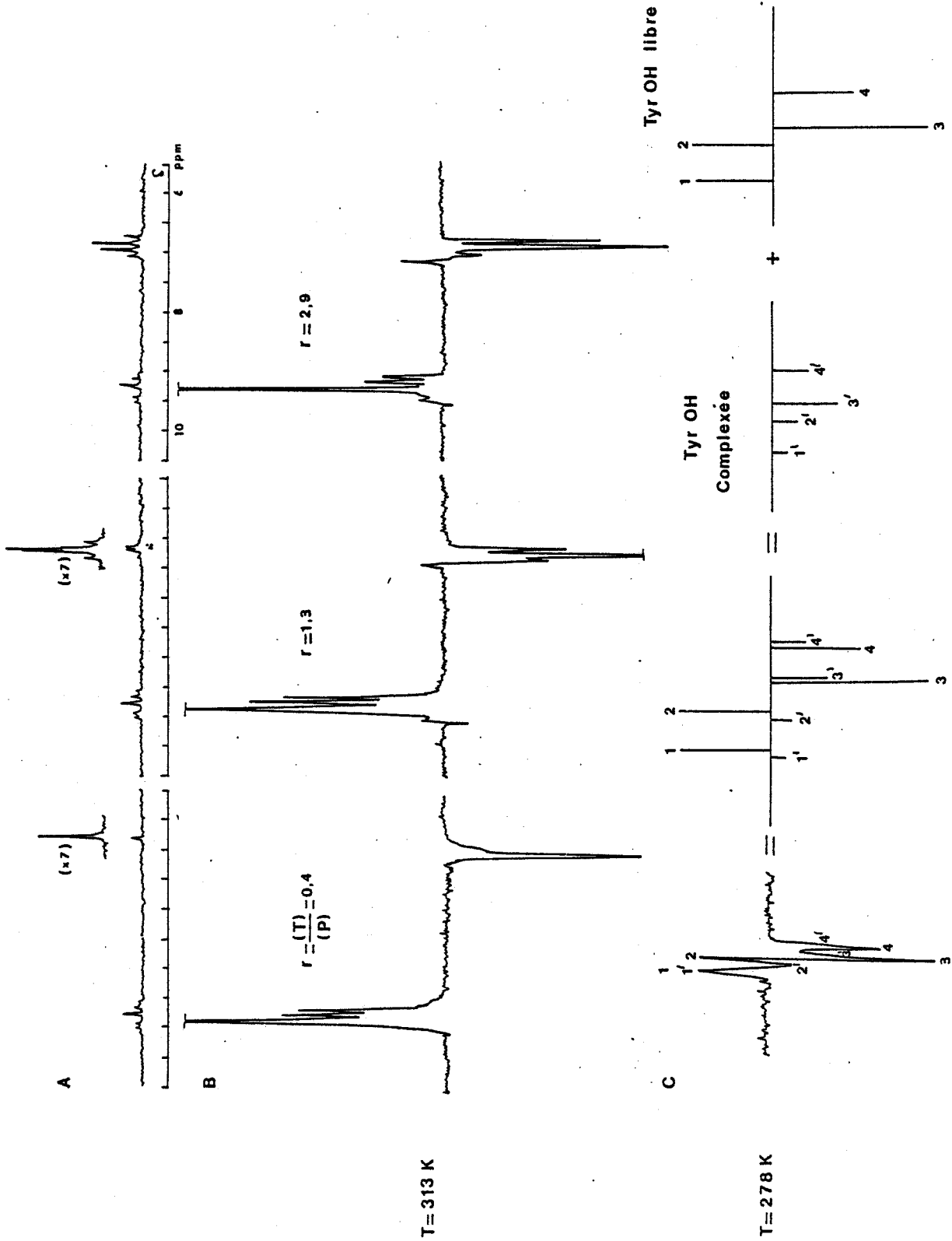


Figure IV-5:

Influence du rapport des concentrations  $r$  entre  $\text{PH}_2$  et  $\text{TyrOH}$  sur l'allure du spectre des protons aromatiques de  $\text{TyrOH}$ .  
 A) Avant irradiation B) Pendant irradiation à 313°K C) Pendant irradiation à 278°K.



Pendant l'irradiation les polarisations sur la tyrosine évoluent également en fonction de ce rapport. Ainsi pour  $r < 1$  les protons aromatiques sont tous polarisés en émission, alors que pour  $r > 1$  on observe à nouveau l'effet de multiplet AE sur les protons  $H_{2,6}$  (figure IV-5).

La nature de ces différents effets sera explicitée plus en détail dans le chapitre suivant.

Nous obtenons des résultats analogues en remplaçant la N-acétyltyrosine par son ester éthylique ou par la L-Dopa. Par contre, nous n'observons plus de polarisation avec la méthoxy-4 phénylalanine (TyrOMe) ou la phénylalanine. Ces produits ne montrent pas non plus d'effet d'association avant l'irradiation.

Les porphyrines métallées ne sont pas polarisées en présence de tyrosine. Seules celles qui contiennent un métal diamagnétique (Zn(II) ; Pd(II)) sont susceptibles de polariser la TyrOH.

Aucun résultat intéressant n'a pu être obtenu avec celles substituées par des métaux paramagnétiques du fait des fortes perturbations des spectres de RMN (élargissement important des signaux).

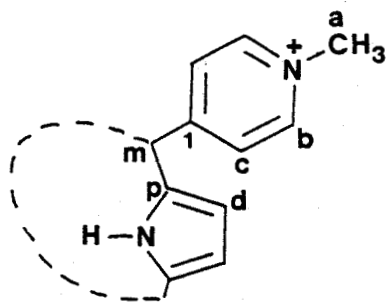
Par photo-CIDNP  $^{13}C$  nous obtenons également de fortes polarisations sur les carbones de la tyrosine et de la porphyrine (figure IV-6). On remarque une alternance des polarisations (absorption exaltée-émission) sur les carbones du cycle aromatique (tableau IV-3). De même on peut noter de fortes polarisations sur les carbones  $C_1$  et  $C_m$  de la TMePyPH<sub>2</sub> qui indiquent une forte délocalisation de la charge du cycle vers les substituants pyridiniques (valeurs élevées des constantes de couplage hyperfin).

La durée de l'irradiation n'a que peu d'incidence sur l'intensité des polarisations.

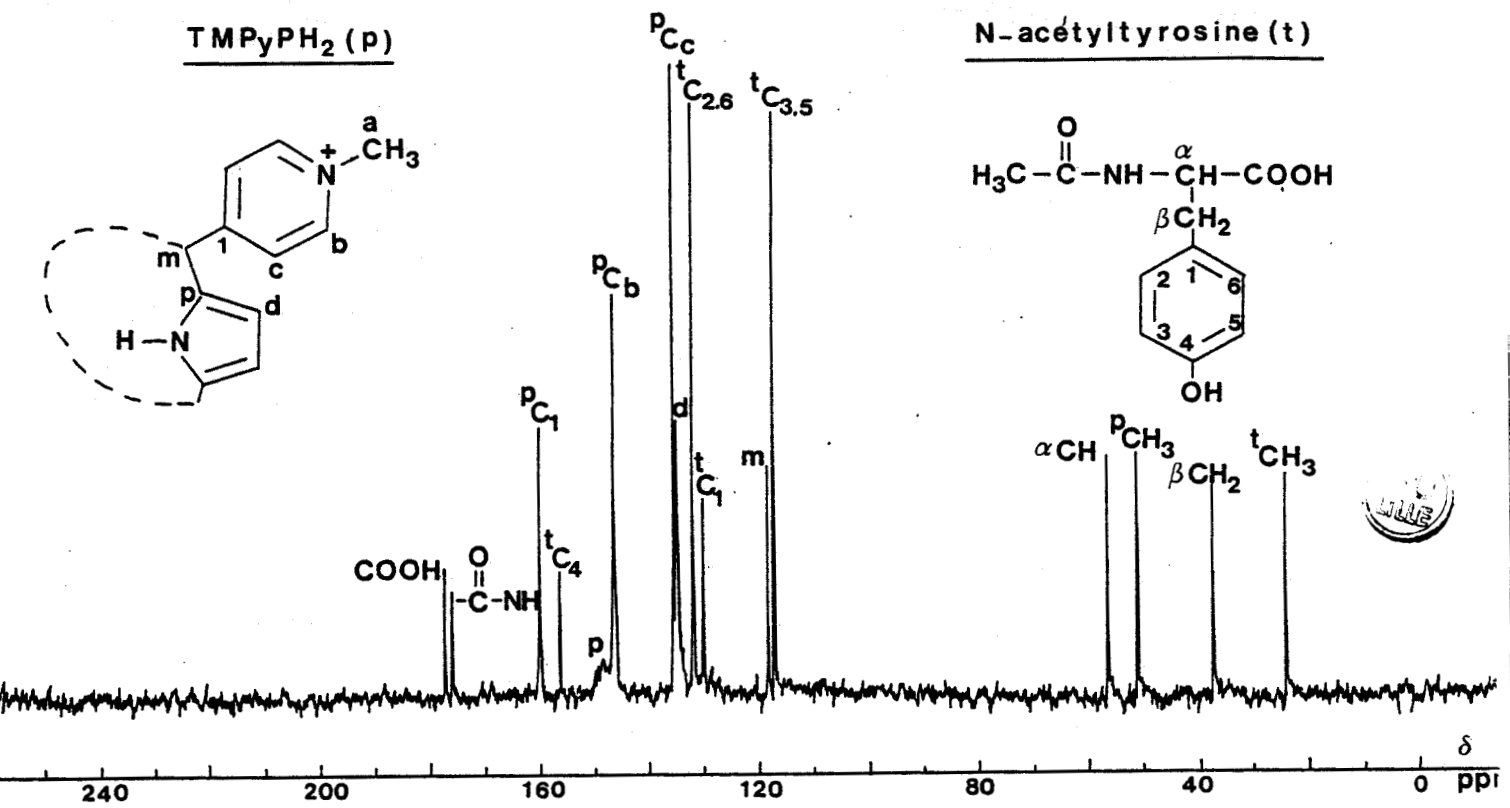
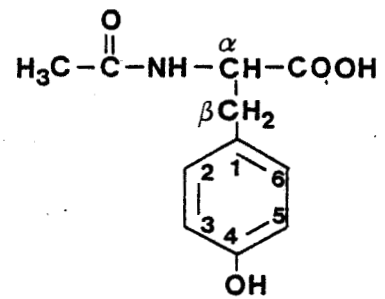
## 2) Cas du tryptophane

La réactivité du tryptophane (Trp) semble différente de celle de la tyrosine en ce sens que nous n'obtenons dans ce cas aucune polarisation sur ce produit en milieu acide.

A

TMePyPH<sub>2</sub> (p)

N-acétyltyrosine (t)



B

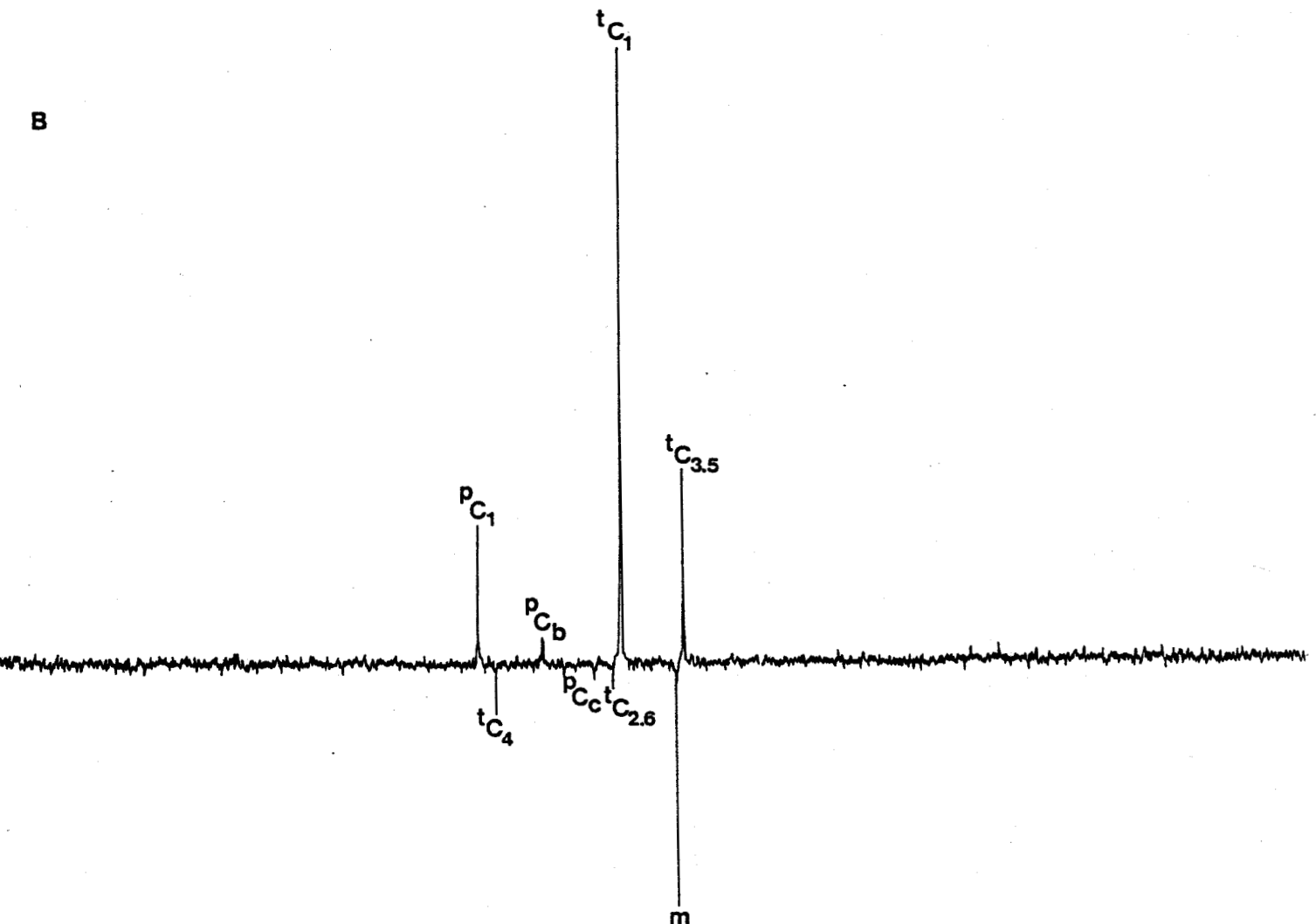


Figure IV-6:

Spectre CIDNP-<sup>13</sup>C : TMePyPH<sub>2</sub> - TyrOH - D<sub>2</sub>O, pD=3.

A) Avant irradiation, NS=46000 B) Pendant irradiation, NS=2000 .

N-acétyltyrosine <b>a</b>		TMe Py PH <sub>2</sub> <b>b</b>			
	$\delta$ (ppm)	Polarisation	$\delta$ (ppm)	Polarisation	
	/	/	116,97	E (forte)	Cm
C <sub>1</sub>	128,79	A (forte)	158,79	A (forte)	C <sub>1</sub>
C <sub>2,6</sub>	130,76	E (faible)	130,76	E (faible)	C <sub>2</sub>
C <sub>3,5</sub>	115,88	A (forte)	145,27	A (faible)	C <sub>3</sub>
C <sub>4</sub>	155,08	E (faible)	/	/	

Tableau IV-3:

Polarisations observées sur la TMePyPH<sub>2</sub> et la TyrOH en CIDNP <sup>13</sup>C lors d'une irradiation en solution aqueuse à pD=3;

a) D'après J.E. SURPRENANT, J.E. SARNESKI, R.R. KEY, J.T. BYRD  
N. REILLEY J. Magn. Reson. 40, 231 (1980).

b) D'après H.M. GOFF Bioinorg. Chem. 9, 61 (1978).

Par contre on observe avec la TMePyPH<sub>2</sub> ou la TAPP<sub>2</sub> des polarisations sur ce substrat à partir de valeurs de pD de 7 et 9 respectivement. Ces polarisations augmentent alors à mesure que le pD augmente. La porphyrine elle-même n'est pas polarisée à ces valeurs de pD. Au début de l'irradiation (12s) le tryptophane montre les polarisations suivantes (figure IV-7) :

- protons aromatiques en émission ( $\delta$  centré à 6,8 ppm)
- protons méthyléniques  $\beta$ CH<sub>2</sub> à  $\delta = 2,55$  ppm en absorption exaltée.

Pour une irradiation prolongée (1 min) on observe l'apparition d'un photoproduit lui-même polarisé dont une partie des signaux RMN se trouvent confondus avec ceux du tryptophane (figure IV-7). Dans CD<sub>3</sub>OD, nous obtenons le même type de polarisations sur le tryptophane. On peut noter en plus des polarisations différentes sur le photoproduit polarisé, ainsi qu'une polarisation en émission sur le groupement hydroxy du solvant. Après irradiation le photoproduit n'est pas décelable par RMN. Toutefois on peut supposer que celui-ci se forme en faible quantité et provient de la dégradation du tryptophane.

En présence de TPPSH<sub>2</sub>, d'HpD ou d'Hp, le tryptophane ne montre des polarisations qu'en milieu fortement basique (pD > 11). Parmi les porphyrines métallées, seule la ZnTMePyP induit des polarisations sur ce substrat à partir de valeurs de pD supérieures à 9.

### 3) Cas de l'histidine

L'histidine (His) possède une réactivité différente des deux autres acides aminés cités ci-dessus.

En effet, celle-ci ne montre de polarisations qu'en milieu neutre ou basique (pD > 7) en présence des porphyrines non métallées (figure IV-8) :

- protons H<sub>4</sub> et H<sub>2</sub> à  $\delta = 7,42$  et  $8,24$  ppm en émission
- protons méthyléniques  $\beta$ CH<sub>2</sub> à  $\delta = 3,32$  ppm en faible absorption exaltée.



$\text{TMePyPH}_2 + \text{Hist}$

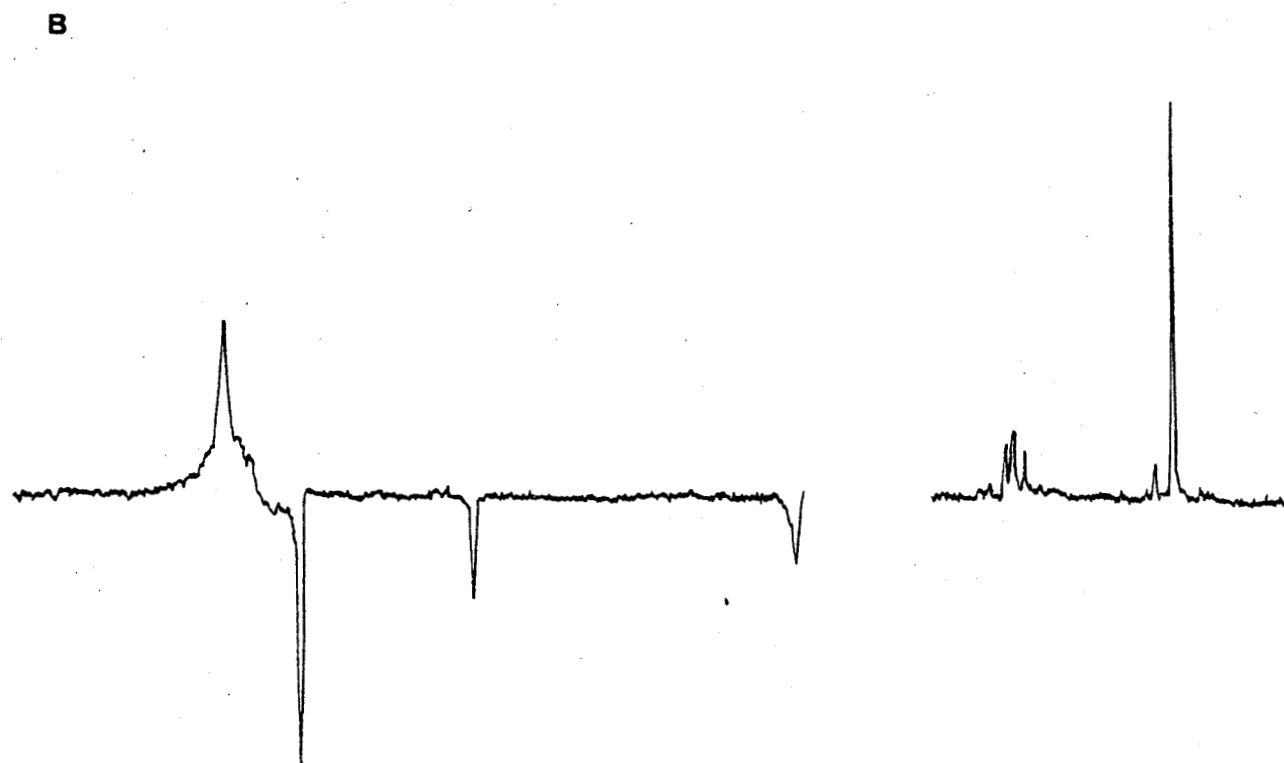
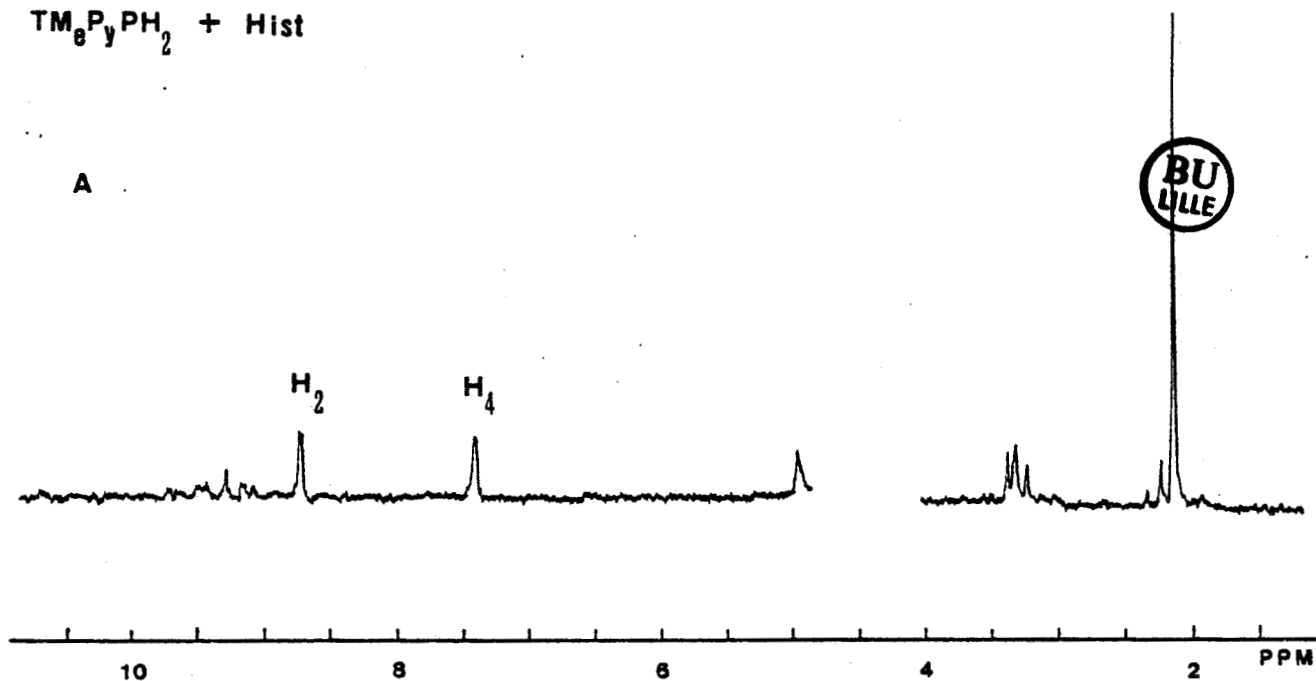


Figure IV-8:

Spectre CIDNP-<sup>1</sup>H:  $\text{TMePyPH}_2 - \text{Hist} - \text{D}_2\text{O}$ ,  $\text{pD} \approx 7$ ,  $\text{NS} = \text{I}$ .  
 A) Avant irradiation B) Pendant irradiation.

De même en présence de porphyrines métallées de Zn et de Pd de la TMePyPH<sub>2</sub> ces polarisations n'apparaissent qu'en milieu basique (pD = 11) (figure IV-9). Toutefois on observe au préalable la formation d'un photoproduit polarisé (singulet à  $\delta = 6,2$  ppm). Puis au fur et à mesure de la disparition de cette polarisation, les protons du cycle imidazolyle montrent les effets indiqués ci-dessus.

Après irradiation, le spectre de RMN est identique à celui obtenu avant irradiation, indiquant qu'il n'y a pas consommation des produits.

Des résultats analogues à ceux décrits ci-dessus ont été obtenus dans le méthanol deutéré.

### III - DISCUSSION

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

- 1) La réactivité prépondérante des porphyrines cationiques TMePyPH<sub>2</sub>, TAPPH<sub>2</sub> vis-à-vis des acides aminés par comparaison avec les porphyrines anioniques (TPPSH<sub>2</sub>) ou neutres (HpD - Hp).
- 2) La différence de réactivité entre les porphyrines métallées diamagnétiques et paramagnétiques.
- 3) La formation de photoproduits dans le cas du tryptophane et de l'histidine.

Nous allons commenter dans un premier temps l'origine des différentes polarisations observées sur ces produits, puis nous interpréterons les différences de réactivité de ces porphyrines.

Ces résultats sont complémentaires de ceux obtenus par J. MARKO (6) avec les phénothiazines. Son étude a montré que ces composés n'induisaient pas de polarisations sur les acides aminés. Or, les porphyrines réagissent avec ces substrats. Ceci laisse également supposer comme nous l'avons démontré dans le chapitre précédent que les porphyrines ont un

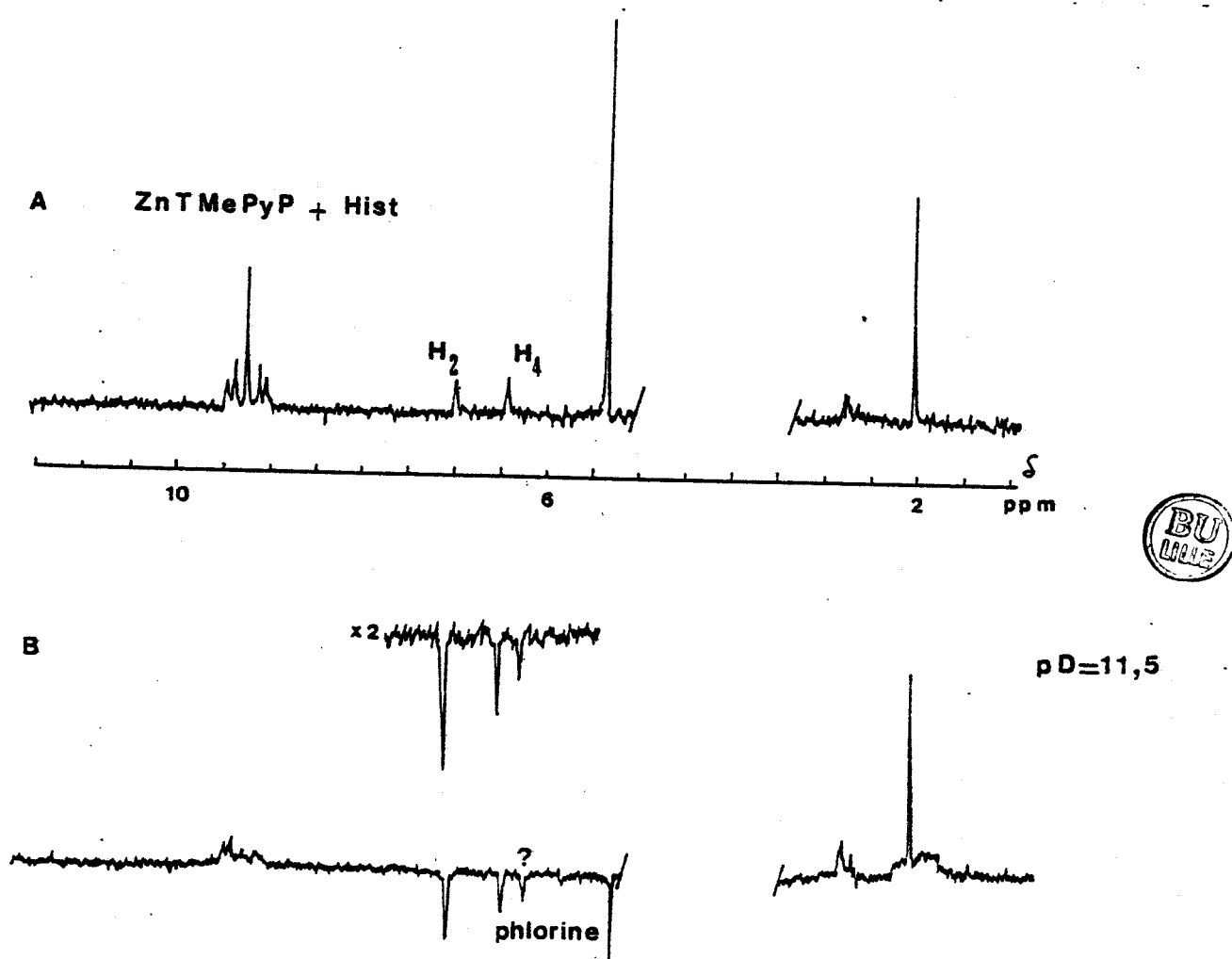
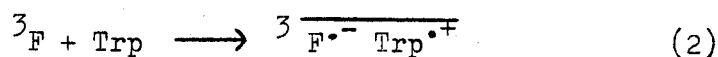
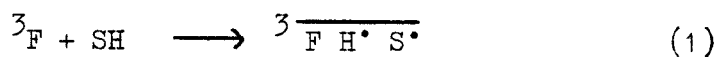


Figure IV-9:

Spectre CIDNP- $^1\text{H}$ :  $\text{ZnTMePyP}_2 - \text{Hist} - \text{D}_2\text{O}, \text{pD}=11, \text{NS}=1.$   
 A) Avant irradiation B) Pendant irradiation.



comportement opposé à celui des phénothiazines. Par conséquent, dans le cas d'un transfert de charge, la porphyrine jouerait le rôle d'accepteur. La nature du transfert (transfert d'électron ou arrachement d'hydrogène) semble être différente suivant la nature de l'acide aminé intervenant dans la réaction. Ainsi avec les flavines (F) utilisées comme agents photosensibilisants, KAPTEIN et al. ont montré que la tyrosine et l'histidine réagissaient principalement par arrachement d'hydrogène (7), tandis qu'avec le tryptophane le transfert d'électron était favorisé (8). Dans ces différents cas, les réactions sont de nature cyclique, les seuls composés polarisés étant les réactifs eux-mêmes. Les réactions de transfert [équation (1) et (2)] sont donc hautement réversibles dans ce cas (cf chapitre I).



SH = tyrosine, histidine      Trp = tryptophane

Nous pouvons donc envisager des mécanismes analogues pour expliquer les différentes polarisations que nous observons sur les acides aminés.

#### 1) Cas de la tyrosine

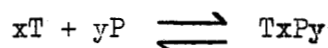
##### a) Phénomène de complexation

Les porphyrines sont connues pour former des complexes avec différents agents électro-donneurs (9 - 10 - 11) à l'état fondamental. La nature du complexe est différente suivant l'agent électro-donneur. Ainsi une ou plusieurs molécules peuvent s'associer avec la porphyrine (10) pour former des complexes 1-1, 1-2. De même, la nature de l'association varie aussi en fonction du substrat : PASTERWACK et al. ont montré que les porphyrines cationiques formaient des complexes  $\pi$ - $\pi$  avec les nucléobases (12). Tandis que HEATHCOTE et al. (13) proposent une interaction par liaison hydrogène entre le tryptophane et l'hématoporphyrine. La différenciation entre la nature de ces deux complexes peut aisément s'établir d'après les valeurs des constantes d'association qui sont plus faibles.

dans le dernier cas. La formation de ces complexes à l'état fondamental va influencer le comportement photochimique de ces systèmes. En effet, si l'association est trop importante, aucune photoréaction n'a lieu. C'est en particulier ce que SHELNUTT (14) a pu montrer avec le système uroporphyrine/méthylviologène. Par contre dans le cas d'une association modérée, le transfert de charge est favorisé du fait de la proximité des partenaires au sein du complexe. L'une des raisons de l'intérêt de ce phénomène de complexation est qu'il peut servir de modèle pour comprendre le rôle de l'interaction protéines/porphyrine dans des systèmes biologiques. Dans les cellules, les porphyrines sont au contact des protéines. Ainsi, dans l'environnement immédiat des porphyrines on trouvera principalement des résidus aromatiques tels que la tyrosine. Les contraintes stériques dans ces systèmes font que les types d'association cités plus haut seront favorisés. Ce qui permettra par voie de conséquence de favoriser les réactions de transfert de charge avec des acides aminés donnés et de renseigner sur l'environnement immédiat de la porphyrine.

Le spectre RMN de la tyrosine variant en fonction de la concentration de la porphyrine (figure IV-5) nous avons entrepris l'étude de ce phénomène d'après une méthode de RMN décrite par CHUCHE et BOUQUANT (15).

Lors d'une complexation, le déplacement chimique d'un proton d'un des partenaires du complexe subit un blindage ou déblindage par comparaison avec son déplacement chimique quand cette espèce est seule en solution. Cet effet va caractériser la position de l'atome considéré par rapport au site de complexation. Ce déplacement chimique induit provient d'un échange rapide entre la forme libre (T) et la forme complexée (TxPy) de la tyrosine auquel correspond l'équilibre suivant :



où T représente la tyrosine, P la porphyrine et TxPy le complexe.

Pour interpréter les résultats expérimentaux, il est nécessaire d'obtenir trois informations :

i) la constante d'association K : 
$$K = \frac{[TxPy]}{[T]^x [P]^y}$$

ii) Le déplacement chimique limite du proton engagé dans le complexe TxPy

$$\Delta \text{TxPy} = \delta \text{TxPy} - \delta \text{T}$$

iii) la stoechiométrie du complexe.

Certaines études effectuées sur la complexation des porphyrines par des agents électro-donneurs (9 - 10 - 12 - 13) ont montré que celles-ci formaient principalement des complexes de stoechiométrie 1-1 en solution ( $x = y = 1$ ).

En partant de cette hypothèse, K s'écrit :

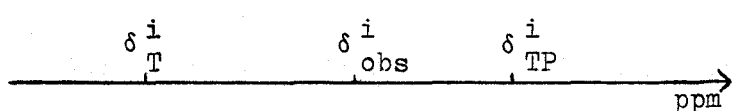
$$K = \frac{[\text{TP}]}{[\text{T}] [\text{P}]} \quad (1)$$

Pour des concentrations initiales  $[\text{To}]$  et  $[\text{Po}]$  en tyrosine et porphyrine, nous avons à l'équilibre :

$$[\text{T}] = [\text{To}] \left( 1 - \frac{[\text{TP}]}{[\text{To}]} \right) \quad (2)$$

$$[\text{P}] = [\text{To}] \left( \frac{[\text{Po}]}{[\text{To}]} - \frac{[\text{TP}]}{[\text{To}]} \right) \quad (3)$$

Si l'on considère le déplacement chimique observé pour le proton  $i$  de la tyrosine en présence de porphyrine, nous avons la relation suivante :

$$\delta_{\text{obs}}^i = \left( 1 - \frac{[\text{TP}]}{[\text{To}]} \right) \delta_{\text{T}}^i + \frac{[\text{TP}]}{[\text{To}]} \delta_{\text{TP}}^i$$


où :

-  $\delta_{\text{T}}^i$  est le déplacement chimique du proton  $i$  de la tyrosine en absence de porphyrine à la concentration  $[\text{To}]$

-  $\delta_{\text{TP}}^i$  est le déplacement chimique limite du proton  $i$  de la tyrosine engagée dans le complexe.

$$\text{soit } \frac{[\text{TP}]}{[\text{To}]} = \frac{\delta_{\text{obs}}^i - \delta_{\text{T}}^i}{\delta_{\text{TP}}^i - \delta_{\text{T}}^i} = \frac{\Delta_{\text{T}}^i}{\Delta_{\text{TP}}^i} \quad (4)$$

$\Delta_{\text{T}}^i = \delta_{\text{obs}}^i - \delta_{\text{T}}^i$  = déplacement chimique induit du proton  $i$  de la tyrosine

$\Delta_{\text{TP}}^i = \delta_{\text{TP}}^i - \delta_{\text{T}}^i$  = déplacement chimique induit limite du proton  $i$  dans le complexe TP.

En combinant les équations 1, 2, 3 et 4 nous obtenons :

$$K = \frac{\Delta_T^i / \Delta_{TP}^i}{[To] \left(1 - \frac{\Delta_T^i}{\Delta_{TP}^i}\right) \left(\frac{[Po]}{[To]} - \frac{\Delta_T^i}{\Delta_{TP}^i}\right)} \quad (5)$$

Si les concentrations initiales sont identiques ( $[To] = [Po] = Co$ ) l'équation 5 peut être écrite sous la forme simplifiée :

$$\Delta_T^i = - \sqrt{\frac{\Delta_{TP}^i}{K}} \sqrt{\frac{\Delta_T^i}{Co}} + \Delta_{TP}^i \quad (6)$$

Il existe une relation linéaire entre  $\Delta_T^i$  et  $\sqrt{\frac{\Delta_T^i}{Co}}$  ; l'ordonnée à l'origine de cette droite est égale à  $\Delta_{TP}^i$  et la pente à  $-\frac{\sqrt{\Delta_{TP}^i}}{K}$ .

Nous nous sommes intéressés à la résonance des protons aromatiques H-2,6-3,5 méthyléniques ( $\beta CH_2$ ) et méthyliques de la N-acétyltyrosine lors de sa complexation par la TMePyPH<sub>2</sub>.

Nous n'avons pas pu déterminer le déplacement chimique des protons  $\alpha$  CH de ce composé avec certitude et étudier son évolution lors de la complexation du fait du recouvrement partiel des signaux de ce proton avec le solvant.

Pour des concentrations équimolaires en porphyrine et tyrosine comprises entre  $1,2 \cdot 10^{-1}$  M et  $3,3 \cdot 10^{-3}$  M nous avons reporté  $\Delta_T^i$  \* en fonction de  $\sqrt{\frac{\Delta_T^i}{Co}}$  à différentes températures (figures IV-10 - 11 - 12).

Ces résultats permettent de vérifier l'hypothèse de la formation d'un complexe de stoechiométrie 1/1 puisque les coefficients de corrélation r entre  $\Delta_T^i$  et  $\sqrt{\frac{\Delta_T^i}{Co}}$  pour les différents protons de la tyrosine sont sensiblement voisins de - 1 (tableau IV-4). L'ordonnée à l'origine et la pente des différentes droites (figures IV-10, 11, 12) calculées par la méthode des moindres carrés a permis de déterminer K à différentes températures (tableau IV-4). Notons toutefois qu'on ne tient pas compte des coefficients d'activité dans le calcul de K.

\*Dans le cas particulier des protons H<sub>2,3,5,6</sub> le déplacement chimique observé a été pris par rapport au centre du spectre AA'BB' puisque celui-ci évolue en fonction de la concentration et de la température. Dans les conditions de dissolution des réactifs, le pD de la solution évolue de 4 à 5. Pour des concentrations identiques, les déplacements chimiques des protons de la tyrosine seule en solution ne varient pas dans cette gamme de pD.

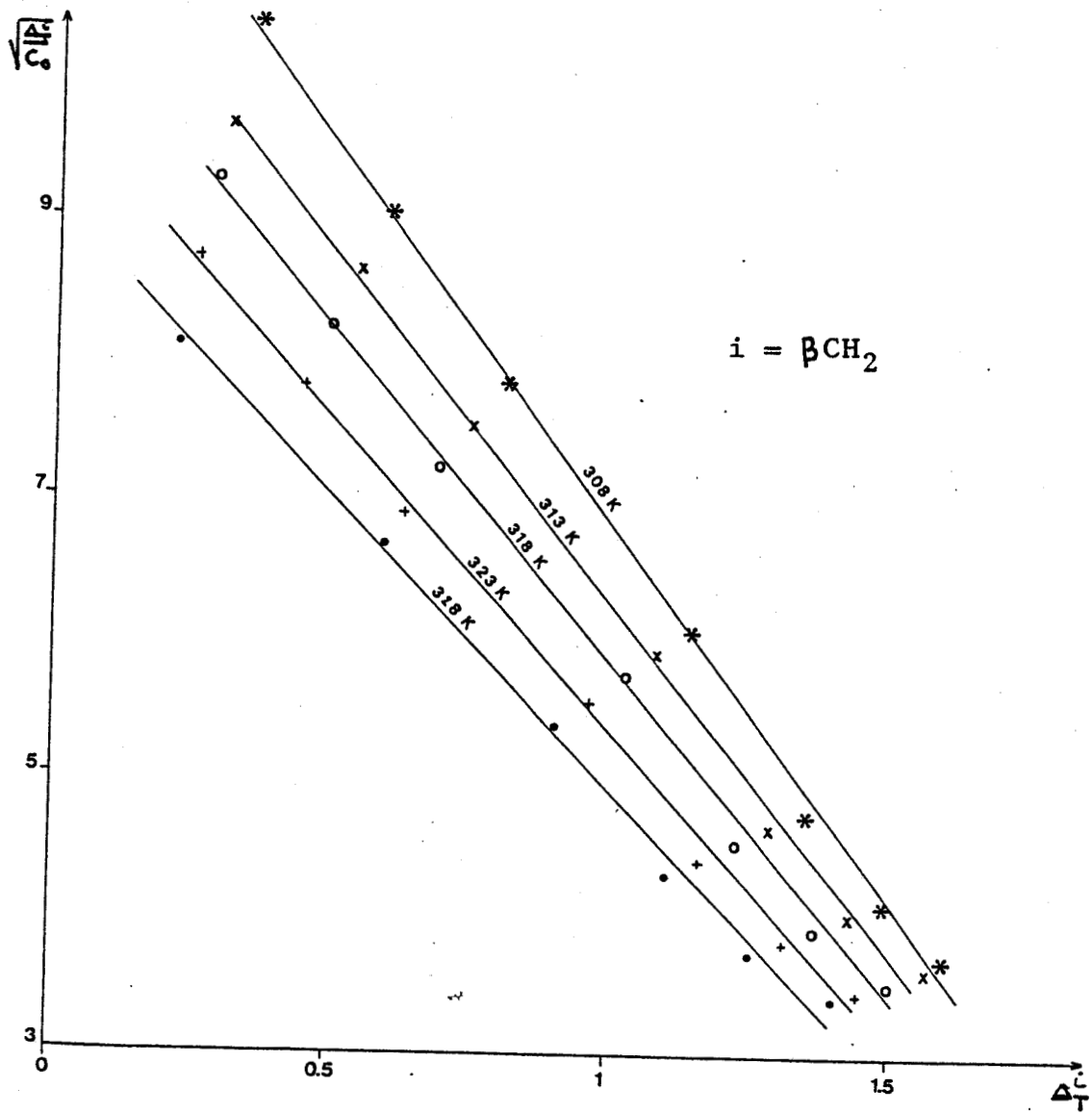


Figure IV-10:

Déplacement chimique induit ( $\Delta_{\text{T}}^i$ ) de la N-acétyltyrosine en fonction de  $\sqrt{\Delta_{\text{T}}^i} / C_0$  à différentes températures.

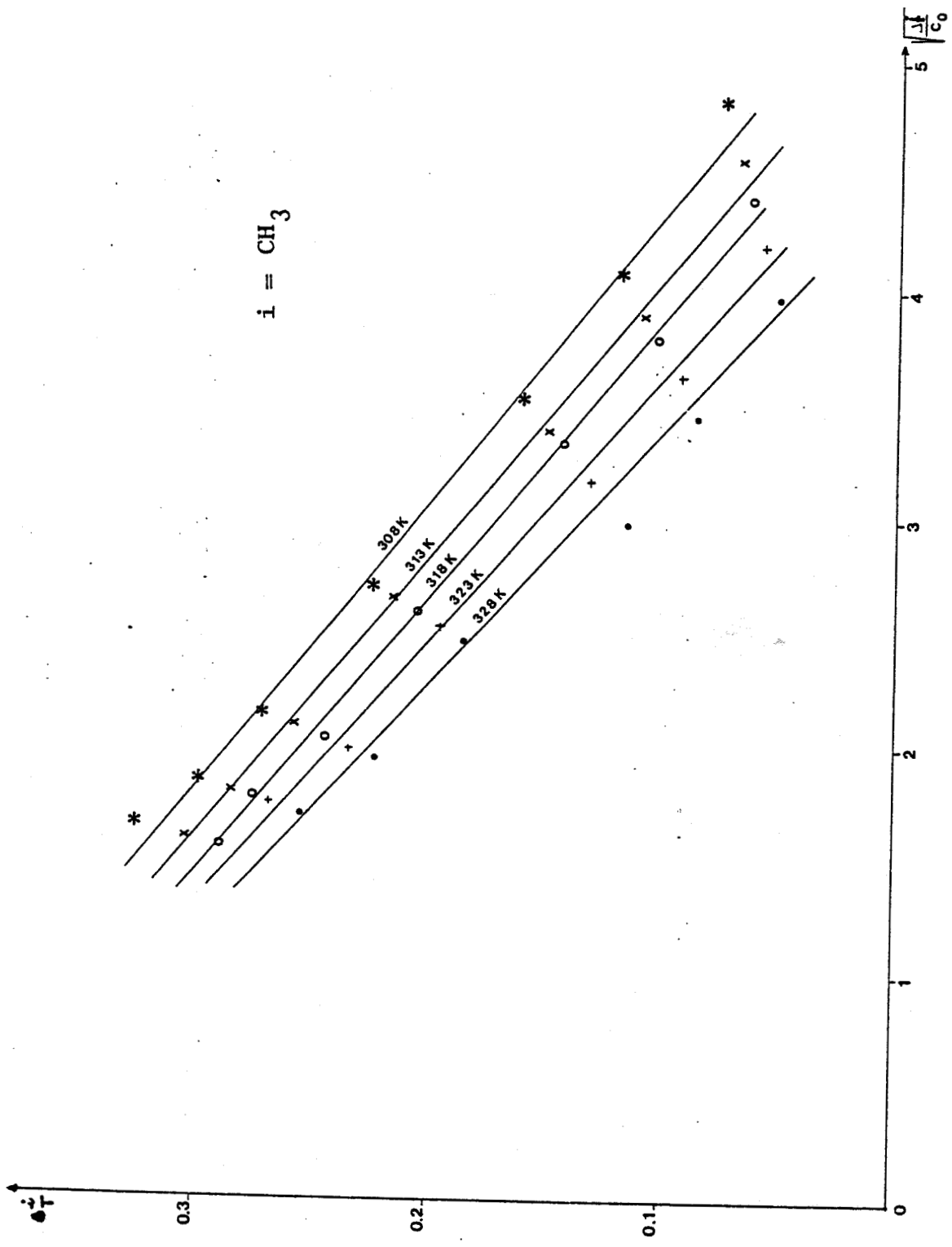


Figure IV-II:

Déplacement chimique induit ( $\Delta_T^i$ ) de la N-acétyltyrosine en fonction de  $\sqrt{\frac{i}{C_0}}$  à différentes températures.

$i = (H_{2,6}; H_{3,5})$

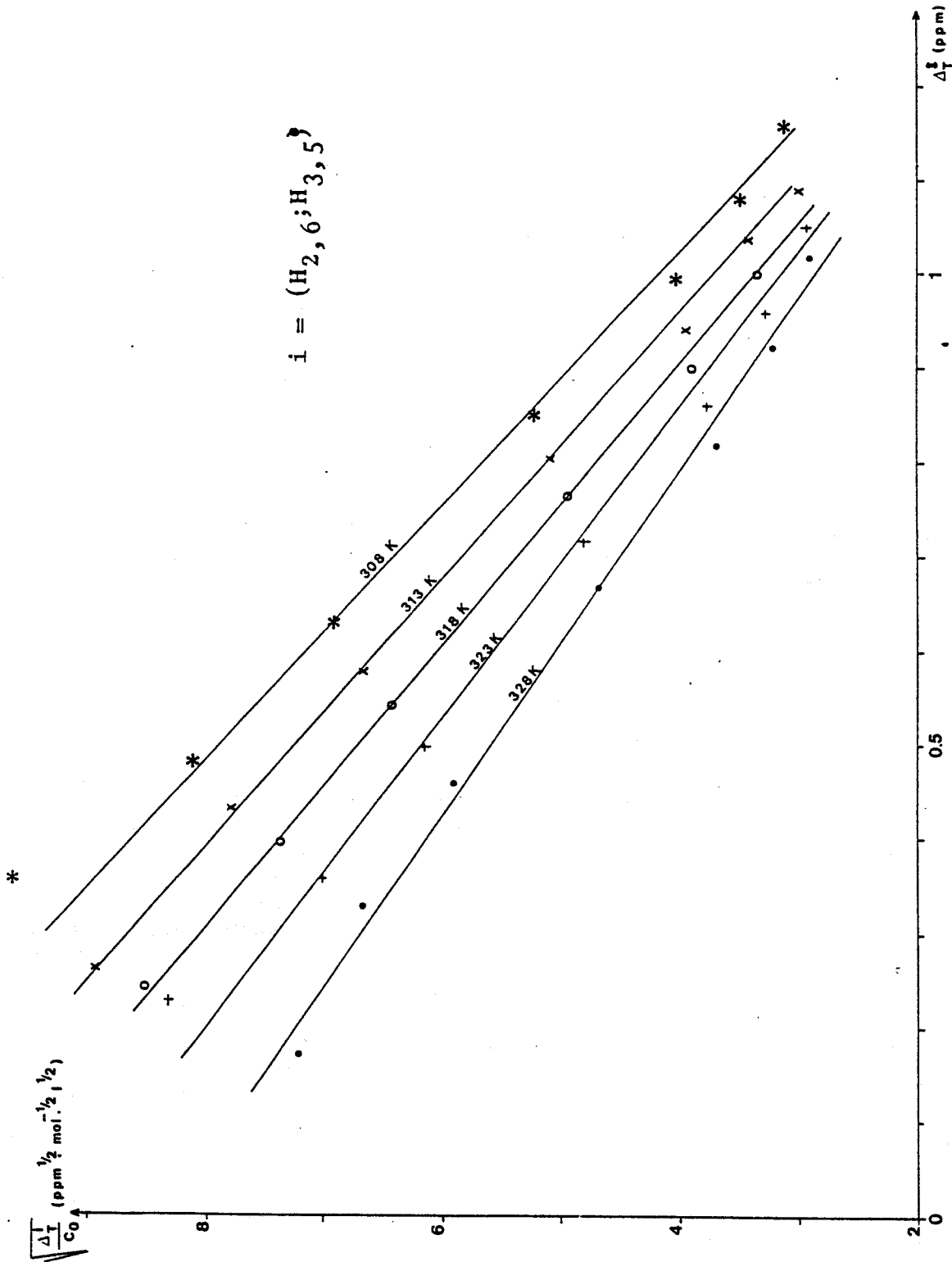


Figure IV-12:

Déplacement chimique induit ( $\Delta_T^i$ ) de la N-acétyltyrosine en fonction de  $\sqrt{\Delta_T^i / C_0}$  à différentes températures.



T (K)		H-2,6 ; H-3,5	$\beta$ CH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub>
308	r (a)	- 0,9981	- 0,9995	- 0,9964
	K(1, mole <sup>-1</sup> )(b)	92,3 ( $\pm$ 7,7)	67,9 ( $\pm$ 3,0)	73,5 ( $\pm$ 8,3)
	$\Delta_{PT}^i$ (ppm)(b)	1,53 ( $\pm$ 0,4)	2,24 ( $\pm$ 0,3)	0,44 ( $\pm$ 0,02)
313	r	- 0,9971	- 0,9982	- 0,9924
	K	74,3 ( $\pm$ 7,5)	56,23 ( $\pm$ 4,5)	62,1 ( $\pm$ 10,0)
	$\Delta_{PT}^i$	1,54 ( $\pm$ 0,5)	2,26 ( $\pm$ 0,6)	0,44 ( $\pm$ 0,03)
318	r	- 0,9982	- 0,9986	- 0,9962
	K	67,1 ( $\pm$ 5,4)	51,43 ( $\pm$ 3,5)	61,1 ( $\pm$ 7,0)
	$\Delta_{PT}^i$	1,51 ( $\pm$ 0,40)	2,2 ( $\pm$ 0,6)	0,42 ( $\pm$ 0,02)
323	r	- 0,9976	- 0,9983	- 0,993
	K	55,5 ( $\pm$ 8,4)	44,27 ( $\pm$ 3,30)	51,8 ( $\pm$ 7,8)
	$\Delta_{PT}^i$	1,51 ( $\pm$ 0,60)	2,19 ( $\pm$ 0,60)	0,43 ( $\pm$ 0,02)
328	r	- 0,9965	- 0,9975	- 0,9897
	K	45,4 ( $\pm$ 4,80)	37,65 ( $\pm$ 3,30)	44,8 ( $\pm$ 8,2)
	$\Delta_{PT}^i$	1,52 ( $\pm$ 0,60)	2,19 ( $\pm$ 0,8)	0,42 ( $\pm$ 0,03)
	$\Delta H^\circ$ (c) (KJ.mole <sup>-1</sup> )	- 28,9 ( $\pm$ 0,4)	- 23,8 ( $\pm$ 0,3)	- 19,6 ( $\pm$ 0,3)
	$\Delta S^\circ$ (c) (J.mole <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	- 53,9 ( $\pm$ 1,2)	- 42,3 ( $\pm$ 1,1)	- 28,0 ( $\pm$ 1)

Tableau IV-4:

Valeurs des différentes constantes liées à la complexation de la N-acétyltyrosine par la TMePyPH<sub>2</sub>.

- a) coefficient de corrélation entre les grandeurs  $\Delta_{PT}^i$  et  $\sqrt{\frac{\Delta_{PT}^i}{C_0}}$ .
- b) K = constante de complexation;  $\Delta_{PT}^i$  = déplacement chimique limite induit des protons H<sub>2,6;3,5</sub>;  $\beta$ CH<sub>2</sub>; CH<sub>3</sub> dans le complexe PT en fonction de la température.
- c) Paramètres thermodynamiques caractérisant le complexe.



La méthode de CHUCHE et BOUQUANT ne peut donner de valeurs de  $\Delta_{TP}^i$  et de K suffisamment fiables que dans des cas où le facteur de saturation (s) est compris entre 0,2 et 0,18.

$$\text{Or } s = \frac{\Delta_{TP}^i}{\Delta_{TP}^i} = (2 K Co + 1 - \sqrt{4 K Co + 1}) / 2 K Co$$

ce qui correspond à des valeurs de  $K_1$ , Co comprise entre 0,3 et 20. Nos résultats vérifient ces considérations dans le cas où Co est inférieur à  $10^{-1}$  M. Par conséquent, les erreurs sur K et  $\Delta_{TP}^i$  sont minimisées. Les valeurs expérimentales sont donc proches des valeurs réelles des constantes d'association pour ce complexe.

Ces constantes d'association dépendent également de la température. Ainsi on remarque qu'une augmentation de la température favorise la dissociation du complexe (K diminue) mais n'affecte pas  $\Delta_{TP}^i$ . Ceci suggère que la géométrie du complexe est indépendante de la température.

Cette étude en fonction de la température permet également de déterminer l'enthalpie et l'entropie de dissociation qui caractérise la complexation à partir de l'équation d'Arrhénius.

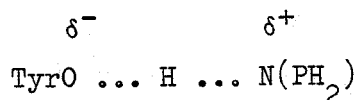
$$\text{En effet } \Delta G^\circ(T) = - RT \text{ Log}(K) = \Delta H^\circ - T \Delta S^\circ$$

$$\text{Soit } \text{Log}(K) = - \frac{\Delta H^\circ}{RT} + \frac{\Delta S^\circ}{R}$$

La figure IV-13 présente les variations de Log K en fonction de  $1/T$  pour les différents protons de la N-acétyltyrosine.

Le tableau IV-4 récapitule les paramètres thermodynamiques ( $\Delta H^\circ$ ,  $\Delta S^\circ$ ) liés à ces protons.

Les faibles valeurs de constante d'association (par exemple  $K = 67,1 \pm 5,4 \text{ l.mole}^{-1}$  pour les protons aromatiques de la N-acétyltyrosine à  $T = 318^\circ\text{K}$ ) semblent indiquer que l'association entre la porphyrine et ce substrat fait intervenir une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle de la tyrosine et les azotes centraux du cycle porphyrinique :



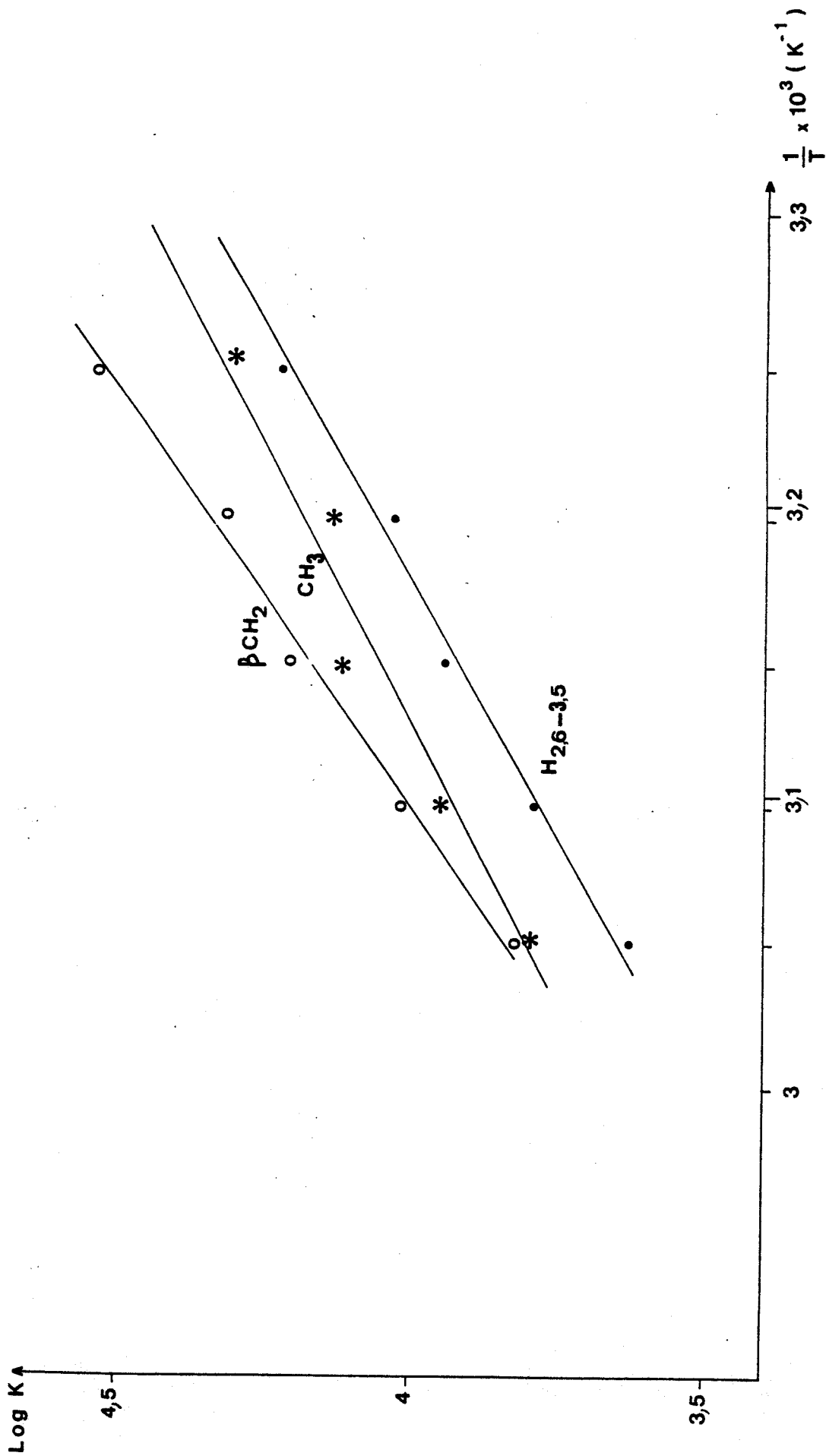


Figure IV-13:

Evolution de  $\log(K)$  en fonction de  $\frac{1}{T}$  :

En effet ces valeurs sont sensiblement les mêmes que celles observées par d'autres auteurs (10 - 11) dans le cas d'association du même genre sur des systèmes analogues. Par contre pour des complexations de type  $\pi - \pi$  PASTERNAK (12) a montré que dans le cas des complexes TMePyPH<sub>2</sub>/nucléobase la constante d'association était relativement élevée :  $K \simeq 500 - 3000 \text{ l.mole}^{-1}$ .

Si l'on considère les déplacements chimiques induits des protons de la N-acétyltyrosine complexée on remarque que ce sont principalement les protons aromatiques et  $\beta\text{CH}_2$  qui sont les plus influencés par la complexation. Le site de complexation réside essentiellement au niveau du cycle aromatique de ce substrat. En contrepartie, on remarque que les protons  $\text{CH}_3$  sont peu influencés par la complexation puisque  $\Delta_{\text{TP}}^i$  est faible. Ceci peut expliquer les écarts importants avec la linéarité lorsqu'on reporte  $\log K$  en fonction de  $1/T$  pour ces protons.

L'équivalence magnétique observée au cours de la complexation pour les protons aromatiques peut s'expliquer également par ce type d'interaction. En effet, la liaison hydrogène va diminuer l'effet inductif du groupement hydroxyle et les protons  $\text{H}_{3,5}$  proches de celui-ci vont résonner à des champs magnétiques équivalents à ceux des protons 2,6.

De même, la proximité du cycle porphyrinique va induire un effet de blindage sur les protons aromatiques de la tyrosine.

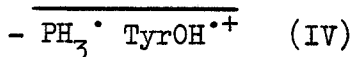
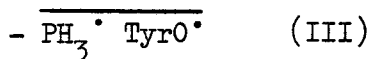
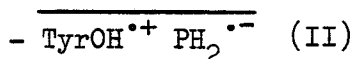
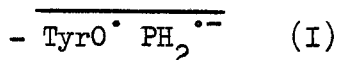
La TAPPH<sub>2</sub> et la TPPSH<sub>2</sub> ainsi que la ZnTMePyP montrent également ce type d'association. Toutefois nous n'avons pas cherché à déterminer les constantes d'association avec la N-acétyltyrosine pour ces composés. Celle-ci devrait être du même ordre de grandeur que celles déterminées précédemment pour les porphyrines cationiques. Toutefois, en ce qui concerne la TPPSH<sub>2</sub>, il est plus difficile de se prononcer du fait de la dimérisation de ce composé en solution.

#### b) Origine des polarisations

Par analogie avec les travaux de KAPTEIN et al. (7,8) et ceux de MARUYAMA et al. (16) nous pouvons prévoir dans notre étude que les

polarisations observées sur la TyrOH sont dues à la formation des espèces intermédiaires suivantes : TyrO<sup>•</sup> ou/et TyrOH<sup>•+</sup>.

Dans ce cas la paire radicalaire centrale peut se présenter sous quatre formes :



Pour pouvoir expliquer la provenance des polarisations sur TyrOH, il est nécessaire de connaître les paramètres magnétiques des différents radicaux qui constituent les paires proposées ci-dessus.

En ce qui concerne le radical tyrosyle (TyrO<sup>•</sup>), son facteur g est estimé à 2,0046 (17).

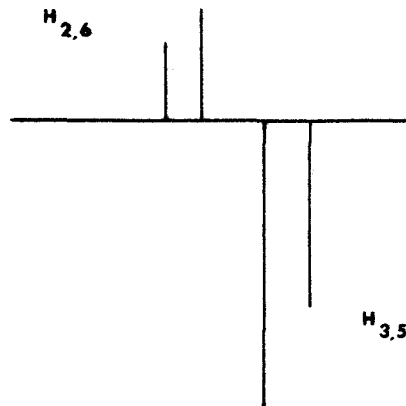
Les constantes de couplage hyperfin sont  $a_{\text{H}_3} = a_{\text{H}_5} = - 6,15 \text{ G}$  ;  $a_{\text{H}_6} = a_{\text{H}_2} = + 1,5 \text{ G}$  et  $a_{\text{H}_\beta} = + 7,7 \text{ G}$ .

Les paramètres magnétiques du radical cation TyrOH<sup>•+</sup> ne sont pas connus. Par similitude avec le radical cation du p-crésol (18) on peut toutefois estimer son facteur g à 2,0031 et ses constantes de couplage hyperfin aux valeurs suivantes :  $a_{\text{H}_3} = a_{\text{H}_5} = - 4,5 \text{ G}$  ;  $a_{\text{H}_2} = a_{\text{H}_6} = + 0,05 \text{ G}$ .

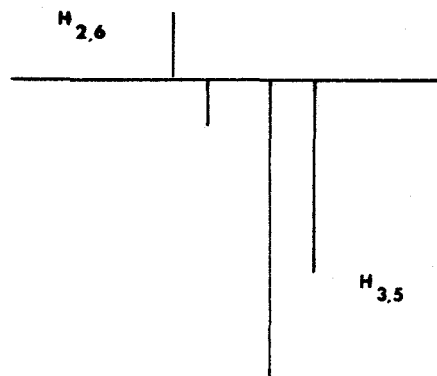
Dans le cas des porphyrines, comme nous l'avons expliqué dans le chapitre précédent, les facteurs g des radicaux anions et neutres sont inférieurs à 2,003.

Selon ces considérations, dans le cas d'un effet net, nous devrions obtenir des polarisations inverses pour les protons H<sub>2,6</sub> et H<sub>3,5</sub> pour toutes les paires de radicaux considérées lorsque celles-ci sont prises séparément. En fait KAPTEIN et al. (19 -20) ont pu montrer que les protons H<sub>2,6</sub> ne sont pas polarisés par voie directe à cause de leur faible constante de couplage hyperfin dans les radicaux neutre et cation de la

tyrosine. Toutefois, selon ces auteurs, les polarisations sur les protons  $H_{2,6}$  sont obtenues par voie indirecte au cours d'un transfert de polarisation à partir des protons  $H_{3,5}$ . Ce transfert se fait avec inversion du signe de la polarisation. Ainsi lors de l'irradiation de la N-acétyltyrosine en présence de flavine (19), KAPTEIN observe les polarisations suivantes sur les protons aromatiques de TyrOH :



Par contre, dans le cas de notre système TMePyPH<sub>2</sub>/TyrOH nous observons un effet de multiplet sur les protons  $H_{2,6}$  (A/E).

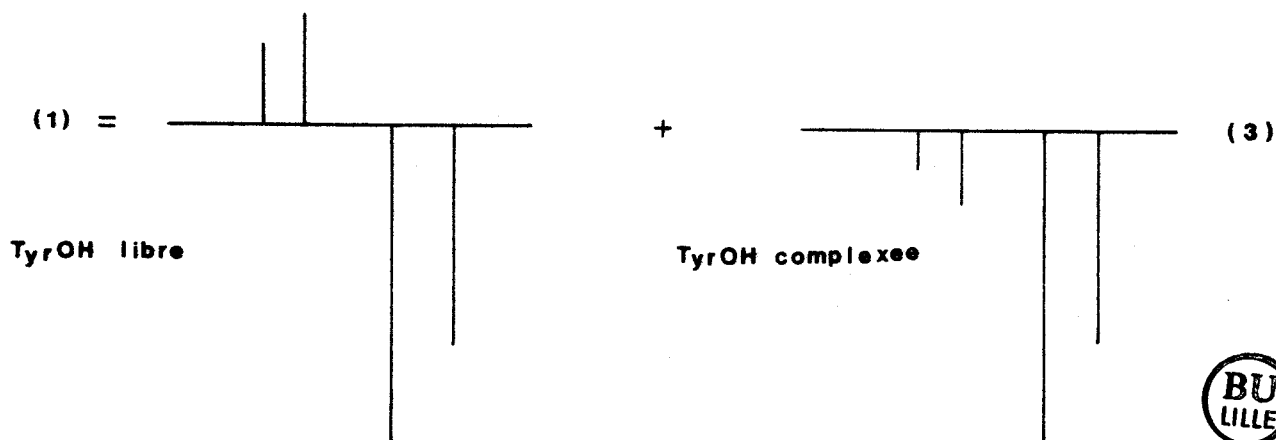


(1)

Ces polarisations peuvent s'expliquer de deux façons différentes :

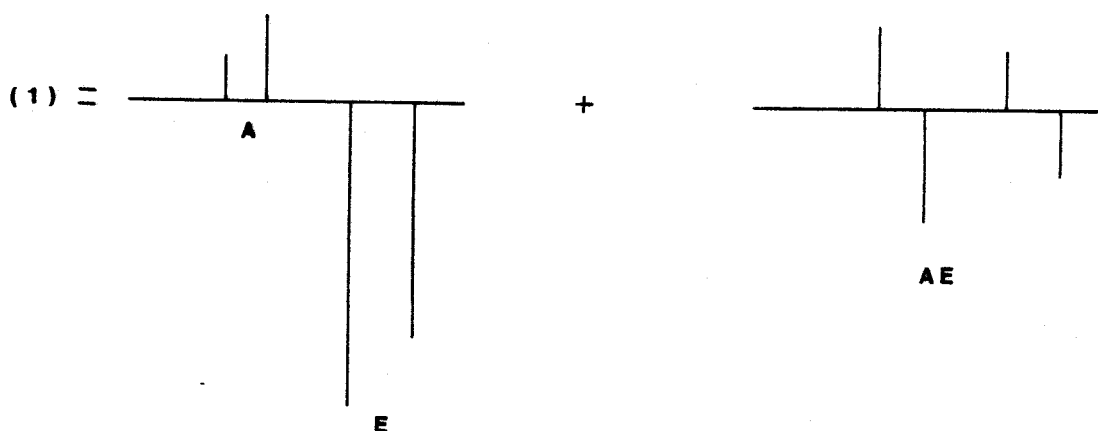
- la première consiste à envisager une superposition des polarisations provenant à la fois de la tyrosine libre et de la tyrosine complexée. KAPTEIN (8) a montré que dans le cas d'une tyrosine partiellement immobilisée dans les protéines, le transfert de polarisation entre les protons  $H_{3,5}$  et  $H_{2,6}$  se fait avec rétention du signe de la polarisation. Si l'on suppose qu'un effet identique peut être obtenu lors de

l'irradiation du complexe  $\text{TMePyPH}_2/\text{TyrOH}$  nous devrions obtenir les spectres de CIDNP suivants :



Nous avons également remarqué que le spectre de CIDNP du système  $\text{TMePyPH}_2/\text{TyrOH}$  pris à basse température ( $T = 278^\circ \text{K}$ ) montre un élargissement ou un dédoublement des polarisations des raies du spectre des protons aromatiques de TyrOH (figure IV-5c). Ce résultat semble en accord avec le schéma (3). L'abaissement de température diminue la vitesse d'échange entre tyrosine libre et tyrosine complexée, ce qui pourrait permettre de visualiser les deux espèces.

- la seconde est d'envisager une superposition d'un effet net et d'un effet de multiplet : E + AE pour  $\text{H}_{3,5}$  et A + AE pour  $\text{H}_{2,6}$ . Soit le schéma suivant :



Normalement, pour obtenir un effet de multiplet il faut que les facteurs  $g$  des deux partenaires de la paire soient égaux, ce qui n'est pas le cas pour les paires de radicaux que nous proposons. Toutefois, SCHILLING (21) a pu observer des effets de multiplet lors de l'irradiation de différents phénols en présence de benzophénone bien que les radicaux responsables de ces polarisations aient des facteurs  $g$  très différents. L'effet de multiplet est le plus marqué, selon cet auteur sur les protons les moins polarisés ; c'est-à-dire sur les protons possédant de faibles constantes de couplage hyperfin et qui sont voisins de protons possédant de fortes constantes de couplage hyperfin. Nous sommes dans un cas similaire si l'on compare les constantes de couplage hyperfin de  $H_{2,6}$  et  $H_{3,5}$  de la tyrosine.

KAPTEIN et al. (22) ont récemment démontré que même pour un angle de pulse de  $90^\circ$  il était possible d'observer des effets de multiplet à cause de l'inhomogénéité du champ de radio-fréquence (normalement pour cet angle de pulse seuls les effets nets sont restitués (23)). Ces auteurs ont également observé dans le cas du système tyrosine/flavine que l'on pouvait restituer la part relative à l'effet net et à l'effet de multiplet par addition et soustraction de spectres de CIDNP pris à des angles de pulse de  $45^\circ$  et  $135^\circ$ . Bien que l'utilisation de cette technique nous ait donné un résultat négatif nous ne pouvons pas exclure la possibilité d'un effet de multiplet. En effet, à 80 MHz, la tyrosine présente un spectre d'un système fortement couplé (AA'BB') puisque

$$J/\Delta\delta = J_{H_{3,5}-H_{2,6}} / |\delta_{H_{3,5}} - \delta_{H_{2,6}}| \simeq 0,5.$$

Or KAPTEIN montre que dans le cas de systèmes fortement couplés seule la RMN bidimensionnelle permet d'observer ces effets. Notre appareil n'étant pas adapté pour utiliser cette technique, nous n'avons pas pu vérifier par cette méthode notre seconde hypothèse.

Afin d'expliquer la provenance des différentes paires de radicaux proposées, nous allons porter la discussion sur l'aspect énergétique de la formation de ces paires. Nous observons des polarisations dans toute

la gamme de pD. Le fait que la tyrosine soit polarisée à des valeurs de pD > 11 plaide en faveur d'un transfert d'électron puisque la tyrosine à ces valeurs de pD est sous forme d'ion tyrosinate ( $\text{TyrO}^-$ ) ( $\text{pK}_{\text{TyrOH}} \approx 10,4$  (24)). L'arrachement d'hydrogène n'est plus possible dans ce cas. De même, si l'on considère l'équation de REHM et WELLER (cf chapitre III), on peut calculer le pD à partir duquel le transfert d'électron est thermodynamiquement possible. D'après les résultats exposés dans le chapitre III les potentiels de réduction des porphyrines hydrosolubles sont respectivement de - 0,55 ; - 0,67 et - 1,06 V pour la  $\text{TMePyPH}_2$ , la  $\text{TAPPH}_2$  et la  $\text{TPPSH}_2$  par rapport à l'électrode au calomel saturé. BRABEC et MORNSTEIN (25) ont montré que le potentiel d'oxydation de  $\text{TyrOH}$  variait entre 0,6 V et 1 V par rapport à cette même électrode en passant d'un pH acide à un pH basique. Ces résultats sont conformes à ceux proposés par d'autres auteurs (24 - 26). A partir des données relatives à ces différentes publications, le potentiel d'oxydation peut s'exprimer comme suit :

$$E = E^\circ + 0,058 \text{ Log}(K_{\text{TyrOH}} + (\text{H}^+))$$

$$\text{où } \text{pK}_{\text{TyrOH}} = 10,4 \text{ (24) , } E^\circ \approx 1,2 \text{ V (26)}$$

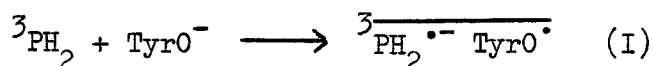
L'énergie des états excités triplet de ces porphyrines est située à 1,44 eV (cf chapitre III).

Si l'on suppose que l'état réactif des porphyrines est un état triplet, ce qui est vraisemblable d'après les résultats présentés dans le chapitre III, le transfert d'électron ne devient énergétiquement favorable qu'à partir de valeurs de pD supérieures à 4,8 ; 6,9 et 13,6 en ce qui concerne respectivement la  $\text{TMePyPH}_2$ , la  $\text{TAPPH}_2$  et la  $\text{TPPSH}_2$ . Puisque nous observons des polarisations sur  $\text{TyrOH}$  pour des valeurs de pD inférieures à ces bornes, on peut s'attendre à ce que différentes paires soit à l'origine de la réactivité de ce composé. En particulier, on peut supposer que l'énergie de l'état excité du couple  $\text{PH}_2 \text{---TyrOH}$  soit supérieure à celle de l'état triplet de  $\text{PH}_2$ , ce qui aurait pour effet d'abaisser la valeur relative des pD à partir desquels le transfert électronique est favorable. Puisque nous observons que l'intensité des polarisations sur  $\text{TyrOH}$  diminue

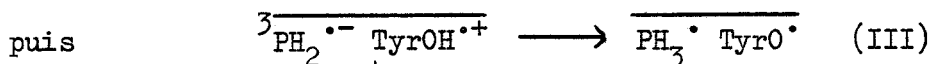
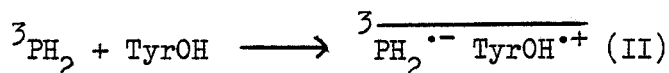


fortement au fur et à mesure que le pD augmente (figure IV-4), on peut s'attendre à ce que le complexe soit à l'origine de la formation des paires de radicaux en milieu acide ou neutre. Ceci ne peut s'expliquer par un transfert d'électron entre  $\text{PH}_2$  et TyrOH libre puisque celui-ci serait d'autant plus favorisé que le pD deviendrait basique. Les polarisations sur TyrOH seraient alors plus intenses en milieu basique. Ces différentes considérations nous amènent à proposer différentes voies de formation des paires :

- en milieu basique ( $\text{pD} > \text{pK}_{\text{TyrOH}}$ ) la seule possibilité est un transfert d'électron entre l'ion tyrosinate et la porphyrine.



- pour  $\text{pD} < \text{pK}_{\text{TyrOH}}$  ; dans le cas où le transfert d'électron est énergétiquement possible :

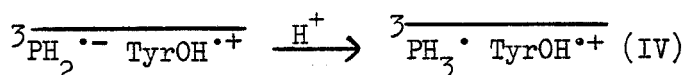


Le transfert de proton est favorisé en milieu neutre ou acide puisque le pK du couple  $\text{PH}_3 \cdot / \text{PH}_2 \cdot^-$  est supérieur à celui du couple  $\text{PH}_3^+ / \text{PH}_2$  (27). Le transfert de proton peut se faire à partir de la tyrosine puisque le radical cation de ce composé est susceptible de se déprotonner facilement ( $\text{pK}_{\text{TyrOH} \cdot^+ / \text{TyrO} \cdot} < 0$  (28)).

- pour  $\text{pD} < 7$  ; dans le cas où le transfert d'électron n'est plus possible énergétiquement :

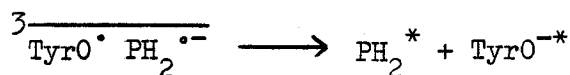


en milieu acide



Les polarisations observées en fonction du pD sur  $\text{PH}_2$  et  $\text{TyrOH}$  peuvent s'expliquer à partir de ces différentes paires :

- en milieu basique, elles sont créées par retour inverse de l'électron



et



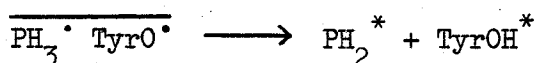
$\text{PH}_2^{\bullet-}$  est le seul radical de la porphyrine créé en milieu basique.

Celui-ci, par réaction d'échange, perd sa polarisation (cf chapitre III).

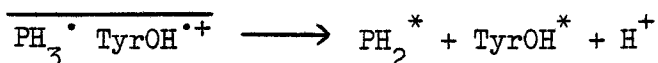


C'est pourquoi nous observons un effet de "broadening" sur  $\text{PH}_2$  en milieu basique.

- en milieu acide, elles sont créées par dismutation des radicaux

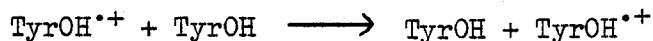


ou par retour inverse de l'électron et libération de  $\text{H}^+$



Dans ce cas les polarisations sur  $\text{PH}_2$  peuvent persister car la réaction d'échange n'est plus possible.

La diminution des polarisations sur  $\text{TyrOH}$  en passant d'un milieu acide à un milieu basique suggère également que le radical cation de ce substrat perd une partie de ces polarisations par une réaction d'échange.

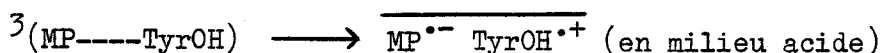
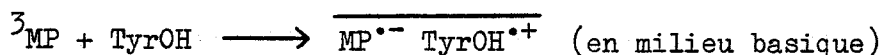


Ce genre de réaction a déjà été observé sur des systèmes analogues (29).

Nous ne tenons pas compte dans notre étude des polarisations créées par les radicaux diffusants car celles-ci sont généralement atténuées par des phénomènes de relaxation (cf chapitre III).

La  $\text{ZnTMePyP}$  et la  $\text{PdTMePyP}$  induisent également des polarisations sur la tyrosine pendant irradiation. Toutefois dans ces cas particuliers, ces porphyrines ne sont pas polarisées en milieu acide. De même,

les polarisations obtenues sur la tyrosine sont moins intenses que celles induites par la porphyrine non métallée. Puisque dans ce cas, on forme également un complexe entre porphyrine et tyrosine, les seules réactions possibles sont les suivantes :



Les polarisations sur les produits sont également obtenues par retour inverse au sein de la paire. Le transfert de proton n'est plus possible dans ce cas. Par analogie avec la discussion proposée ci-dessus nous ne devrions pas obtenir de polarisations sur la porphyrine métallée. De même la TyrOH doit montrer des polarisations moins importantes puisque dans ce cas  $\Delta g$  est faible d'après les valeurs présentées au début de ce paragraphe (les effets nets seraient moins intenses).

Certains auteurs (30 - 31 - 32) ont proposé que la photooxydation de dérivés de la tyrosine en présence d'éosine ou de lumiflavines faisait intervenir une réaction d'arrachement d'hydrogène. L'un de leurs arguments repose sur l'absence de réactivité observée avec la méthoxy-4 phénylalanine, qui ne possède pas de proton phénolique échangeable et qui est difficilement oxydable. Nous n'avons pas observé non plus d'effets de CIDNP sur ce composé en présence de porphyrine. Toutefois, nous ne pensons pas que cette constatation permette d'exclure la possibilité d'une réaction d'échange électronique.

En effet TyrOH et TyrOMe semblent avoir des potentiels d'oxydation très différents. Ainsi VOGELMANN et al. (33) qui ont étudié la réduction des états triplets de la thionine par différents donneurs d'électrons n'ont observé aucune réaction avec l'anisole contrairement à d'autres di- ou triméthoxybenzènes dont les potentiels d'oxydation étaient inférieurs à 1,5 V par rapport à l'électrode au calomel saturé. On peut donc s'attendre à ce que l'anisole ait un potentiel d'oxydation supérieur à cette limite.

En effet, EBERSON (34) reporte un potentiel d'oxydation de 1,67 V pour ce composé par rapport à l'électrode au calomel saturé dans un mélange acétate de sodium/ acide acétique glacial. Ces constatations semblent ainsi indiquer que le potentiel d'oxydation de l'anisole est bien supérieur à celui du phénol (35). Par comparaison avec ces composés, on peut s'attendre à ce que cette différence soit du même ordre entre TyrOH et TyrOMe, justifiant ainsi que le transfert électronique ne soit pas énergétiquement favorable avec ce dernier dérivé et les porphyrines étudiées.

Or l'interprétation donnée par les auteurs cités plus haut reposait sur la comparaison des potentiels d'ionisation de ces différents composés qui seraient sensiblement les mêmes comparés à ceux de l'anisole et du p-crésol (36). Par la suite, les relations empiriques du type de celle utilisée par SEKI et al. (37) qui relie les potentiels d'oxydation aux potentiels d'ionisation donnent des résultats erronés quant à la valeur du potentiel d'oxydation. Ainsi ces auteurs proposent une valeur de 1,62 V pour la tyrosine qui est relativement éloignée de celles proposées dans la littérature (24 - 25).

Toutefois même si l'on envisage un transfert d'électron dans ce cas, il n'y a pas de proton libre sur le radical  $\text{TyrOCH}_3^{\bullet+}$  par rapport au radical  $\text{TyrOH}^{\bullet+}$ . Cette remarque peut mettre en évidence l'importance du transfert de proton au cours des réactions que nous avons étudiées. Celui-ci serait à l'origine des polarisations sur TyrOH.

Appliquons à présent les règles de KAPTEIN aux polarisations observées sur les porphyrines et la tyrosine.

Quelle que soit la nature des paires proposées, nous avons toujours :

-  $g$  (radical dérivé de TyrOH)  $>$   $g$  (radical dérivé de  $\text{PH}_2$ )

$$(g_{\text{TyrOH}^{\bullet+}} \simeq 2,0031 \quad ; \quad g_{\text{TyrO}^{\bullet}} \simeq 2,0046 \quad ; \quad g_{\text{PH}_2^{\bullet+}} \text{ et } \text{PH}_3^{\bullet} < 2,003)$$

-  $\epsilon > 0$  puisque les polarisations proviennent de réactions de cage (réactions réversibles)

-  $a_{\text{H}_{2,6}} > 0$  ;  $a_{\text{H}_{3,5}} < 0$  ;  $a_{\text{H}_\beta} > 0$

i) Cas de la tyrosine

$$- \text{ Pour l'effet net } \Gamma_{ne} = \mu \cdot \epsilon \cdot \Delta g \cdot a_i$$

$$\Gamma_{ne}(H_{3,5}) = (E) = - = \mu \cdot + \cdot + \cdot - = - \mu$$

$$\Gamma_{ne}(H_{2,6}) = (A) = + = \mu \cdot + \cdot + \cdot + = + \mu$$

Soit  $\mu = +$  ; un état triplet est compatible avec la nature des polarisations observées. La polarisation sur les protons  $\beta\text{CH}_2$  confirme également ce résultat.

$$- \text{ Pour l'effet de multiplet } \Gamma_{ne}(i,j) = \mu \cdot \epsilon \cdot a_i \cdot a_j \cdot \sigma_{ij} \cdot J_{ij}$$

Appliquons cet effet aux protons les moins polarisés (donc de  $a_H$  plus faible) puisque ce sont ceux-ci qui montreront un effet de multiplet le plus marqué conformément aux arguments développés par SCHILLING (21).

Dans le cas de TyrOH il s'agit des protons  $H_{2,6}$ .

Les différents paramètres prennent les signes suivants :

$$\cdot a_i = a_{H_{2,6}} > 0 ; a_j = a_{H_{3,5}} < 0$$

$$\cdot \sigma_{ij} = + \text{ (ces protons sont situés sur le même radical)}$$

$$\cdot J_{ij} = + \text{ pour un couplage ortho}$$

$$\cdot \Gamma_{me}(H_{2,6}) = AE = -$$

$$\text{ Soit } \Gamma_{me}(H_{2,6}) = - = \mu \cdot + \cdot + \cdot - \cdot + \cdot + = - \mu \text{ d'où } \mu = +$$

L'effet de multiplet observé est donc également compatible avec la participation de l'état excité triplet des porphyrines.

ii) Cas des porphyrines TMePyPH<sub>2</sub> et TAPPH<sub>2</sub>

Prenons l'exemple du proton  $H_b$  qui montre un effet E + AE

$$- \text{ Pour l'effet net } \Gamma_{ne}(H_b) = (E) = \mu \cdot \epsilon \cdot a_{H_b} \cdot \Delta g = + \cdot + \cdot a_{H_b} - = - a_{H_b}$$

$$\text{ Soit } a_{H_b} = +$$

- Par suite pour l'effet de multiplet :

$$\Gamma_{me}(H_b) = \mu \cdot \epsilon \cdot a_{H_b} \cdot a_{H_c} \sigma_{ij} \cdot J_{ij} = + \cdot + \cdot + \cdot - \cdot + \cdot + = - = AE$$

( $a_{H_c}$  sera de signe contraire à  $a_{H_b}$  selon la règle de l'alternance des signes).

On vérifie ainsi que la polarisation sur  $H_b$  est bien celle observée sur le spectre.

De même, les polarisations observées par CIDNP  $^{13}C$  (tableau IV-3) sur la TMePyPH<sub>2</sub> et la N-acétyltyrosine sont en accord avec celles obtenues par CIDNP  $^1H$ . En effet, selon KAPTEIN, les polarisations qui proviennent d'un atome de carbone et d'un atome d'hydrogène directement lié à ce carbone doivent montrer des polarisations de signes opposés. Nos résultats sont en accord avec cette règle (i.e. pour la TMePyPH<sub>2</sub> :  $\Gamma_{ne}(C_c) = E$  ;  $\Gamma_{ne}(H_c) = A$  ; Pour la TyrOH :  $\Gamma_{ne}(C_{3,5}) = A$  ;  $\Gamma_{ne}(H_{3,5}) = E$ ). De même, dans le cas d'un composé aromatique on doit s'attendre à ce que deux atomes de carbone voisins aient des constantes de couplage hyperfin de signes opposés. L'alternance des polarisations en émission et absorption exaltée confirme ce fait (tableau IV-3).

Nous pouvons, d'après les intensités relatives de ces polarisations, indiquer que ce sont les protons pyrroliques qui possèdent la densité de spin la plus élevée dans l'intermédiaire réactionnel (i.e. PH<sub>2</sub><sup>•-</sup> ou PH<sub>3</sub><sup>•</sup>). De même on observe des polarisations intenses sur les carbones C<sub>1</sub> et C<sub>m</sub>. Ceci implique une forte densité de charge délocalisée vers les groupements pyridinyles. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces substituants sont fortement électroattracteurs.

## 2) Cas du tryptophane et de l'histidine

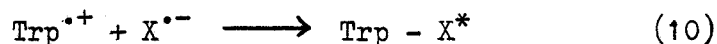
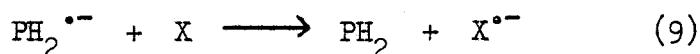
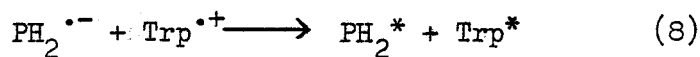
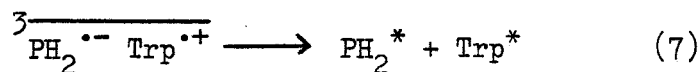
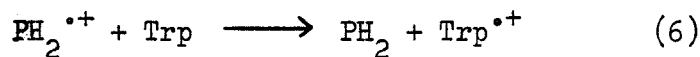
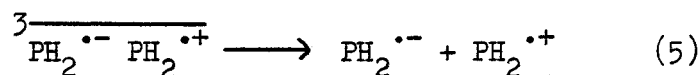
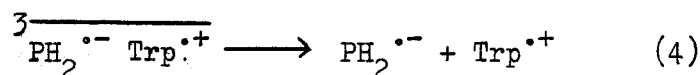
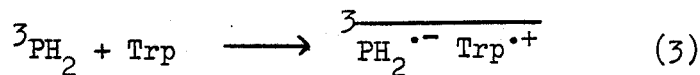
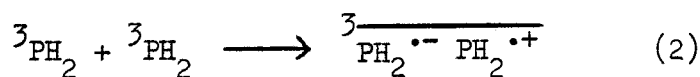
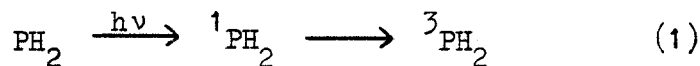
### a) Le tryptophane

Si l'on compare les polarisations que nous observons sur le N-acétyl tryptophane au cours de son irradiation en présence de TMePyPH<sub>2</sub> par rapport à celles obtenues par KAPTEIN (8) sur ce composé en présence de flavine, on remarque une inversion du signe de ces dernières. KAPTEIN propose un transfert d'électron du tryptophane vers la flavine à l'état

excité triplet comme étape primaire. Les polarisations sont alors créées par retour inverse de l'électron. Leur nature indique que  $g_{\text{Trypt}\cdot+} < g_{\text{Flavine}\cdot-}$  où  $g_{\text{Flavine}\cdot-} \approx 2,0032$ . Comme l'ont montré certains auteurs (4 - 5 - 38) la photooxydation du tryptophane se fait par l'intermédiaire de l'état excité triplet des porphyrines. Si l'on envisage un mécanisme analogue à celui proposé par KAPTEIN, on peut calculer par l'intermédiaire de l'équation de REHM et WELLER le pD à partir duquel le transfert d'électron est possible. Par analogie avec les calculs présentés dans le cas de la Tyrosine on trouve en tenant compte des variations du potentiel d'oxydation du tryptophane (24 - 25 - 26) les valeurs limites suivantes : TMePyPH<sub>2</sub> (pD  $\approx$  5,9) ; TAPPH<sub>2</sub> (pD  $\approx$  8,3) ; TPPSH<sub>2</sub> (pD > 14). Puisque les polarisations que nous observons apparaissent sensiblement à partir de ces valeurs, il est vraisemblable que l'étape photoréactionnelle primaire est un transfert d'électron. En milieu acide, on n'observe aucune polarisation sur le tryptophane ; la porphyrine montre des polarisations qui correspondent à sa photoréactivité quand elle est irradiée seule dans l'eau. Nous n'avons pas pu caractériser la nature du photoproduit qui est formé. Toutefois celui-ci peut être formé par piégeage des radicaux tryptophyles lors de leur diffusion. Ainsi dans le cas du radical cation du tryptophane on peut envisager une attaque sur le carbone C<sub>2</sub> car cette position est la plus réactive (39). Ce radical peut également se déprotonner pour former le radical neutre ( $pK_{\text{TrpH}^{+\cdot}/\text{Trp}\cdot} = 4,3$  (24)). Dans ce cas on peut également envisager une attaque en position 1 comme l'ont observé MARUYAMA et al. (40).

Comme l'ont observé BAZIN et al. (41), les radicaux cations des porphyrines peuvent réagir avec le tryptophane par des réactions de type I. Le radical cation du tryptophane ainsi formé peut ensuite réagir en solution pour conduire à la dégradation de cet acide aminé. On peut donc également envisager un transfert d'électron analogue, puisque nous avons démontré dans le chapitre III que le radical cation de la porphyrine pouvait également être formé au cours d'une réaction d'annihilation triplet-triplet. De même MARUYAMA et al. (40) indiquent également que la réaction avec le tryptophane n'a pas lieu directement avec la porphyrine mais avec son radical cation.

Selon ces considérations on peut envisager le mécanisme suivant :



Les polarisations que nous observons en début d'irradiation sur le tryptophane proviendraient essentiellement de l'étape (7) par recombinaison des radicaux ions au sein de la paire. Celles qui résultent de l'étape (8) sont atténuées par des phénomènes de relaxation. L'absence de polarisations sur la porphyrine peut s'expliquer par une réaction d'échange du type de celle proposée dans l'étape (9). Puis au cours de l'irradiation la formation d'une paire de fuite entre le radical tryptophyle et une espèce radicalaire est à l'origine des polarisations observées sur le photoproduit.

Dans le cas des polarisations créées sur le tryptophane en début d'irradiation on peut appliquer la règle de KAPTEIN pour l'effet net :

$$\Gamma_{\text{ne}}(i) = \mu \cdot \epsilon \cdot \Delta g \cdot a_i$$



Selon les travaux de Hore et al. (19) les signes des constantes de couplage hyperfin pour les protons Trp sont les suivants :

$$a_{H_4}, a_{H_6}, a_{H_2} < 0 ; a_{H_5}, a_{H_7} \approx 0 ; a_{H_8} > 0$$

$\mu = +$  (état réactif triplet)

$\epsilon = +$  (produit de cage)

Les polarisations observées sont les suivantes :

$$\Gamma_{ne}(\text{CH}_2\beta) = A = + \quad \Gamma_{ne}(\text{H}_{2,4,6}) = E = -$$

Donc :

$$\Gamma_{ne}(\text{CH}_2\beta) = + = + \cdot + \cdot \Delta g \cdot +$$

$$\Gamma_{ne}(\text{H}_{2,4,6}) = - = + \cdot + \cdot \Delta g \cdot -$$

D'où  $\Delta g = + \implies g_{\text{Trp}\cdot+} > g_{\text{PH}_2\cdot-}$

soit  $g_{\text{PH}_2\cdot-} < g_{\text{Trp}} \leq 2,003$  (8)

Par suite nous confirmons que  $g_{\text{PH}_2\cdot-} < 2,003$

L'évaluation des effets de CIDNP par les règles de KAPTEIN sur TyrOH dans le paragraphe précédent est donc justifiée.

Il est difficile de se prononcer sur la nature du(des) produit(s) formé(s) et sur les polarisations induites sur ce(s) composé(s) du fait de la superposition des signaux de CIDNP de ceux-ci avec le tryptophane. Pour pouvoir différencier les polarisations, il serait intéressant d'une part de travailler à champ plus élevé et d'autre part d'utiliser des techniques telles que la RMN 2D et la CIDNP résolue dans le temps qui permettrait de suivre la réaction au cours du temps (cf chapitre I).

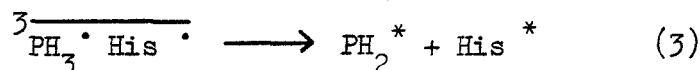
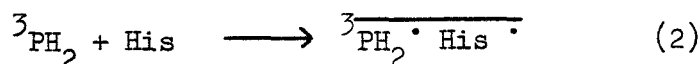
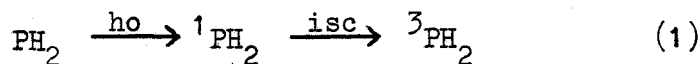
#### b) L'histidine

Un transfert d'électron entre histidine et porphyrine n'est pas envisageable d'un point de vue énergétique. En effet BRABEC et MORNSTEIN

(25) ont montré que le potentiel d'oxydation de l'histidine est supérieur à 1 V. L'énergie libre de formation de la paire de radicaux ions  $\overset{3}{\text{His}} \cdot^+ \text{PH}_2 \cdot^-$ , calculée à partir de l'équation de REHM et WELLER est positive quel que soit le pD pour toutes les porphyrines.

Par suite ce processus est endothermique. KAPTEIN et al. (8) proposent dans le cas de l'histidine un arrachement d'hydrogène comme étape photoréactionnelle primaire lors de son irradiation en présence de flavine. Leur explication est basée sur le fait qu'à partir d'un pH supérieur au  $\text{pK}_a$  de l'histidine de fortes polarisations sont observées par CIDNP, tandis que dans le cas de ce composé méthylé en position 1, aucune polarisation n'est observée dans cette gamme de PH.

Nous observons également un phénomène analogue puisque les polarisations de la N-acétyl histidine n'apparaissent qu'à partir d'un pD = 7,1 lors de son irradiation en présence de TMePyPH<sub>2</sub>. Cette valeur correspond approximativement au  $\text{pK}_a$  de ce produit ( $\text{pK}_a \approx 7,6$  (42)). On peut donc envisager un mécanisme analogue à celui proposé par ces auteurs.



Comme dans le cas du tryptophane, les espèces polarisées sont créées par un transfert inverse au sein de la paire.

Appliquons la règle de KAPTEIN pour l'effet net :

Nous avons  $a_{\text{H}_2}, a_{\text{H}_4} < 0$  (8) ;  $a_{\text{H}_\beta} > 0$  ;  $\epsilon = +$  ;  $\mu = +$

et  $\Gamma_{\text{ne}}(\text{H}_2) = \Gamma_{\text{ne}}(\text{H}_4) = \text{E}(-)$ .

Soit pour  $\Gamma_{\text{ne}}(\text{H}_4) = - = \mu \cdot \epsilon \cdot a_{\text{H}_4} \cdot \Delta g = + \cdot + \cdot - \cdot \Delta g = - \Delta g$

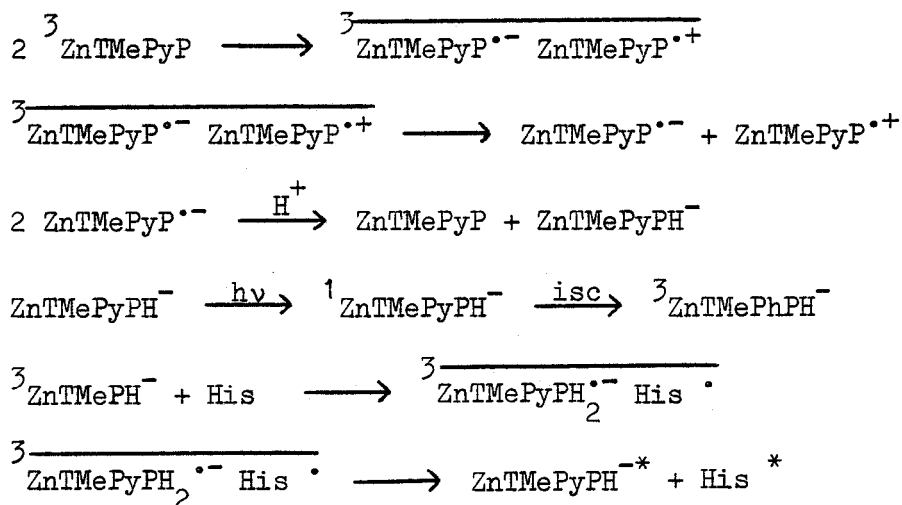
D'où  $\Delta g = - \implies g_{\text{PH}_3 \cdot} < g_{\text{His} \cdot} \ll 2,003$  (8)

Ce qui est en accord avec nos résultats précédents.

Dans le cas de la ZnTMePyP, le mécanisme semble plus complexe puisque l'arrachement d'hydrogène par la porphyrine excitée dans son état triplet est peu probable. En effet, les azotes centraux du cycle sont bloqués par l'insertion du zinc.

Nous avons montré au cours du chapitre III que les porphyrines réagissaient seules en milieu aqueux par annihilation triplet triplet pour former une paire de radicaux ions. On peut envisager un mécanisme analogue pour la ZnTMePyP. La dismutation des radicaux anions ainsi formés donnerait le dianion (43-44). Celui-ci par protonation forme l'anion d'une phlorine (44) où le proton se fixe sur un des ponts interpyrroliques du cycle (45). Cette espèce excitée pendant irradiation peut ensuite réagir pour arracher un hydrogène à l'histidine et former une paire  $\overset{3}{\text{ZnTMePyPH}_2^{\bullet-}} \text{His}^{\bullet}$ . Le retour inverse des charges au sein de la paire donnerait les espèces polarisées en solution.

Nous proposons donc le schéma réactionnel suivant :



FAJER et DAVIS (46) reportent un facteur  $g$  de 2,003 pour la  $\text{ZnTPPH}^{\bullet-}$ . Si l'on suppose que celui-ci est inférieur à celui du radical neutre de l'histidine, nous obtiendrons selon les règles de KAPTEIN pour l'effet net, des polarisations sur l'histidine en accord avec les résultats observés. L'apparition de la polarisation en émission à 6,2 ppm correspondrait au proton méthylénique de la phlorine. Toutefois, nous n'avons aucun élément de comparaison qui nous permette de justifier ce déplacement chimique.

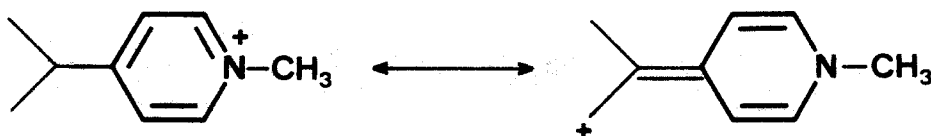
### 3) Réactivité des porphyrines

Il est difficile de comparer la réactivité des porphyrines vis-à-vis d'un substrat particulier car celles-ci ne réagissent pas toutes de la même façon. Par exemple, les porphyrines métallées réagissent principalement par un transfert d'électron en présence de tyrosine. Les dérivés non métallés réagissent également par un transfert d'électron mais celui-ci est généralement suivi d'un transfert de proton.

Les polarisations occasionnées par retour inverse de l'électron ou par dismutation sont très différentes si l'on compare leur intensité. De plus certaines porphyrines métallées contiennent en faible quantité leur forme non métallée. Nous nous sommes aperçus que c'était cette dernière qui induisait les polarisations sur le substrat pendant irradiation du mélange. Il est important de s'assurer donc de l'absence de toute trace de dérivé non métallé lors d'études du comportement photochimique des porphyrines métallées, car elle pourrait conduire à certaines interprétations erronées des résultats.

Nos résultats nous permettent d'apporter des éléments de comparaisons sur deux catégories de porphyrines. Celles non métallées et celles complexées par des ions métalliques.

Dans la première catégorie, on peut remarquer la réactivité prépondérante des porphyrines cationiques (TMePyPH<sub>2</sub>, TAPPH<sub>2</sub>) vis-à-vis des acides aminés par comparaison avec les porphyrines anioniques (TPPSH<sub>2</sub>) ou neutres (HpD-Hp). Dans le cas d'un transfert d'électron, l'énergie libre de formation de la paire de radicaux ions est reliée au potentiel d'oxydation de ces produits. Plus celui-ci sera faible, plus le transfert sera favorable vis-à-vis d'un substrat donné. Dans le cas d'une substitution du cycle en position méso par un groupement électro-attracteur tel que le cation N-méthylpyridinium, la densité des charges des azotes centraux du cycle sera délocalisée vers les substituants.

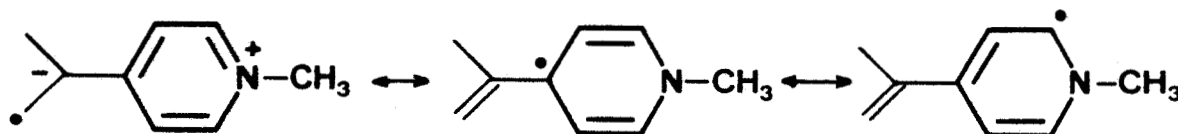


D'après HARRIMAN et al. (47), cet effet augmente le potentiel d'oxydation de la molécule et le radical cation correspondant se dismute plus facilement. En conséquence on peut supposer que la porphyrine sera facilement réductible et que son radical anion sera stabilisé.

Par contre dans le cas d'une substitution par un groupement électro-donneur tel que l'anion sulfonatophényle un effet inverse sera observé.

Dans le cas de substitution en position  $\beta$  pyrrolique les effets inductifs seront peu marqués et la densité de charge sera essentiellement portée par les azotes centraux du cycle. Le potentiel de réduction du cycle sera élevé.

Dans le cas de la formation du radical anion des porphyrines, on peut supposer que l'effet inductif du aux différents substituants du cycle va également influencer la répartition de la densité de charge électronique. Ainsi pour le radical anion de la TMePyPH<sub>2</sub> on peut envisager les formules de résonances suivantes :



La densité électronique de charge serait localisée sur la position méso et sur les substituants.

Pour la TPPSH<sub>2</sub> cet effet n'est plus possible.

Les effets de CIDNP <sup>13</sup>C et <sup>1</sup>H observés lors de l'irradiation des systèmes PH<sub>2</sub>/TyrOH indiquent qu'un tel radical peut être considéré comme intermédiaire dans la réaction.

Par CIDNP <sup>13</sup>C on observe de fortes polarisations sur les carbones méso et sur ceux du groupement pyridinium.

Par CIDNP <sup>1</sup>H, l'intensité des polarisations obtenues sur les porphyrines décroît dans le sens : TMePyPH<sub>2</sub> >> TAPPH<sub>2</sub> > TPPSH<sub>2</sub> ce qui est en accord avec les constatations établies ci-dessus.

Dans la seconde catégorie, on peut différencier la réactivité des porphyrines substituées par des ions métalliques diamagnétiques de celles substituées par des ions métalliques paramagnétiques. Les porphyrines diamagnétiques (ZnTMePyP, PdTMePyP) réagissent contrairement aux porphyrines paramagnétiques.

Ce résultat peut éventuellement s'expliquer par le fait que les porphyrines paramagnétiques possèdent des états excités triplet de faible durée de vie (43) par rapport à ceux des porphyrines diamagnétiques, ce qui ne permettrait pas l'observation des effets de CIDNP.

#### IV - CONCLUSION

L'étude par photo-CIDNP du système porphyrine/acides aminés aromatiques nous a permis de mettre en évidence des mécanismes primaires de photoréactions différents suivant la nature des acides aminés : transfert d'électron avec le tryptophane, transfert d'électron suivi d'un transfert de proton avec la tyrosine, arrachement d'hydrogène avec l'histidine.

Comme dans le cas de la guanine, les porphyrines sont photo-réduites à partir de leur état triplet. C'est la première fois que des polarisations sont observées sur les porphyrines en milieu polaire et sous irradiation lumineuse continue (état stationnaire).

Ces réactions sont généralement réversibles, sauf dans le cas du tryptophane et de l'histidine où nous avons observé la formation de différents photoproduits pendant irradiation. Dans le premier cas, il s'agirait d'un dérivé du tryptophane bien que sa structure n'ait pu être élucidée. Avec l'histidine, on formerait plutôt une phlorine selon notre hypothèse réactionnelle.

L'étude du système  $\text{PH}_2/\text{TyrOH}$  nous a permis de mettre en évidence la formation d'un complexe avant irradiation. Celui-ci résulterait d'une liaison hydrogène entre le groupement hydroxyle de la tyrosine et

des azotes centraux du cycle porphyrinique. L'irradiation de ce complexe en solution favoriserait l'induction de polarisations sur la porphyrine.

Ces résultats laissent entrevoir que la photooxydation des acides aminés aromatiques peut également intervenir par un mécanisme de type I lors de la photosensibilisation par les porphyrines : en particulier dans le cas du tryptophane où l'on observe la formation d'un photoproduit. Une autre réaction secondaire à la photooxydation des protéines est la formation de leur covalent entre ADN et protéines. En particulier, les radicaux tyrosyles ont été impliqués dans cette réaction (48).

De plus certaines études ont montré que la complexation des porphyrines par des macromolécules favorise l'action photosensibilisante des porphyrines (38 - 49). Puisque la porphyrine se complexe en présence de tyrosine et que cette complexation favorise la formation d'espèces radicalaires, on peut supposer qu'un mécanisme de type I soit à l'origine de ces réactions secondaires. Celles-ci sont importantes en photochimiothérapie des cancers puisqu'aussi bien les étapes de photooxydation des protéines que celles de formation de liaisons protéines - ADN peuvent intervenir dans l'inactivation des cellules cancéreuses.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - G. BERTOLONI, B. SALVATO, M. DALL'ACQUA, M. VAZZOLER et G. JORI  
Photochem. Photobiol. 39, 811 (1984)
- 2 - J. MOAN  
Porphyrin sensitized photodynamic inactivation of cells  
dans "Lasers in Medical Science", Eds. BAILLIERE-TINDALL,  
Vol. 1, p. 5 (1986)
- 3 - T.G. TRUSCOTT  
Photochemistry of porphyrins and bile pigments in homogeneous  
solution dans "Primary photo-processes in Biology and Medicine",  
Eds. R.V. BENSASSON, G. JORI, E.J. LAND et T.G. TRUSCOTT, Vol. 85,  
p. 309, Plenum Press . New York (1985)
- 4 - G. JORI, E. REDDI, E. ROSSI, I. COZZANI, L. TOMIO, P.L. ZORAT,  
G.B. PIZZI et F. CALZAVARA  
Med. Biol. Environ. 8, 141 (1980)
- 5 - C. SCONFIENZA, A. VAN DEVORST et G. JORI  
Photochem. Photobiol. 31, 351 (1980)
- 6 - J. MARKO  
Thèse de Doctorat ès Sciences Physiques, Université de Lille I,  
chapitre III (mai 1986)
- 7 - 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)
- 8 - R. KAPTEIN  
Spectroscopy in Molecular Biology, Ed. B. Pullman, D. Reidel,  
Dordrecht, Pays-Bas, p. 211 (1978)
- 9 - T. SATO, T. OGAWA, K. KANO  
J. Phys. Chem. 88, 3678 (1984)



- 10 - L. GUILLEUX, P. KRAUSZ, L. NADJO, R. UZAN, C. GIANNOTI  
J. Chem. Soc. Perkin Trans. II 475 (1984)
- 11 - E.I. KAPINUS, I. Y. KUCHEROVA et I.I. DILUNG  
J. Photochem. 34, 289 (1986)
- 12 - R.F. PASTERNAK, E.J. GIBBS, A. GAUDEMER, A. ANTEBI, S. BASSNER,  
L. DE POY, D.M. TURNER, A. WILLIAMS, F. LAPLACE, M.H. LANSARD,  
C. MERIENNE et M. PERREE-FAUVET  
J. Am. Chem. Soc. 107, 8179 (1985)
- 13 - J.G. HEATHCOTE, G.J. MILL, P. ROTHWELL et M.A. SLIFKIN  
Biochim. Biophys. Acta 153, 13 (1968)
- 14 - J.A. SHELNUTT  
J. Phys. Chem. 88, 6121 (1984)
- 15 - J. BOUQUANT, J. CHUCHE  
Tetrahedron Lett. 23, 2337 (1972)
- 16 - K. MARUYAMA, H. FURUTA et A. OSUKA  
Chem. Lett. 475 (1986)
- 17 - R.C. SEALY, L. HARMAN, P.R. WEST et R.P. MASON  
J. Amer. Chem. Soc. 107, 3401 (1985)
- 18 - W.T. DIXON, P.M. KOK et D. MURPHY  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 74, 1528 (1978)
- 19 - P.J. HORE, M.R. EGMOND, H.T. EDZES et R. KAPTEIN  
J. Magn. Reson. 49, 122 (1982)
- 20 - R.M. SCHEEK, S. STOBE, R. BOELEN, K. DIJKSTRA et R. KAPTEIN  
Faraday Discuss. Chem. Soc. 78, 245 (1984)
- 21 - M.L. SCHILLING  
J. Am. Chem. Soc. 103, 3077 (1981)
- 22 - R. BOELEN, A. PODOPLELOV et R. KAPTEIN  
J. Magn. Reson. 69, 116 (1986)
- 23 - A. SCHÄUBLIN, A. HÖHENER et R.R. ERNST  
J. Magn. Reson. 13, 196 (1974)

- 24 - S.V. JOVANOVIĆ, A. HARRIMAN et M.G. SIMIĆ  
J. Phys. Chem. 90, 1935 (1986)
- 25 - V. BRABEC et V. MORNSTEIN  
Biophys. Chem. 12, 159 (1980)
- 26 - J. BUTLER, E.J. LAND, W.A. PRUTZ et A.J. SWALLOW  
J. Chem. Soc. Chem. Commun., 348 (1986)
- 27 - P. NETA, A. SCHERZ et H. LEVANON  
J. Am. Chem. Soc. 101, 3624 (1979)
- 28 - W.T. DIXON, D. MURPHY  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 72, 1221 (1976)
- 29 - H.D. ROTH et M. MANION-SCHILLING  
With IUPAC Symposium on Photochemistry, p.279-282, Aix-en-Provence, 1976.
- 30 - F. RIZZUTO et J.D. SPIKES  
Photochem. Photobiol. 25, 465 (1977)
- 31 - D.B. Mc CORMICK, M.C. FALK, F. RIZZUTO, G. TOLLIN  
Photochem. Photobiol. 22, 175 (1975)
- 32 - F. RIZZUTO, J.D. SPIKES et G.D. COKER  
Photobiochem. Photobiophys. 10, 149 (1986)
- 33 - E. VOGELMANN, S. SCHREINER, W. RAUSHER et H.E.A. KRAMER  
Z. Phys. Chem. Neue Folge 101, 321 (1976)
- 34 - L. EBERSON  
J. Am. Chem. Soc. 89, 4669 (1967)
- 35 - L. EBERSON et K. NYBERG  
Adv. Phys. Org. Chem. 12, 110 (1976)
- 36 - S. PIGNATARO, A. FOFFANI, G. INNORTA et G. DISTEFANO  
Z. Phys. Chem. Neue Folge 49, 291 (1966)
- 37 - H. SEKI, A. TAKEMATSU et S. ARAI  
J. Phys. Chem. 91, 176 (1987)
- 38 - B. RÖDER et K. KRICHELDORFF  
Stud. Biophys. 114, 171 (1986)

- 39 - E.F. Mc CORD, R.R. BUCKS et S.G. BOXER  
Biochem. 20, 2880 (1981)
- 40 - A. OSUKA et K. MARUYAMA  
Chem. Lett., 1853 (1986)
- 41 - M. BAZIN et R. SANTUS  
Photochem. Photobiol. 43, 235 (1986)
- 42 - K.B. SHARPLESS, R.F. LAUER et A.Y. TERANISHI  
J. Am. Chem. Soc. 95, 6139 (1973)
- 43 - H. ELLJUL, A. HARRIMAN et M.C. RICHOUX  
J. Chem. Soc. Dalton Trans., 503 (1985)
- 44 - A. HARRIMAN  
J. Photochem. 29, 139 (1985)
- 45 - N.S. HUSH et J.R. ROWLANDS  
J. Am. Chem. Soc. 89, 2976 (1967)
- 46 - J. FAJER et M.S. DAVIS  
dans "The porphyrins", Ed. D. DOLPHIN, Vol. IV, chap. 4,  
Acad. Press - New York (1979)
- 47 - M.C. RICHOUX, P. NETA, P.A. CHRISTENSEN et A. HARRIMAN  
J. Chem. Soc. Faraday Trans. II 82, 235 (1986)
- 48 - M.G. SIMIC et M. DIZDAROGLU  
Biochem. 24, 233 (1985)
- 49 - L.I. GROSSWEINER, G.C. GOYAL  
Photochem. Photobiol. 40, 1 (1984)

CHAPITRE V

## PARTIE EXPERIMENTALE

Les spectres de RMN  $^1\text{H}$  et  $^{13}\text{C}$  présentés dans ce mémoire ont été enregistrés sur un spectromètre de RMN par transformée de Fourier (BRUKER WP-80 SY WG). Le dispositif expérimental d'irradiation est celui déjà décrit dans d'autres travaux (1).

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

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

Le schéma de ce dispositif est présenté sur la figure V-1. Nous utilisons comme source lumineuse une lampe haute pression xénon.-mercure dont la puissance est de 1000 W (ORIEL). Le faisceau lumineux émis par la lampe est focalisé par un premier condenseur en quartz (a) dans une cellule à filtre liquide (b) munie d'un circuit de refroidissement. Ce dernier permet de dissiper une grande partie de l'énergie calorifique de la source lumineuse.

Un second condenseur (c) fixé directement à la sortie de ce filtre, permet de focaliser à nouveau le faisceau lumineux sur la face d'entrée d'un guide de lumière en quartz (f). Celui-ci transmet directement la lumière à l'intérieur de la sonde (g) au niveau de la bobine de détection.

Sur le trajet optique, nous plaçons une seconde cellule de refroidissement à circulation d'eau (d) dans laquelle on place des filtres de verre (h) qui permettent de sélectionner certaines longueurs d'onde du spectre d'émission de la source lumineuse.

Un écran (e) dont l'ouverture et la fermeture sont commandées à distance permet l'acquisition des spectres de RMN avec ou sans irradiation de l'échantillon.

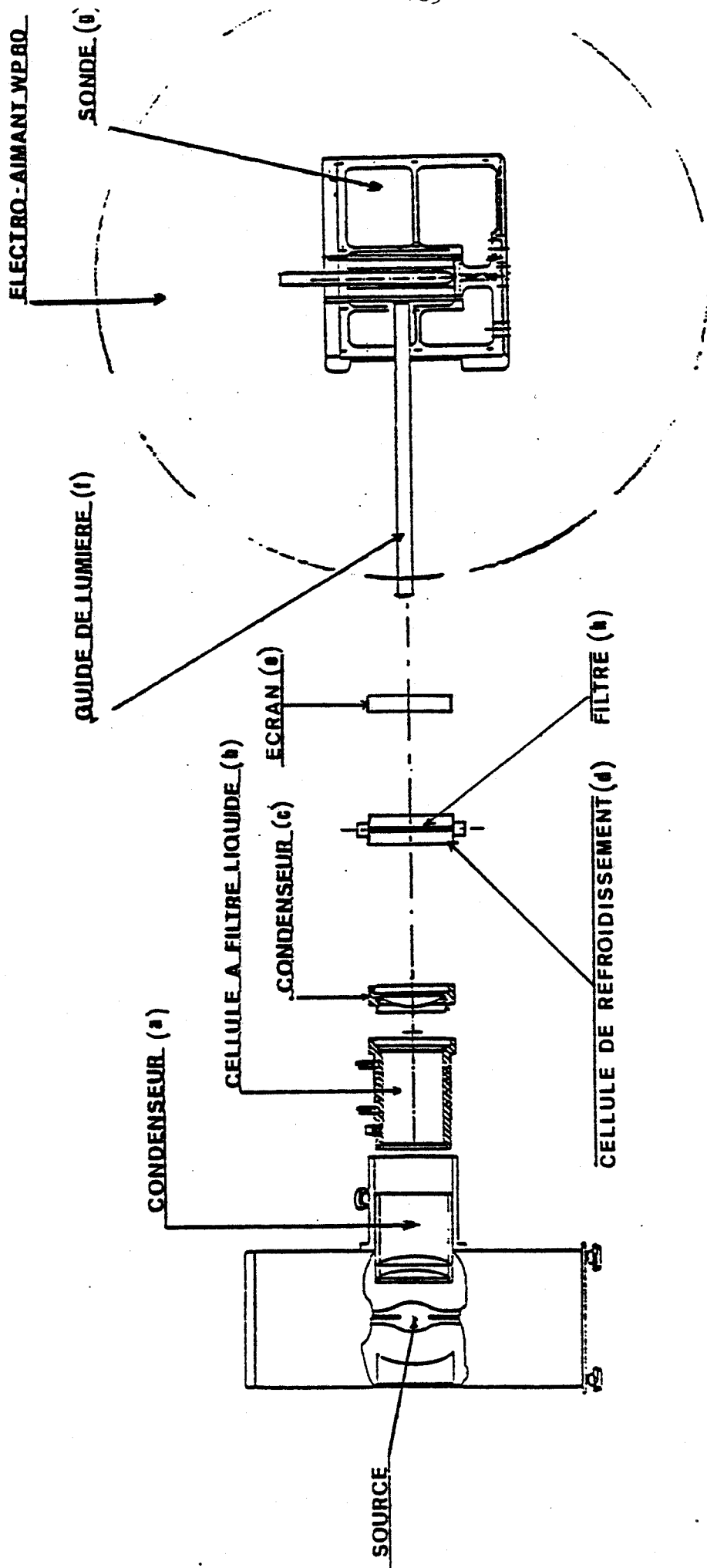


Figure V-1

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



## 2) L'enregistrement des spectres

a)  $^1\text{H}$ 

Nous utilisons une sonde spécifique opérant à 80, 130 MHz. Les tubes de RMN ont un diamètre de 5 mm et sont soit en pyrex soit en quartz. Les spectres sont obtenus à partir d'un seul FID ou résultent de 96 accumulations pour des angles de pulse de  $30^\circ$  et  $90^\circ$ . Les déplacements chimiques sont donnés par rapport au tétraméthylsilane (TMS) dans le méthanol deutéré. En solution aqueuse nous avons utilisé le diméthyl-2,2-silane-2 pentane sulfonate de sodium (DSS) comme référence ( $\delta/\text{TMS} = 0,015 \text{ ppm}$ ).

Un microprogramme nous permet d'enregistrer au bout d'un délai de 15 s six FID consécutifs (l'interval de temps séparant chaque FID est de vingt secondes). Cette méthode nous permet de suivre au cours des deux premières minutes d'irradiation l'évolution des signaux de CIDNP.

Les principaux paramètres d'acquisition des spectres sont les suivants :

Temps d'acquisition : 6,7 s  
 Délai entre deux impulsions : 0,1 s  
 Fenêtre spectrale : 1222 Hz.  
 Mode de détection : quadrature de phase  
 Résolution : 0,149 Hz/pt

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

Nous utilisons une sonde spécifique opérant à 20, 150 MHz et recevant des tubes de 10 mm.

Les spectres  $^{13}\text{C}$  résultent d'un découplage  $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$  : découplage large bande hétéronucléaire.

Les spectres obtenus pendant irradiation de l'échantillon nécessitent l'addition de 1600 ou 2000 FID. Les spectres des produits non irradiés ne montrent aucun signal apparent pour un nombre de FID identique à celui indiqué ci-dessus.

La détermination des glissements chimiques des carbones des substrats en solution est calculée par rapport au TMS en utilisant comme référence interne le dioxane ( $\delta/\text{TMS} = 67,86$  ppm).

L'attribution des signaux a été effectuée par comparaison avec des données de la littérature (les références bibliographiques sont indiquées dans les chapitres III et IV).

Les principaux paramètres d'acquisition sont les suivants :

Angle de pulse :  $25^\circ$

Temps d'acquisition : 0,68 s

Délai entre deux impulsions : 1 s

Fenêtre spectrale : 6024 Hz

Mode de détection : quadrature de phase

Résolution : 1,47 Hz/pt

La température de la sonde est réglée par une unité de température variable. Les spectres sont pris généralement à  $318^\circ\text{K}$ . Les expériences réalisées à basse température ont nécessité le passage d'azote liquide au niveau de la sonde de RMN. La température est réglée à la fois par le débit d'azote et par une résistance chauffante.

Le dégazage des solutions est obtenu en faisant buller de l'azote directement dans le tube de RMN, pour les solutions aqueuses et par des cycles "congélation - décongélation" sous pression réduite ( $10^{-5}$  mm Hg) dans des tubes de RMN adaptés, pour les solutions méthanoliques.

Le pD des solutions est ajusté à la valeur désirée par ajout de petites quantités de NaOD et DCl. Celui-ci est mesuré directement dans le tube de RMN en utilisant une électrode de mesure spéciale couplée à un pH mètre commercialisé par Spectrométrie Spin et Techniques (SST Paris).



## II - LES PRODUITS

### 1) Les porphyrines

La Protoporphyrine IX (sel disodique) et l'hématoporphyrine IX (chlorhydrate ou base libre) sont des produits SIGMA.

Le dérivé de l'hématoporphyrine est commercialisé par INTERCHIM (Montluçon).

Toutes les porphyrines synthétiques hydrosolubles et leurs dérivés métallés nous ont été gracieusement fournis par A. GAUDEMER (Université de Paris Sud - ORSAY). Elles ont été synthétisées dans son laboratoire (2). Nous avons contrôlé leur pureté par RMN.

### 2) Les agents électro-donneurs

La paraphénylène diamine, le catéchol, le pyrogallol et le glutathion sont des produits ALDRICH.

La cystéine, l'acide ascorbique et l'hydroquinone nous ont été gracieusement fournis par le Laboratoire de Chimie Organique de la Faculté de Pharmacie de Lille II.

### 3) Bases des acides nucléiques et nucléotides

Ce sont des produits ALDRICH. Les bases utilisées sont la thymine, la cytosine, l'adénine et la guanine. Leurs mononucléotides ont le groupement phosphate fixé en position 5'. Il s'agit respectivement du sel disodique de l'uridine (UMP), du sel disodique dihydraté de 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.

L'éthyl-9 guanine est un produit SIGMA.

## 4) Les acides aminés

Tous les acides aminés sont des produits SIGMA. Il s'agit de la N-acétyl L-tyrosine, de son ester éthylique, de la méthoxy-4 phénylalanine, de la N- $\alpha$ -acétyl L-histidine, du N-acétyl DL tryptophane.

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

## 5) Les solvants

Les solvants deutériés (eau (99,75 %) ; méthanol (99,5 %)) sont des produits SST.

NaOD et DCl (10 N; 99,5 %) proviennent également de chez SST.

III - METHODOLOGIE ET MESURES

## 1) Filtres optiques

Au cours de l'irradiation des systèmes porphyrines/substrats, il est nécessaire d'utiliser des filtres qui transmettent la lumière aux longueurs d'onde d'absorption des porphyrines.

Il faut également que ceux-ci puissent filtrer la lumière dans les bandes d'absorption des substrats. Auquel cas, l'irradiation directe de ces substrats (en particulier certains acides aminés tels que la tyrosine et le tryptophane) conduirait à des effets de CIDNP indépendamment de la présence des porphyrines.

Pour cela nous avons utilisé différents filtres qui permettent également d'irradier tout le spectre d'absorption des porphyrines (filtre CORNING CS-052) ou sélectionnant les bandes Q (filtre CORNING CS-751) ou bandes B (CORNING CS 273).

Les spectres de transmission de ces différents filtres sont donnés sur la figure V.2. On peut remarquer que le filtre CS 273 transmet plus de 70 % de l'intensité lumineuse pour des longueurs d'onde supérieures à 580 nm. Celles-ci sont généralement utilisées en photochimiothérapie avec les porphyrines.

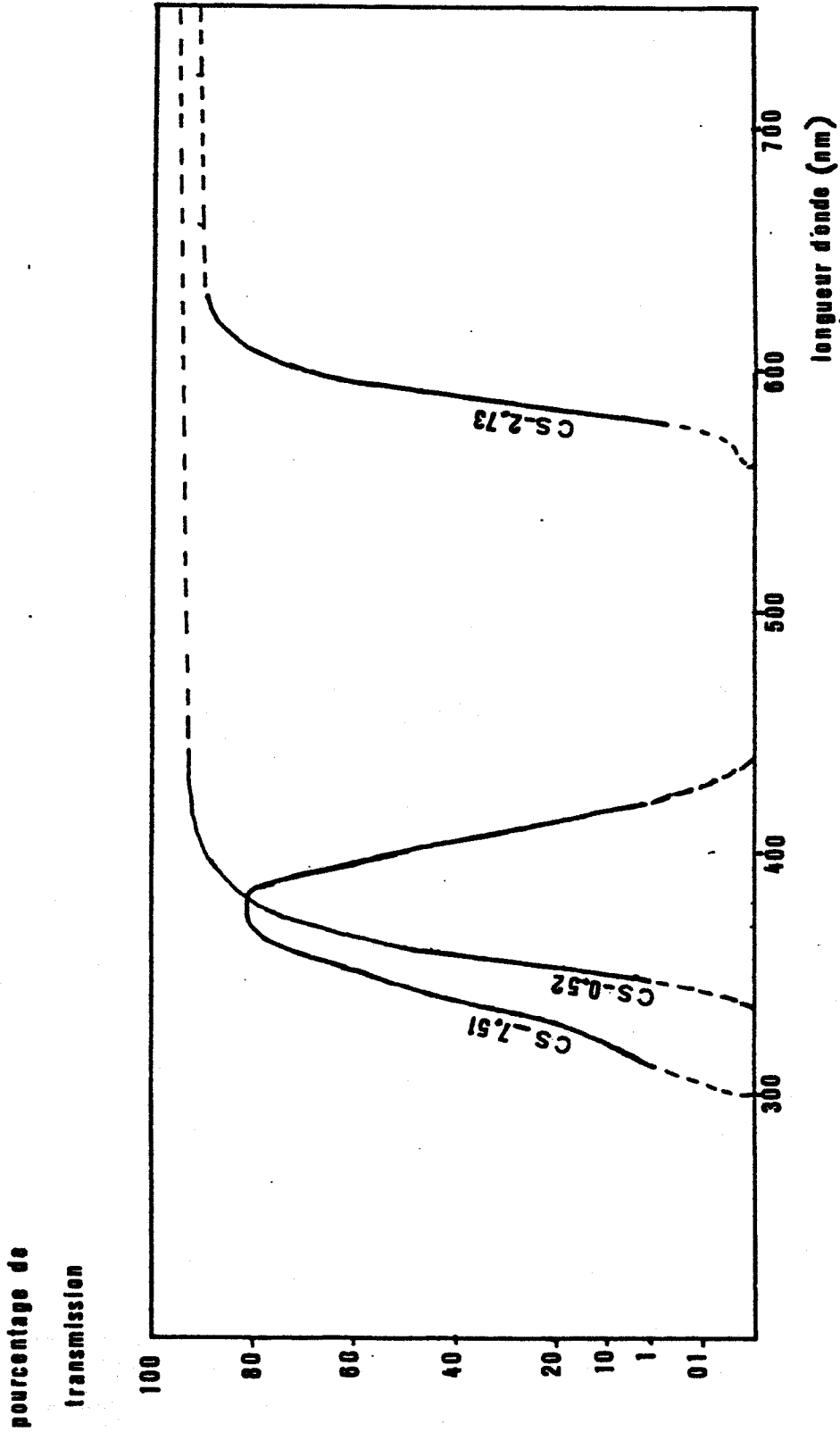


Figure V-2:

Spectres de transmission des filtres.



## 2) Etude de la complexation

Sur les tableaux V-1,2,3 sont rapportés les différents paramètres nécessaires à l'établissement des courbes  $\Delta_T^i = f\left(\sqrt{\frac{\Delta_T^i}{C}}\right)$  en fonction de la température. (cf chap. IV).

$\delta_{\text{obs}}$  correspond au déplacement chimique des protons  $i$  de la tyrosine en présence de porphyrine pour des concentrations identiques ( $C$ ) de ces deux composés et pour une température  $T$ .

$\delta_s$  est le déplacement chimique des protons  $i$  de la tyrosine seule en solution à la concentration  $C$  et à la température  $T$ .

$\delta_i = \delta_s - \delta_{\text{obs}} = \Delta_T^i$  est le déplacement induit des protons  $i$  de la tyrosine dans le complexe porphyrine-tyrosine.

Les variations des concentrations ont été obtenues par dissolution d'une solution mère où  $C = 1,2 \cdot 10^{-1}$  mole.l<sup>-1</sup>. Le calcul des nouvelles concentrations a été effectué en comparant l'intensité des protons aromatiques de la tyrosine à celle d'un étalon interne. Ce dernier est constitué par une solution de tertibutanol contenue dans un tube capillaire que nous plaçons à l'intérieur du tube de RMN.

Les valeurs des paramètres suivants ( $K, \Delta_{PT}^i$ ) et ( $\Delta H^\circ, \Delta S^\circ$ ) ont été calculées à l'aide de la méthode des moindres carrés par deux programmes BASIC. La conception et la mise en oeuvre de ces programmes ont été effectuées sous les conseils de Mr BONIFACE, responsable du Service Informatique de la Faculté de Pharmacie de Lille II. Nous donnons à titre d'exemple le "listing" et un exemple d'exécution de ces deux programmes sur les figures V-3,3'.

Tableau V-1:

Déplacements chimiques des protons H<sub>2,6</sub> et H<sub>3,5</sub> des formes libre et complexée de la N-acétyltyrosine.

C	308°K			313°K			318°K			323°K			328°K		
	$\delta_{obs}$	$\delta_s$	$\delta_i$	$\delta_{obs}$	$\delta_s$	$\delta_i$	$\delta_{obs}$	$\delta_s$	$\delta_i$	$\delta_{obs}$	$\delta_s$	$\delta_i$	$\delta_{obs}$	$\delta_s$	$\delta_i$
mole.1 <sup>-1</sup>															
1,2 10 <sup>-1</sup>	5,86	7,03	1,17	5,94	7,08	1,14	6,05	7,14	1,09	6,14	7,19	1,05	6,23	7,25	1,02
8,89 10 <sup>-1</sup>	5,95	7,03	1,08	6,05	7,09	1,04	6,15	7,15	1,00	6,24	7,20	0,96	6,33	7,25	0,92
6 10 <sup>-2</sup>	6,06	7,04	0,98	6,16	7,10	0,94	6,26	7,16	0,90	6,35	7,21	0,86	6,45	7,26	0,81
3,1 10 <sup>-2</sup>	6,21	7,05	0,84	6,30	7,11	0,81	6,40	7,16	0,76	6,50	7,22	0,72	6,60	7,28	0,68
1,32 10 <sup>-2</sup>	6,43	7,06	0,63	6,53	7,11	0,58	6,63	7,17	0,54	6,72	7,22	0,50	6,82	7,28	0,46
7,3 10 <sup>-3</sup>	6,58	7,06	0,48	6,68	7,12	0,44	6,77	7,17	0,40	6,86	7,22	0,36	6,95	7,28	0,33
3,32 10 <sup>-3</sup>	6,75	7,06	0,31	6,85	7,11	0,26	6,93	7,17	0,24	6,99	7,22	0,23	7,11	7,28	0,17



Déplacements chimiques des protons  $\text{CH}_3$  des formes libre  
et complexée de la N-acétyltyrosine.

C	308°K			313°K			318°K			323°K			328°K		
	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$
mole. $\cdot 1^{-1}$															
$1,2 \cdot 10^{-1}$	1,65	1,97	0,32	1,70	2,03	0,33	1,78	2,08	0,30	1,84	2,14	0,30	1,90	2,19	0,29
$8,89 \cdot 10^{-2}$	1,68	1,98	0,30	1,75	2,03	0,28	1,81	2,09	0,28	1,88	2,15	0,27	1,94	2,20	0,26
$6 \cdot 10^{-2}$	1,72	1,99	0,27	1,78	2,04	0,26	1,85	2,10	0,25	1,92	2,15	0,23	1,98	2,20	0,22
$1,32 \cdot 10^{-2}$	1,83	1,99	0,16	1,90	2,05	0,15	1,96	2,11	0,15	2,03	2,16	0,13	2,10	2,21	0,11
$7,3 \cdot 10^{-3}$	1,87	1,99	0,12	1,94	2,05	0,11	2,00	2,11	0,11	2,07	2,16	0,09	2,13	2,21	0,08
$3,3 \cdot 10^{-3}$	1,91	1,99	0,08	1,98	2,05	0,07	2,04	2,11	0,07	2,10	2,16	0,06	2,16	2,22	0,05



Tableau V-3:

Déplacements chimiques des protons  $\text{CH}_2$  des formes libre:  
et complexée de la N-acétyltyrosine.

C mole. $1^{-1}$	308°K			313°K			318°K			323°K			328°K		
	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$	$\delta_{\text{obs}}$	$\delta_{\text{s}}$	$\delta_{\text{i}}$
$1,2 \cdot 10^{-2}$	1,45	3,06	1,61	1,54	3,12	1,57	1,67	3,18	1,51	1,78	3,23	1,45	1,89	3,29	1,40
$8,89 \cdot 10^{-2}$	1,58	3,07	1,49	1,70	3,13	1,43	1,82	3,19	1,37	1,93	3,24	1,31	2,04	3,29	1,25
$6 \cdot 10^{-2}$	1,73	3,08	1,35	1,85	3,14	1,29	1,97	3,20	1,23	2,08	3,25	1,17	2,20	3,31	1,11
$3,1 \cdot 16^{-2}$	1,94	3,09	1,15	2,06	3,15	1,09	2,18	3,20	1,02	2,29	3,26	0,97	2,41	3,31	0,90
$1,32 \cdot 10^{-2}$	2,28	3,09	0,81	2,40	3,15	0,75	2,52	3,21	0,69	2,63	3,26	0,63	2,72	3,31	0,59
$7,3 \cdot 10^{-3}$	2,49	3,09	0,60	2,60	3,15	0,55	2,71	3,21	0,50	2,82	3,26	0,44	2,91	3,31	0,40
$3,32 \cdot 10^{-3}$	2,73	3,09	0,36	2,84	3,15	0,31	2,92	3,21	0,29	3,01	3,26	0,25	3,10	3,32	0,22



```

10 READ N
20 DIM Y(N), C(N), X(N)
30 FOR I=1 TO N
40 READ Y(I), C(I)
50 X(I)=SQR(Y(I)/C(I)):PRINT "Y(";I;")=";Y(I);TAB(20)"C(";I;")=";C(I);TAB(40)"X(";I;")=";X(I)
60 NEXT I
70 DATA 7,1.0177,1.2E-1,.9195,8.89E-2,.81715,6E-2,.678,3.1E-2,.45875,1.32E-2,.32725,7.3E-3,.1722
5,3.32E-3
80 X=0:Y=0:XY=0:X2=0:Y2=0
90 FOR I=1 TO N
100 X=X+X(I):Y=Y+Y(I):XY=XY+X(I)*Y(I):X2=X2+X(I)^2:Y2=Y2+Y(I)^2
110 NEXT I
120 AO=(Y*X2-X*XY)/(N*X2-X^2):A1=(N*XY-X*Y)/(N*X2-X^2):K=AO/A1^2
130 R=(XY-X*Y/N)/SQR(X2-X^2/N)*(Y2-Y^2/N)
140 VA1=2*SQR((Y2-Y^2/N)/(X2-X^2/N)-A1^2)/(N-2))
150 VAO=.0005+X*VA1/N+A1*X*(N*.0005/Y+.005)/(2*N)
160 VK=K*(VAO/AO+2*VA1/A1)
170 PRINT
180 PRINT "AO = ";AO;TAB(20) "A1 = ";A1;TAB(40) "K = ";K
190 PRINT
200 PRINT "VAO = ";VAO;TAB(20) "VA1 = ";VA1;TAB(40) "VK = ";VK
210 PRINT
220 PRINT "R = ";R
RUN
Y( 1 ) = 1.0177      C( 1 ) = .12      X( 1 ) = 2.91219
Y( 2 ) = .9195      C( 2 ) = .0889     X( 2 ) = 3.21607
Y( 3 ) = .81715     C( 3 ) = .06      X( 3 ) = 3.69042
Y( 4 ) = .678       C( 4 ) = .031     X( 4 ) = 4.67664
Y( 5 ) = .45875     C( 5 ) = .0132    X( 5 ) = 5.89523
Y( 6 ) = .32725     C( 6 ) = .0073    X( 6 ) = 6.69543
Y( 7 ) = .17225     C( 7 ) = .00332   X( 7 ) = 7.20295

AO = 1.52442      A1 = -.18316      K = 45.4407
VAO = .0649974   VA1 = .0136979   VK = -4.85924
R = -.996523

```



Figure V-3:

"Listing" et exemple d'application du programme qui permet d'obtenir  $K$  et  $\Delta_{PT}^i$  dans le cas des protons  $H_{2,6}$  et  $H_{3,5}$  de la N-acétyltyrosine à  $328^\circ K$ . ( $\Delta_{PT}^i = AO^+ - VAO$  ;  $K = K^+ - VK$  ;  $R =$  coefficient de corrélation).



```

LOAD "10 DATA 5,8.31441,92.3366,308,74.3467,313,67.0726,318,62.6942,323,45.4407,328
20 READ N,R
30 DIM K(N),T(N),Y(N),X(N)
40 X=0:Y=0:XY=0:X2=0:Y2=0
50 FOR I= 1 TO N
60 READ K(I),T(I)
70 Y(I)=LOG(K(I)):X(I)=1/T(I):X=X+X(I):Y=Y+Y(I):XY=XY+X(I)*Y(I):X2=X2+X(I)^2:Y2=Y2+Y(I)^2
80 PRINT "Y";I;":":Y(I);TAB(20) "X";I;":":X(I)
90 NEXT I
100 SO=R*(Y*X2-X*XY)/(N*X2-X^2):HO=-R*(N*XY-X*Y)/(N*X2-X^2):R1=(XY-X*Y/N)/SOR((X2-X^2/N)*(Y2-Y^2/N))
110 PRINT "SO = ";SO;TAB(20) "HO = ";HO;TAB(40) "R1 = ";R1
RUN
Y( 1 ) = 4.52544      X( 1 ) = 3.24675E-03
Y( 2 ) = 4.30874      X( 2 ) = 3.19489E-03
Y( 3 ) = 4.20578      X( 3 ) = 3.14465E-03
Y( 4 ) = 4.13827      X( 4 ) = 3.09598E-03
Y( 5 ) = 3.81641      X( 5 ) = 3.04878E-03
SO = -48.8985        HO = -26640.5      R1 = .967393
OK

```

Figure V-3':

"Listing" et exemple d'application du programme qui permet d'obtenir les paramètres thermodynamiques du complexe  $(\text{HO}(\text{J.mole}^{-1}.\text{K}^{-1}); \text{SO}(\text{J.mole}^{-1}))$  pour les protons  $\text{H}_{2,6}$  et  $\text{H}_{3,5}$  de la N-acétyltyrosine. ( R = coefficient de corrélation).



## BIBLIOGRAPHIE

1 - J. MARKO

Thèse de doctorat ès-Sciences Physiques, Université de Lille I,  
Chapitre V (mai 1986)

2 - J.B. VERLHAC, A. GAUDEMER et I. KRALJIC

Nouv. J. Chim. 8, 401 (1984)

CONCLUSION GENERALE

## CONCLUSION GENERALE

Notre travail nous a permis d'approfondir la connaissance des processus primaires de photoréactions radicalaires d'une série de composés photosensibilisants : les porphyrines. La technique de polarisation nucléaire dynamique induite photochimiquement (photo-CIDNP) appliquée à l'étude du comportement photochimique de ces produits seuls en solution aqueuse ou vis-à-vis de modèles de substrats biologiques qui constituent en général leurs cibles d'attaque privilégiées in vivo permet l'établissement des mécanismes de leurs photoréactions de nature radicalaire.

Ainsi lors de l'irradiation lumineuse en continu (état stationnaire) de ces agents photosensibilisants seuls en solution, nous avons observé pour la première fois par CIDNP  $^1\text{H}$  des polarisations sur ces produits. Un mécanisme d'annihilation triplet - triplet est suggéré d'après les calculs de l'énergie libre de formation de la paire de radicaux-ions. Les espèces semi-oxydée et semi-réduite de la porphyrine (radical anion - radical cation) seraient ainsi formées par la réaction entre deux molécules à l'état excité triplet.

En présence des bases des acides nucléiques (purines et pyrimidines) ou des acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane, histidine) un parallélisme intéressant du point de vue réactivité a pu être établi avec l'étude déjà effectuée dans ce laboratoire par J. MARKO sur les phénothiazines. Nos résultats sont tout à fait complémentaires de ceux de la série phénothiazinique et prouvent le comportement équivalent des deux familles de dérivés photosensibilisants.

En ce qui concerne l'étude par photo CIDNP du système porphyrines/nucléobases, nous avons mis en évidence une réaction de transfert électronique hautement réversible ("non réaction" que la CIDNP est pratiquement la seule technique à pouvoir détecter) dans laquelle la porphyrine joue le rôle d'accepteur. Cette réaction met ainsi en jeu le radical anion

de la porphyrine et le radical cation de la guanine. Les autres bases ne réagissent pas par ce processus. Le mécanisme de leur formation, en accord avec les règles de KAPTEIN, fait intervenir l'état excité triplet des porphyrines. Cette étude a également mis en valeur l'importance des processus photo-rédox qui vont gouverner d'un point de vue énergétique la direction du transfert d'électron.

Ainsi une bonne corrélation a été trouvée entre les potentiels de réduction des porphyrines, d'oxydation des nucléobases et l'efficacité de ce transfert. Comme la photodégradation de l'ADN par les porphyrines résulte principalement d'une photooxydation des résidus guanines, nous suggérons qu'une réaction de type I (transfert d'électron) analogue à celle observée dans notre étude peut être un des processus primaires de photosensibilisation de l'ADN par les porphyrines.

L'étude du système porphyrines/acides aminés aromatiques est plus complexe parce que les mécanismes de photoréaction sont diversifiés : transfert d'électron avec le tryptophane, transfert d'électron suivi d'un transfert de proton avec la tyrosine, arrachement d'hydrogène avec l'histidine. Toutefois, comme dans le cas des nucléobases, c'est la porphyrine excitée dans son état triplet qui joue le rôle d'accepteur. L'application des règles de KAPTEIN ainsi que l'étude énergétique de la formation des paires de radicaux-ions nous ont permis de conforter les mécanismes proposés.

Dans le cas de la tyrosine, une étude RMN classique nous a permis de mettre en évidence la formation d'un complexe de type 1-1 par liaison hydrogène avec la porphyrine. L'irradiation de ce complexe favoriserait l'obtention de polarisations sur la porphyrine. C'est la première fois que des polarisations sont observées en milieu polaire sur la porphyrine et à l'état stationnaire.

Dans le cas du tryptophane et de l'histidine, nous avons observé des polarisations sur différents photoproduits. Ceux-ci se formeraient au cours de réactions non-réversibles par piégeage des radicaux diffusants. Nous n'avons pas pu déterminer la structure de ces photoproduits à cause

de la complexité des spectres enregistrés à 80 MHz dans le cas du tryptophane. Le spectre RMN des réactifs et des photoproduits sont superposés et ainsi difficiles à interpréter. Une étude sur un spectromètre opérant à champ plus élevé permettrait peut être de déterminer leur structure. De même les faibles concentrations utilisées au cours de notre étude ne nous permettent pas de les isoler.

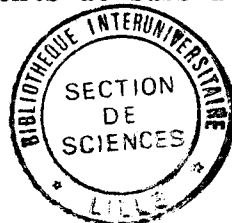
Toutefois, certains mécanismes proposés au cours de l'étude de ces réactions, particulièrement dans le cas de l'histidine, restent à confirmer. L'incertitude de ces mécanismes réside dans le fait que plusieurs processus secondaires sont susceptibles d'entrer en compétition et que les polarisations observées peuvent provenir de plusieurs voies réactives différentes. Afin de différencier celles-ci, il serait intéressant d'utiliser la technique de photo CIDNP résolue dans le temps (cf chapitre I) qui permettrait d'évaluer l'importance relative des polarisations créées à partir de ces différentes réactions.

Il est difficile de comparer la photoréactivité des porphyrines entre elles vis-à-vis d'un substrat donné car elles ne réagissent pas toutes de la même façon. Toutefois, nous avons pu montrer pour toutes les porphyrines que le transfert de charge s'accompagnait d'une réduction du cycle tétrapyrrolique.

Dans le cas des porphyrines non métallées ce sont celles qui possèdent le potentiel de réduction le plus bas qui favoriseront le transfert d'électron. Il en est de même pour les porphyrines métallées diamagnétiques. Les porphyrines métallées paramagnétiques ne montrent aucune photoréactivité particulière par CIDNP.

Notre travail constitue ainsi une approche préalable à la poursuite éventuelle d'études sur des modèles plus élaborés avec un matériel permettant la résolution temporelle des spectres.

Il peut également s'appliquer à l'étude d'une série de composés analogues, les phtalocyanines, qui sont également connues pour réagir par des mécanismes de type I et qui peuvent constituer des agents de substitution des porphyrines en photochimiothérapie des cancers.



## **R E S U M E**

Les porphyrines sont des agents photosensibilisants utilisés en photochimiothérapie des cancers. Les mécanismes de photoréaction sont de deux sortes : type II (oxygène singulet) et type I (radicalaire).

Ce travail présente une contribution à l'étude des processus primaires de photoréaction des porphyrines. Cette étude est réalisée à l'aide de la technique de Polarisation Nucléaire Dynamique Induite photochimiquement (photo-CIDNP). Cette technique nous a permis d'obtenir des informations sur les photoréactions radicalaires de ces produits, seuls ou en présence de substrats biologiques (bases des acides nucléiques ; amino-acides aromatiques). Les mécanismes de photoréaction sont discutés.

- La photoréaction des porphyrines seules dans l'eau fait intervenir un mécanisme d'annihilation triplet-triplet.
- En présence des substrats biologiques, nous avons pu mettre en évidence des réactions de transfert de charge qui dépendent de plusieurs paramètres (valeurs de pH, potentiels d'oxydo-réduction des produits, complexation).

Le mécanisme met en jeu l'état triplet des porphyrines qui réagit par un transfert d'électron avec le substrat pour former intermédiairement une paire de radicaux-ions corrélée où la porphyrine est l'accepteur d'électron.

## **M O T S - C L E S**

**Photo-CIDNP - Photosensibilisation - Porphyrines hydrosolubles -  
Transfert d'électron - Complexation - Radicaux-ions -  
Potentiel d'oxydo-réduction**