

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4 Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10 <u>http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php</u> <u>http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm</u>



THESE

Ecole Doctorale SESAMES

présentée

A L'UNIVERSITE DE METZ

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE MET7

Spécialité : Chimie-Physique

Par

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE -METZ 20010715 Nº inv Cote 01/0

Loc

Marc ANGOTTI

Etude par spectrométrie de masse des photoréactions laser de sensibilisants colorés utilisés en thérapie photodynamique (PDT)

Le 28 septembre 2001

Rapporteurs	Iliana Dimicoli , Directeur de recherches au CEA Jean-Claude Blais , Directeur de recherches à l'université Pierre et Marie Curie de Paris
Examinateurs	 Denise Bagrel, Professeur de l'université de Metz Lina Bezdetnaya, Professeur Associé, au Centre Alexis Vautrin (Nancy) François Guillemin, Professeur, au Centre Alexis Vautrin (Nancy) Benoît Maunit, Maître de Conférences à l'université de Metz
Directeur de thèse	Jean-François Muller, Professeur de l'université de Metz

Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de spectrométrie de masse et de chimie laser, sous la direction du Professeur Jean-François Muller.

Je lui exprime ici toute ma très profonde gratitude pour m'avoir permis de découvrir la spectrométrie de masse et le monde passionnant de la recherche. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a témoigné à cette étude, pour les moyens matériels (et financiers) qu'il a mis à ma disposition pour réaliser ce travail, pour l'investissement personnel, pour ses motivations constantes et pour la confiance dont il a fait preuve à mon égard au cours de ces années.

Je souhaite remercier tout particulièrement Monsieur Benoît Maunit, Maître de Conférences à l'université de Metz, qui par ses qualités humaines, sa disponibilité, son enthousiasme et ses compétences, a su m'encadrer au cours de ces années.

Je tiens à remercier Madame Lina Bolotine, Professeur Associé à l'unité de recherche en thérapie photodynamique du Centre Alexis Vautrin (Nancy), pour son accueil et l'attention qu'elle a portée à ce travail et les nombreuses discussions, toujours intéressantes et constructives que nous avons partagés au cours de cette recherche.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements et toute ma reconnaissance à Monsieur le Professeur François Guillemin, responsable de l'unité de recherche en thérapie photodynamique du Centre Alexis Vautrin (Nancy), pour l'intérêt qu'il a su apporter à mes travaux et de l'honneur qu'il me fait en acceptant de juger ce travail.

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail en tant que rapporteurs, j'adresse mes respectueux remerciements à Madame Iliana DIMICOLI, Directeur de recherche au CEA de Saclay et à Monsieur Jean-Claude BLAIS, Directeur de Recherche à l'université Pierre et Marie Curie de Paris.

Que Madame Denise BAGREL, Professeur de l'université de Metz soit remerciée pour avoir accepter de juger ce travail.

Je tiens tout particulièrement à remercier le comité mosellan de la Ligue Nationale contre le Cancer et le Pôle Européen de Santé, pour leur soutien financier sans lequel cette thèse n'aurait pu être réalisée. Je remercie également la société Scotia Pharmaceuticals, (Stirling, U.K.) pour la gracieuse mise à disposition des photosensibilisant que nous avons étudiés.

Je tiens à exprimer mes remerciements à Messieurs Gabriel Krier, Ingénieur de recherches et Lionel Vernex-Loset, Ingénieur d'études pour leur assistance et leur compétence technique.

Je tiens à remercier Messieurs Eric Millon, Professeur de l'université de Metz et Jean-Jacques Gaumet, Maître de Conférences de l'université de Metz, pour leur aide et leurs encouragements qu'ils m'ont apportés durant ces années.

Qu'il me soit également permis de remercier tous les membres de laboratoire passés et présents qui m'ont accompagné et encouragé tout au long de ma thèse.

Je mettrais une mention particulière pour rendre hommage à Madame Martine Flerès, secrétaire hors catégorie, qui a résolu tous mes tracas administratifs rencontrés durant ces années, mais aussi pour son attention de tous les instants, ses qualités humaines, son sourire et sa bonne humeur de tous les jours.

TABLE DES MATIERES

Table des matières

TABLE DES MATIERES

Introduction Générale 1 I Etude Bibliographique 4 1 La thérapie photodynamique : PDT 5 1.1 Utilisation de la PDT en clinique 5 1.1.1 Les tumeurs cutanées et sous-cutanées 5 1.1.2 Les tumeurs bronchiques 5 1.1.3 Les tumeurs vésicales 6 1.1.4 Les tumeurs digestives 6 1.2 Rappels historiques 6 Mécanismes intervenant durant la PDT 1.3 7 2 Les agents photothérapeutiques utilisés en PDT 10 2.1 Les photosensibilisants de première génération 11 Les photosensibilisants de seconde génération 2.2 12 3 La temoporfine et la bactériochlorine 15 3.1 Définition structurale 15 3.2 Propriétés spectrales 16 Synthèse²⁵ 3.3 17 Photodégradation de la m-THPC et de la m-THPBC 3.4 18 3.5 Caractérisation de l'oxygène singulet 20 4 Spectrométrie de masse et photosensibilisant 20 5 Références 22 **II Matériels et Méthodes** 25 1 Spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS) 26 1.1 Introduction 26 Principe de la FTICRMS 1.2 27 Séquence expérimentale 1.3 31 1.4 Performances et limites de la FTICRMS 32 1.5 Désorption/Ionisation laser 33 1.5.1 Les lasers 33 1.5.2 Désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) 34 1.5.2.1 Le Principe du MALDI 35 1.5.2.2 Les mécanismes du MALDI 37 1.5.2.3 Les facteurs importants du MALDI 38

2	2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par piég			
	des ions	40		
	2.1 Chromatographique en phase gazeuse	40		
	2.2 Le piège à ions quadripolaire	43		
	2.3 Modes d'ionisation du piège à ions quadripolaire	44		
	2.3.1 Mode de fonctionnement en impact électronique	44		
	2.3.2 Mode de fonctionnement en ionisation chimique	45		
•				
3	Spectrophotométrie d'absorption et de fluorescence	48		
	3.1 Spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible	48		
	3.2 Spectrophotométrie de fluorescence	49		
4	Traitement photochimique	50		
-	4.1 Préparation des échantillons	51		
	4.1.1 Présentation des composés étudiés	51		
	4 1 2 Mise en solution des échantillons	51		
	4 1 2 1 Milieu organique	51		
	4122 Milieu aqueux	51		
	4.1.2.2 Milieu physiologique	52		
	4.1.2.5 Willieu biologique	52		
	4.2. Protocole d'illumination lacer	52		
		22		
5	Caractérisation de la formation d'oxygène singulet en solution	54		
6	Références	56		
II	I Comportement des photosensibilisants en solution dans l'éthanol	58		
1	Analyse par MALDI/FTICRMS des photosensibilisants en solution dans l'éthanol	50		
	1.1 Choix de la matrice	59		
	1.2 5.10.15.20-méso(tetrahydroxynhenyl) porphyrine (m-THPP)	60		
	1.3 5.10.15.20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine ⁵ (m-THPC)	62		
	1.4 5.10.15.20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine	64		
		04		
2	Photodégradation de la m-THPC en solution dans l'éthanol	66		
	2.1 Caractérisation des photoproduits de la m-THPC	66		
	2.2 Identification des massifs autour des $m/z = 713$ et 742	72		
	2.2.1 Identification du massif autour de $m/z = 742$	72		
	2.2.2 Identification du massif autour de $m/z = 713$	79		
	2.3 Mise en évidence de la présence d'oxygène singulet moléculaire	84		
	2.3.1 Analyse par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS de la molécule de			
	2.3.1 Analyse par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS de la molécule de 1,3 diphénylisobenzofurane (DPBF) et ortho-dibenzoylbenzène (o-BB)			
	2.3.1 Analyse par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS de la molécule de 1,3 diphénylisobenzofurane (DPBF) et ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) en milieu éthanol	86		
	 2.3.1 Analyse par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS de la molécule de 1,3 diphénylisobenzofurane (DPBF) et ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) en milieu éthanol 2.3.2 Analyse du mélange DPBF (10-3 mol/L) / m-THPC (10-5 mol/L) 	86		
	 2.3.1 Analyse par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS de la molécule de 1,3 diphénylisobenzofurane (DPBF) et ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) en milieu éthanol 2.3.2 Analyse du mélange DPBF (10-3 mol/L) / m-THPC (10-5 mol/L) en solution dans l'éthanol 	86 91		
	 2.3.1 Analyse par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS de la molécule de 1,3 diphénylisobenzofurane (DPBF) et ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) en milieu éthanol 2.3.2 Analyse du mélange DPBF (10-3 mol/L) / m-THPC (10-5 mol/L) en solution dans l'éthanol 2.3.3 Analyses du mélange DPBF/m-THPC en solution éthanolique standard. 	86 91		
	 2.3.1 Analyse par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS de la molécule de 1,3 diphénylisobenzofurane (DPBF) et ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) en milieu éthanol 2.3.2 Analyse du mélange DPBF (10-3 mol/L) / m-THPC (10-5 mol/L) en solution dans l'éthanol 2.3.3 Analyses du mélange DPBF/m-THPC en solution éthanolique standard, oxygénée et appauvrie en oxygène 	86 91 93		

3	Référence	98
I	V Déshydrogénation des photosensibilisants en milieu aqueux et physiologique	99
1	Comportement de la m-THPC en milieu aqueux : en solution dans un mélange éthanol/eau	100
2	Phototransformation de la m-THPC en solution dans un mélange éthanol/eau (1 : 99, v/v) ⁵	104
3	 Phototransformation de la m-THPBC en solution dans un mélange éthanol/eau (1 : 99, v/v)⁵ 3.1 Photodégradation de la m-THPBC en solution dans l'éthanol 3.2 Phototransformation de la m-THPBC en milieu éthanol/eau 	107 107 109
4	4 Etudes de la phototransformation de la m-THPC et de la m-THPBC en milieu physiologique ⁵	
5	Conclusion	117
6	Références	119
IJ	V Comportement de la Temoporfin (m-THPC) en milieu biologique	120
1	Les plaquettes sanguines ou thrombocytes	121
2	 Protocole d'analyse des solutions de plaquettes sanguines par MALDI/FTICRMS 2.1 Préparation des plaquettes sanguines 2.2 Mise en contact avec le photosensibilisant 2.3 Echantillonnage MALDI/FTICRMS 	5 122 122 123 124
3	Caractérisation de la m-THPC au sein des plaquettes sanguines	126
4	Conclusions	130
5	Références	131
C	onclusion Générale	132

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

La photochimiothérapie ou thérapie photodynamique (PDT) antitumorale est basée sur l'activation par la lumière de molécules photosensibles préférentiellement retenues par les tissus néoplasiques. Sous l'effet de l'irradiation lumineuse, ces colorants non toxiques à l'obscurité génèrent des espèces chimiques à courte durée de vie, capables de provoquer des altérations létales en réagissant avec les composants biologiques situés dans l'environnement immédiat du photosensibilisant. La PDT est utilisée en clinique soit pour réduire le volume d'une tumeur massive, soit pour obtenir la cure radicale d'une petite tumeur superficielle ou bien encore comme complément d'une autre méthode chirurgicale ou de radiothérapie. L'efficacité photodynamique repose, entre autres paramètres, sur les propriétés chimiques et photochimiques du photosensibilisant. Les dérivés de l'hématoporphyrine ont été pendant plus de dix ans les seuls agents utilisés en photothérapie clinique. Cependant, ils sont connus pour avoir certains inconvénients. Ce sont des mélanges complexes qui ont rendu difficiles des études précises.

Pour contourner cette difficulté la synthèse du photosensibilisant « idéal » a été initiée. Un colorant parfait doit d'abord être un photosensibilisateur efficace de la formation d'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$ et/ou de processus radicalaires. Pour cela, l'énergie de l'état excité triplet du photosensibilisant doit être supérieure à celle de l'oxygène moléculaire singulet (94,2 kJ/mol) pour permettre un transfert d'énergie efficace. Il doit être retenu le plus sélectivement possible par les tumeurs et présenter une absorption élevée dans le domaine du spectre où les tissus et où le sang sont les plus transparents à la lumière (600 à 900 nm). Enfin, pour éviter des problèmes de photosensibilité cutanée post-traitement, il doit être dénué d'effets indésirables dans le noir et être rapidement éliminé par l'organisme et/ou ne pas absorber fortement entre 300 et 600 nm (domaine de longueurs d'onde où l'intensité de la radiation solaire est la plus élevée). Parmi les photosensibilisants qui ont été testés ces dernières années, la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine (m-THPC) a montré une

Introduction générale

activité photodynamique élevée. Malgré les études entreprises dans différents domaines, aussi bien in vitro, in vivo qu'en clinique, les paramètres influençant l'activité photodynamique de la m-THPC et son mode d'action n'étaient pas vraiment élucidés lorsque cette étude a été entreprise. C'est pourquoi nous nous sommes plus particulièrement intéressés à cet agent photosensible.

L'objectif principal de notre étude est d'arriver à la compréhension des mécanismes concernant le comportement photodynamique du sensibilisant m-THPC et ce grâce à l'apport de la microsonde laser FTICRMS (spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions par transformée de Fourier). Parallèlement à l'étude particulière de la m-THPC, deux autres photosensibilisants feront également l'objet d'un suivi analytique à savoir la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) porphyrine (m-THPP) et la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine (m-THPBC).

Ainsi, l'efficacité et les capacités de la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) couplée à la FTICRMS associée à la spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et de fluorescence, ont été mis à profit dans le but d'étudier la molécule m-THPC avant et après traitement laser.

Dans ce but, nous avons étudié le comportement de la m-THPC en solution dans divers milieux de solvatation (organique, aqueux, physiologique avec/sans protéines) pour finir en milieux biologiques à savoir au contact de plaquettes sanguines. A chaque étape, nous avons ainsi évalué l'activité photodynamique de la m-THPC, notamment en mettant en évidence la formation de photoproduits suite à une illumination laser.

Le mémoire présenté s'articulera autour de cinq axes particuliers et sera structuré de la façon suivante pour répondre au différents objectifs fixés :

Après avoir fait une rapide présentation de la thérapie photodynamique (PDT) et de ses applications cliniques, nous parlerons, dans le **chapitre I**, de son développement historique et des mécanismes entrant en jeu lors de l'activation des photosensibilisants par la lumière. Nous insisterons plus particulièrement sur les propriétés physico-chimiques de la m-THPC et sur les méthodes déjà utilisées concernant le suivi de sa photodégradation. Enfin, nous démontrerons l'apport de la spectrométrie de masse et en particulier de la technique MALDI/FTICRMS

Introduction générale

dans le but d'obtenir des données fondamentales supplémentaires sur les mécanismes photochimiques mis en jeu lors des processus photodynamiques.

Le chapitre II sera consacré à la description des méthodes d'analyses de spectrométrie de masse et de spectrophotométrie utilisées lors de notre recherche et du protocole d'illumination laser mis en œuvre. Le suivi de la réaction de phototransformation des photosensibilisants étudiés a été effectué tout d'abord par l'étude des spectres de fluorescence et d'absorption ultraviolet/visible de ces derniers. La technique MALDI/FTICRMS nous a permis d'identifier les espèces à chaque étape de la réaction photochimique. De plus, l'utilisation de la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par piégeage des ions (GC/ITMS) a, quant à elle, été utilisée dans le cadre de la caractérisation de la formation d'oxygène singulet via une sonde moléculaire spécifique : le 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF).

Le chapitre III fera l'objet de l'étude du comportement des photosensibilisants en solution dans l'éthanol. Après avoir effectué la description des résultats obtenus lors de l'analyse des photosensibilisants seuls, nous nous intéresserons à la photodégradation de la m-THPC et à la formation de photoproduits suite à une irradiation laser à 650 nm. Dans un second temps, nous développerons le protocole mis en œuvre afin d'aboutir à la caractérisation par spectrométrie de masse de la formation d'oxygène singulet ${}^{1}O_{2}$ via l'emploi de la sonde moléculaire 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF).

Les travaux sur le comportement de la m-THPC et de la m-THPBC en solution dans un mélange éthanol/eau, en présence d'un tampon physiologique (Phosphate Buffer Saline, PBS) avec ou sans ajout de protéines (sérum de veau fœtal, SVF) sont rapportés dans le **chapitre IV**. Nous y discuterons la nature des photoproduits obtenus et l'influence que peut avoir le milieu de solvatation sur celle-ci.

Enfin, les travaux préliminaires effectués sur les plaquettes sanguines font l'objet du **chapitre V**. Ces études indiquent que la technique MALDI/FTICRMS offre une voie prometteuse quant à la mise en évidence de photoproduits directement sur un échantillon de cellules préalablement mises en contact avec le photosensibilisant ouvrant ainsi la voie à l'évaluation de la cytotoxicité des photosensibilisants sur les cellules par MALDI/FTICRMS.

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

-

CHAPITRE I

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

La thérapie photodynamique (PDT), qui est une nouvelle technique en matière de lutte contre le cancer, est basée sur l'utilisation de la lumière visible ou proche du visible pour activée un agent thérapeutique sélectif vis-à-vis des tissus néoplasiques¹. Le photosensibilisant préalablement injecté par voie intraveineuse, qui est non toxique à l'obscurité, génère sous l'effet d'une irradiation lumineuse des espèces chimiques cytotoxiques qui vont éradiquer les tumeurs.

La PDT est basée sur la combinaison de trois paramètres : le photosensibilisant, la lumière et l'oxygène. Mais l'efficacité photodynamique repose sur les propriétés chimiques et photochimiques du photosensibilisant. Depuis l'emploi de cette nouvelle technique en clinique c'est-à-dire depuis plus de vingt ans, les efforts se sont portés en particulier sur la synthèse de photosensibilisant « idéal ». En effet, celui-ci doit posséder une activité photodynamique maximale sur les tissus pathologiques tout en ayant des effets secondaires les plus faibles possibles sur les tissus sains.

Après un rappel historique sur le développement de la PDT, nous décrirons les mécanismes qui entrent en jeu durant son utilisation. Puis nous nous intéresserons aux différents photosensibilisants intervenant dans le développement de cette nouvelle thérapie utilisée pour lutter contre le cancer. Et en particulier à la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine (m-THPC) et à la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine (m-THPBC), les deux photosensibilisants qui ont fait l'objet de nos travaux.

1 La thérapie photodynamique : PDT

La littérature rapporte que le photosensibilisant a tendance à se concentrer au niveau des lésions néoplasiques¹ et d'une façon plus modeste au niveau des tissus sains. Ceci permet donc l'éradication des tumeurs sous l'effet d'une irradiation lumineuse, c'est la PDT. Mais en réalité, cette spécificité est faible et l'effet discriminant est surtout dû à l'éclairement de la tumeur. En effet, il faut amener la source lumineuse jusqu'à l'emplacement où se situent les tumeurs à traiter. Ainsi, la PDT ne concerne que les tumeurs accessibles directement ou par endoscopie.

1.1 Utilisation de la PDT en clinique

La PDT est surtout utilisée sur des petites tumeurs. Cette thérapie pourrait être intégrée dans un protocole plus complexe. La PDT est aussi utilisée à visée palliative pour de grosses tumeurs infiltrantes ou des récidives.

Les localisations les plus fréquemment traitées par PDT sont les suivantes :

1.1.1 Les tumeurs cutanées et sous-cutanées

Les traitements conventionnels de ce type de lésions sont la chirurgie et éventuellement la radiothérapie. Il en résulte, le plus clair du temps, des séquelles d'ordre esthétique. Dans le cas de l'utilisation de la PDT, les résultats sont améliorés et présentent une réponse complète un an après traitement².

1.1.2 Les tumeurs bronchiques

La PDT n'a pas fait preuve de sa supériorité par rapport à d'autres techniques dans le traitement des tumeurs bronchiques obstructives. Elle est plutôt indiquée dans le traitement de petites tumeurs bronchiques (carcinomes in situ et carcinomes microinvasifs; carcinomes épidermoïdes ou adénocarcinomes)^{3, 4}.

1.1.3 Les tumeurs vésicales

L'indication principale est axée essentiellement sur le diagnostic du carcinome in situ de la vessie. Dans 80 % des cas, le cancer de la vessie présente des lésions multifocales. La PDT permet la conservation de l'organe et de sa fonction⁵.

1.1.4 Les tumeurs digestives

L'application de la PDT au traitement de l'œsophage et de l'estomac peut induire des complications, comme des fistules, dues à des doses de lumière trop importantes. Mais les taux de réussite sont très élevés, sur 15 cas de carcinomes précoces de l'œsophage traités avec le Photofrin®, 3 ont récidivé et 10 patients n'ont eu aucune récidive avec un recul de 60 mois⁶.

1.2 Rappels historiques

Les premières publications relatant l'association entre la lumière et une substance photosensible datent du début du 20^e siècle. En effet, Raab a remarque que l'éosine ou l'acridine orange en contact avec des protozoaires induisent leur destruction sous l'effet de la lumière solaire⁷.

Mais c'est en 1903 que le premier essai d'élimination d'une tumeur cutanée par exposition à la lumière a été effectué en utilisant l'éosine comme photosensibilisant⁸.

Policard⁹ a quant à lui mis en évidence l'accumulation des porphyrines endogènes dans les tissus néoplasiques. De plus, il a montré l'émission de fluorescence lors de leur exposition à la lumière ultraviolette.

En 1942, il a été observé que l'hématoporphyrine était retenue préférentiellement dans les tumeurs transplantées chez des souris et que sous l'action de la lumière, une nécrose partielle était induite¹⁰. Ceci a été confirmé plus tard par Figge¹¹, qui a montré par fluorescence la rétention de l'hématoporphyrine dans les lésions néoplasiques en excitant les tumeurs avec une lumières ultraviolette.

Mais le plus grand essor de la PDT date de 1961, quand Lipson¹² a décrit la synthèse d'un dérivé de l'hématoporphyrine appelé HpD ou « hématoporphyrine dérivée ». L'HpD s'est montrée beaucoup plus efficace que son produit d'origine, et semblait donc un photosensibilisant très adapté au développement de la PDT. C'est ainsi qu'en 1966, le premier traitement photodynamique a été effectué en utilisant l'HpD sur un cancer du sein en récidive¹³. Puis les premiers essais *in vivo* ont été réalisés par Dougerthy¹⁴ en 1975 sur des tumeurs implantées chez des souris et des rats. Et en 1976, ce fut le tour du premier cancer de la vessie traité pas l'HpD suite à une irradiation en lumière blanche¹⁵. Les essais cliniques en PDT de phase I (volontaires sains pour étudier la répartition et la durée de vie des médicaments dans l'organisme) et de phase II (petit nombre de malades pour étudier le rapport bénéfice/risque) ont été rapportés en 1977 et 1978.

Le Photofrin®, qui est la fraction purifiée de l'HpD, a eu l'autorisation d'être utilisé en clinique à partir de 1987. Ainsi, les premiers essais cliniques en phase III (grand nombre de malades pour évaluer l'efficacité et la tolérance par rapport à un placebo et un médicament du même type) ont débuté en 1988.

La thérapie photodynamique a connu un grand intérêt depuis 1989 avec l'apparition de nouveaux photosensibilisants¹⁶, le développement des lasers, des diodes lasers et des fibres optiques.

1.3 Mécanismes intervenant durant la PDT

Une réaction photochimique nécessite l'absorption par une molécule, d'une radiation électromagnétique de longueur d'onde appropriée (loi de Grothus-Drapper). Un état électronique excité de la molécule est ainsi créé et peut alors induire une transformation chimique directe en produit stable, ou conduire à un intermédiaire réactif capable d'amorcer la réaction. Cependant, un tel état excité peut également dissiper son énergie sans changement chimique du réactif (processus photophysiques de désactivation).

Ainsi l'absorption d'un photon d'énergie hv par une molécule, va permettre le passage de l'état fondamental (S₀) qui est l'état d'énergie le plus bas à un niveau d'énergie supérieur. La molécule sera transférée à un niveau vibrationnel de l'état singulet excité (S₁) à condition que la longueur d'onde soit correctement ajustée. La molécule perd ensuite de l'énergie vibrationelle pour atteindre la configuration d'équilibre de cet état excité avant de réagir. A partir de cet état la molécule rejoint sont état énergétique le plus bas (S_0) par deux types de processus photophysiques.

Les processus de désactivation radiative

La molécule dans son état excité peut se désactiver par émission d'une radiation : ce processus est appelé luminescence. Si cette émission se produit entre deux états de même multiplicité, par exemple entre (S_1) et (S_0) ; elle est appelée fluorescence. Si l'émission se produit entre deux états de multiplicité différents, par exemple (T_1) et (S_0) , elle est appelée phosphorescence. Ces émissions ont lieu à partir des niveaux vibrationnels zéro des états excités, car la relaxation vibrationnelle est très rapide $(10^{-13} à 10^{-12} s)$. Mais il est a noté que (T_1) possède une durée de vie plus longue, ce qui entraîne deux processus de désactivation : le radiatif correspondant à la phosphorescence et le non radiatif que nous allons développer dans le paragraphe suivant.

L'émission de fluorescence est utilisée dans un but diagnostic.

Les processus de désactivation non radiative

L'état excité instable (état singulet) a une durée de vie de comprise entre 10^{-12} et 10^{-7} s. Le photosensibilisant (PS) à l'état excité singulet $PS^*(S_1)$ peut conduire par croisement intersystème (1) à son état triplet $PS^*(T_1)$. Cet état est l'état « photoactif » dont la durée de vie est plus longue que celle de l'état singulet et peut être comprise entre une microseconde et quelques secondes, il s'agit alors d'un état métastable. Ainsi, le photosensibilisant a le temps de réagir avec une molécule environnante (réactions types I et II détaillées dans la suite), il perd alors son excédent d'énergie et revient à son état fondamental $PS^*(S_0)$.

$$PS(S_0) \xrightarrow{hv} PS^*(S_1) \xrightarrow{\text{croisement} \\ \text{int ersytème}} PS^*(T_1)$$
(1)

Le croisement intersystème est utilisé dans un but thérapeutique suivant les processus photochimiques définis par Foote¹⁷ dont nous allons faire le détail.

Le processus photochimique de type I

Le photosensibilisant qui est sous sa forme triplet $PS^*(T_1)$ (1) va réagir dans un premier temps avec un substrat en produisant des radicaux libres, chargés ou neutres (2) et (3). Ainsi les composés formés résultent soit d'un transfert d'hydrogène vers le photosensibilisant dans le cas de la formation de radicaux libres neutres, soit d'un transfert d'électrons dans le cas de la formation d'une forme ionique.

$$PS(S_0) \xrightarrow{h\nu} PS^*(S_1) \xrightarrow{\text{croisement}} PS^*(T_1)$$
(1)

$$PS^{*}(T_{1}) + RH \xrightarrow{\text{transfert d'hydrogène}} PH^{\bullet} + R^{\bullet}$$
(2)

$$PS^{*}(T_{1}) + R \xrightarrow{\text{transfert d'électrons}} \begin{cases} PS_{réd}^{\bullet-} + R_{ox}^{\bullet+} \\ PS_{ox}^{\bullet+} + R_{réd}^{\bullet-} \end{cases}$$
(3)

Les radicaux ou les ions ainsi formés peuvent ensuite être oxydés par l'oxygène moléculaire dans son état fondamental. Cette combinaison va aboutir à la formation de photooxydants très puissants¹⁸.

$$R^{\bullet} + {}^{3}O_{2} \longrightarrow ROO^{\bullet}$$
(4)

$$ROO^{\bullet} + PH^{\bullet} \longrightarrow P + ROOH$$
 (5)

$$PS_{r\acute{ed}}^{\bullet-} + {}^{3}O_{2} \longrightarrow PS(S_{0}) + O_{2}^{\bullet-}$$
anion superoxyde
(6)

Le processus photochimique de type II

Dans le mécanisme de type II, l'intermédiaire réactif est l'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$. celui-ci est formé par transfert d'énergie entre l'état triplet du photosensibilisant $PS^{*}(T_{1})$ et l'état fondamental de l'oxygène moléculaire ${}^{3}O_{2}$ (7). C'est une réaction prédominante dans les milieux oxygénés. La phototoxicité des photosensibilisants est dépendante de la concentration de l'oxygène dans le milieu¹⁹. L'oxygène moléculaire singulet est une forme très active et cytoxique^{14, 20, 21}. Il va réagir à son tour avec les substrats (RH) du milieu pour former des substrats oxydés (ROOH) très actifs (8).

$$PS(S_0) \xrightarrow{h\nu} PS^*(S_1) \xrightarrow{croisement} PS^*(T_1)$$
(1)

$$PS^{*}(T_{1}) + {}^{3}O_{2} \xrightarrow{\text{Tranfert d'énergie}} PS + {}^{1}O_{2}$$
(7)

$$RH+{}^{1}O_{2} \longrightarrow ROOH$$
(8)

Ces deux mécanismes type I et type II, tout deux faisant intervenir l'état triplet du photosensibilisant $PS^*(T_1)$, peuvent être schématisés selon la figure I.1. Cette dernière indiquant que la réaction photochimique est oxygèno-dépendante, l'oxygène est nécessaire à toute réaction photochimique, dans les processus liés à la PDT.



Figure I.1 - Schéma résumant les réactions photochimiques de type I et de type II.

2 Les agents photothérapeutiques utilisés en PDT

Les mécanismes de la photosensibilisation sont dépendants de plusieurs variables : la localisation, la pharmacocinétique et la photophysique du photosensibilisant. Le paramètre photophysique consiste en la nécessité d'utiliser une longueur d'onde d'absorption du photosensibilisant pour activer l'effet cytotoxique. Une absorption optimale dans la région spectrale du rouge (650 à 800 nm) représente un grand intérêt dans le développement de la PDT car cette absorption correspond à la région où les tissus sont les plus transparents à la lumière. Le photosensibilisant doit posséder un rendement quantique en oxygène singulet élevé afin d'induire les réactions photochimiques ci-dessus. Il doit posséder une sélectivité

vis-à-vis de la tumeur en étant de préférence amphiphile, c'est-à-dire qu'il doit avoir une affinité vis-à-vis à la fois des milieux hydrophiles et hydrophobes. Cette caractéristique va lui permettre une excellente incorporation au sein des organites cellulaires comme les lysosomes et comme les mitochondries. L'action directe sur les cellules sera donc optimale. Et il doit être pur et non toxique en absence de lumière. Tout ceci constitue les propriétés idéales requises pour un photosensibilisant en vue d'aboutir à une action photodynamique efficace^{16, 19}. Il a été conclu que le futur rôle de la PDT dépendrait du développement des photosensibilisants qui doivent être purs et posséder une structure bien définie. L'élimination de ces photosensibilisants par le corps doit être maximal d'éviter aux patients des réactions après session en PDT suite à l'exposition à la lumière naturelle.

La première génération de photosensibilisants était basée sur l'hématoporphyrine (Hp) et l'hématoporphyrine dérivée (HpD). Cette dernière est un mélange complexe de produits basés sur la structure des porphyrines. Le Photofrin®, qui est la fraction oligomérique de l'HpD, s'est avéré un photosensibilisant plus actif. Il a permis à la PDT d'améliorer son développement. Mais ce photosensibilisant possède certains inconvénients dus notamment à une complexité chimique (mélange de plusieurs porphyrines) et une photosensibilisation cutanée importante.

Puis la seconde génération de photosensibilisants est apparue. Ce ne sont plus des mélanges de porphyrines mais des composés purs qui ne sont pas nécessairement des porphyrines. Ceci a permis d'améliorer leur activité et leur sélectivité durant les essais cliniques, ce qui a permis de résoudre les problèmes rencontrés avec le Photofrin®. De plus, certains de ces photosensibilisants (les chlorines) présentent une forte absorption dans la région spectrale du rouge, ce qui est un atout pour leur utilisation en PDT.

Nous allons décrire les avantages et les inconvénients de chacune de ces deux familles de photosensibilisants ainsi que les principaux agents thérapeutiques utilisés dans le cadre du développement de la thérapie photodynamique.

2.1 Les photosensibilisants de première génération

L'hématoporphyrine dérivée, ainsi que ces variantes commerciales comme le Photofrin®, le Photosan®, le Photogem® et le Photocarcinorin® ont une place importante dans l'histoire de

la PDT. Ce sont des photosensibilisants de première génération. Les premières observations d'activité photodynamique ont été obtenus avec ces composés, et la première autorisation d'essais cliniques a été obtenue pour le Photofrin®.

L'hématoporphyrine dérivée (HpD) a été décrite par Lipson et coll.¹² en 1961 comme un outil utile pour le diagnostic. En effet, après une administration systématique de HpD, les tissus tumoraux pouvaient être observés par le biais d'une émission de fluorescence dans le rouge. C'est plus tard que son utilisation en PDT à été testée¹³.

L'HpD est un mélange complexe de diverses porphyrines résultant de la transformation de l'hémoglobine difficile à reproduire. L'activation de ce photosensibilisant se fait à longueur d'onde de 630 nm qui ne correspond pas au maximum d'absorption de celui-ci. De ce fait, elle n'induit pas un effet photochimique important. En revanche, elle possède un taux de pénétration dans les tissus élevé (2-4 mm)²². De plus, elle n'est pas sélective par rapport aux tumeurs, ce qui entraîne une photosensibilisation cutanée de huit à douze semaines.

Mais l'HpD possède certains avantages telle qu'une préparation qui est aisée à mettre en oeuvre¹². La littérature fait aussi état d'expériences extensives au niveau clinique²³ qui ont montré systématiquement l'activité clinique de l'HpD.

Le Photofrin® correspond à la solubilisation de l'HpD dans une base en milieu aqueux. Il est formé de dimères d'HpD et de grands oligomères, qui sont les espèces actives de l'HpD. Ainsi, le Photofrin® possède une grande activité photodynamique, ce qui fait de lui un bon agent thérapeutique très utilisé en PDT²³. Mais celui-ci n'échappe pas aux mêmes critiques que l'HpD par rapport à la complexité de sa composition. Egalement, son utilisation nécessite une période sans lumière pour le patient après traitement (4 à 6 semaines)²⁴. De plus, celui-ci absorbe dans la région de faibles longueurs d'ondes (404 nm) qui correspondent à une faible pénétration dans les tissus.

2.2 Les photosensibilisants de seconde génération

Une nouvelle variété d'agents photosensibles a été proposée avec pour objectif l'élimination des problèmes associés au Photofrin®, *i.e.* la structure complexe, une photosensibilisation

importante de la peau et l'utilisation de longueur d'onde faiblement pénétrante au niveau des tissus.

Ainsi, les photosensibilisants de seconde génération ont été développés avec un certain nombre de critères apparents²⁵ : il doit posséder une faible cytotoxicité - voire nulle - en absence de lumière. Leur composition se limite à une structure chimique bien définie. Leur synthèse doit comporter un faible nombre d'étapes avec un rendement de réaction élevé, ce qui garantit un coût moindre. De plus, il faut qu'ils aient un fort caractère amphiphile et posséder une forte absorption dans la région spectrale du rouge. Nous allons faire une revue d'effectifs des principaux composés²⁶.

Les chlorines sont des porphyrines dont une double liaison a été réduite. Ce qui a entraîné l'apparition d'une nouvelle et importante bande d'absorption dans la région spectrale du rouge. Il existe deux chlorines importantes :

Le dérivé aspartyl de la **chlorine-e6 (NPe6)**²⁷ possède deux pics d'absorption à 400 et 654 nm, son rendement quantique est très élevé, d'où sa grande utilisation en PDT. Mais la NPe6 possède une photosensibilisation cutanée très similaire à celle du Photofrin®.

La **5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine ou Foscan® (m-THPC)**¹⁶, qui possède une absorption importante dans le rouge et un effet thérapeutique très intéressant pour la PDT. Ainsi, on peut l'utiliser avec de faibles concentrations et des doses de lumière plus faibles. Le problème provient de son insolubilité dans l'eau ce qui requiert un mélange éthanol/polyéthylène glycol/eau (20:30:50, v/v/v) en vue de son injection. Ce caractère amphiphile entraîne aussi des interactions avec le plasma et/ou les tissus, ce qui joue un grand rôle dans la biodistribution de la m-THPC. Mais nous reverrons plus en détails ce composé car c'est celui qui a fait l'objet de nos travaux.

Les Purpurines^{28, 29} qui absorbent à 660 nm, possèdent une efficacité photodynamique plus grande que le Photofrin®. Mais elles sont aussi peu solubles dans l'eau et nécessitent l'utilisation d'un agent de solubilisation (Cremophor EL) en vue de leur injection aux patients²⁶. Ce composé est utilisé dans le traitement des cancers de la prostate par PDT³⁰.

Les Benzoporphyrines dérivées³¹, qui absorbent à 690 nm, comme la plupart des porphyrines hydrophobes, présentent une agrégation en milieu aqueux. L'addition de solvants organiques ou de protéines entraîne une disruption des formes agrégées, voire une monomérisation, ce qui facilite son incorporation intracellulaire. Mais elles s'avèrent être un bon agent thérapeutique notamment dans le traitement des cancers de la peau³².

Les Phtalocyanines³³ ont une structure similaire aux porphyrines mais absorbent entre 650 et 700 nm, et possèdent aussi un caractère amphiphile. Ce sont des colorants utilisés dans les encres de stylo bille. En les conjuguant avec des métaux, elles s'avèrent être de bon agents thérapeutiques.

*Les Texaphyrines*³⁴, ce sont des structures de porphyrines stabilisées par l'insertion de métaux dans le centre de l'anneau pyrrolique. Elles possèdent des bandes d'absorption autour de 732 nm.

L'Acide Δ *Aminolévulinique* (ALA)³⁵ est un acide aminé en position Δ utilisé en PDT et en diagnostic depuis ces dix dernières années. L'ALA est le premier intermédiaire métabolique de la synthèse des protoporphyrines, c'est un processus multiétapes. La *Protoporphyne IX* ainsi obtenu absorbe peu à 630 nm et montre une cytotoxicité marquée envers les cellules endothéliales³⁶.

Nous avons porté notre choix sur l'étude de la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine ou Foscan® (m-THPC)¹⁶, car c'est un des photosensibilisants le plus étudié à l'heure actuelle, mais aussi parce qu'il possède certaines caractéristiques d'un photosensibilisant idéal et notamment une grande activité photodynamique. Il constitue donc un bon candidat pour notre étude sur le comportement photodynamique des agents thérapeutiques par MALDI/ FTICRMS. Concernant le choix de la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine (m-THPBC), il s'est avéré judicieux car il s'agit d'un composé final issu de la synthèse de la m-THPC et il possède également des propriétés photophysiques intéressantes en vue de son utilisation en PDT.

3 La temoporfine et la bactériochlorine

La 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine ou Foscan® (m-THPC, temoporfine) et la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine (m-THPBC, bacteriochlorine) sont deux photosensibilisants de seconde génération qui présentent respectivement des bandes d'absorption importantes à 652^{16} et 739^{37} nm. Ces bandes d'absorption dans la région spectrale du rouge et du proche infrarouge - correspondant au meilleur taux de pénétration de la lumière dans les tissus - font de ces deux photosensibilisants d'intéressants candidats en vue de leur utilisation en PDT.

Dans cette partie, nous allons faire l'état des lieux concernant la caractérisation et le suivi de la phototransformation de ces deux molécules. Nous allons également revenir sur leurs structures, leurs synthèses et leurs utilisations dans le cadre du développement de la PDT.

3.1 Définition structurale

Les porphyrines possèdent une nomenclature appropriée à leur structure chimique composée de quatre noyaux pyrroliques reliés entre eux par des ponts comportant un carbone au sommet appelé position *méso* (aux positions 5, 10, 15, 20 sur la figure I.2). Par convention, les deux hydrogènes appelés imino-hydrogènes sont placés sur les atomes d'azote en position N-21 et N-23 et les quatre pyrroles portent les labels de A à D. Les positions 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 et 18 correspondent aux positions β du pyrrole, leurs liaisons sont appelées $\beta\beta'$. Tandis que les positions α du pyrrole correspondent aux positions 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 et 19, et leurs liaisons sont nommées $\alpha\alpha'$.

Les chlorines ont une double liaison $\beta\beta$ ' saturée, tandis que les bactériochlorines ont deux liaisons réduites qui sont opposées l'une et l'autre. Les chlorines et les bactériochlorines sont respectivement des β -dihydroporphyrines et des β -tétrahydroporphyrines, qui peuvent subir une déshydrogénation pour atteindre une porphyrine plus stable (m-THPP) par réaction d'autooxidation²⁵. Tous ces composés possèdent un système aromatique comportant 18 électrons π .



Figure I.2 – Nomenclature des porphyrines (numérotation suivant le système IUPAC)²⁴.

3.2 Propriétés spectrales

Les spectres d'absorption des porphyrines sont sensibles à la symétrie du noyau tetrapyrrolique¹⁶. La réduction des doubles liaisons $\beta\beta$ ' dans le cas de la m-THPC et de la m-THPBC par rapport à la m-THPP (figure I.3), entraîne une asymétrie de la molécule et un effet bathochrome et hyperchrome probant sur la Q-bande I. En effet, la m-THPP en solution dans le méthanol possède une bande d'absorption à 644 nm (ϵ = 3400), tandis que les bandes d'absorption de la m-THPC et de la m-THPBC sont respectivement à 650 nm (ϵ = 29600) et 735 nm (ϵ = 91000)³⁸.



Figure I.3 - Structures moléculaires de (a) m-THPP, (b) m-THPC, (c) m-THPBC.

En fluorescence avec une longueur d'onde d'excitation de 415 nm qui correspond à la bande d'absorption de Soret, la m-THPP et la m-THPC en solution dans le méthanol présentent deux bandes de fluorescence : pour la m-THPP à 649 nm et à 715 nm et pour la m-THPC à 653 nm et à 720 nm. Quant à la m-THPBC, elle possède trois bandes de fluorescence à 612, 653 et 746 nm. En réalité comme cela a été déjà suggéré, la bande à 653 nm était due au 5 % de m-THPC présent dans la bactériochlorine. Quant à celle à 612 nm, elle dépend probablement d'une autre impureté absorbant autour de 610 nm. En principe, la m-THPBC ne possède qu'une seule bande à 746 nm qu'il est possible de mesurer lorsque l'on utilise comme longueur d'onde d'excitation 680 nm au lieu de 500 nm en spectrophotométrie de fluorescence³⁸. Nous avons vérifié ce point au chapitre III (cf. Ch.III § 1.4).

3.3 Synthèse²⁵



Figure I.4 – Synthèse de la m-THPC et de la m-THPBC par la réduction de la m-THPP¹⁶.

Il existe deux procédures pour réduire une porphyrine en sa chlorine correspondante. La première consiste en une réduction acide via un complexe de fer. La seconde utilise un traitement avec le diimide HN=NH, généré par la p-tosyl hydrazide et le K_2CO_3 - pyridine. Il est à noter que les deux réactions entraînent la formation de la m-THPC, mais aussi la formation de la bactériochlorine en même temps. Car il est difficile de contrôler la réduction à la seule première étape. Alors, si l'objectif est d'atteindre la chlorine, il est nécessaire d'utiliser le o-chloranil qui va entraîner une déshydrogénation des bactériochlorines. Il faudra ensuite effectuer une chromatographie afin d'isoler la chlorine. De plus, la réduction par le HN=NH en présence de zinc d'une métalloporphyrine conduit préférentiellement à des

chlorines et des bactériochlorines. Toutefois, il s'avère difficile d'éliminer complètement le zinc lors des purifications (cf. Ch.III § 2.2.1).

Ainsi, la réduction utilisant le diimide de la m-THPP donne sa chlorine correspondante la m-THPC et ensuite sa bactériochlorine : la m-THPBC (figure I.4). De plus, la synthèse de la m-THPC à partir de 163 mg de m-THPP entraîne la formation de 77 mg de poudre solide violette, soit une rendement de réaction de 47 %. Concernant la m-THPBC, le rendement de réaction est de 26 $\%^{16}$.

3.4 Photodégradation de la m-THPC et de la m-THPBC

La m-THPC et la m-THPBC, comme tous les autres photosensibilisants, subissent une dégradation suite à une exposition à la lumière. Ce processus est plus communément appelé photoblanchiment. Il est associé à la décroissance de certaines bandes d'absorption et de fluorescence et/ou à l'apparition de nouvelles bandes d'absorption et de fluorescence³⁹.

La cinétique de la photodégradation de la m-THPC a fait l'objet de nombreuses études dans différents systèmes expérimentaux, mais aussi au niveau clinique. Cependant, les études datant du début de nos travaux n'avaient pas encore élucidé la ou les causes de la forte activité induite par la m-THPC. En effet, outre le rendement important en oxygène singulet, Peng et son équipe⁴⁰ affirment que l'activité photodynamique de la m-THPC ne se résume pas à ce seul paramètre mais à plusieurs paramètres liés aux propriétés chimiques et spectrales du photosensibilisant : une grande pureté (98 %), une bonne sélectivité tumorale, une exceptionnelle phototoxicité, un bon rendement quantique de fluorescence et une grande absorption dans le domaine spectral du rouge à 652 nm¹⁶.

La m-THPC étant un produit amphiphile, sa distribution dans les cellules est diffuse⁴¹. Elle se localise de manière préférentielle au niveau de la bicouche lipidique de la membrane des mitochondries, mais aussi au niveau des organites hydrophiles comme les lysosomes. Ceci est dû à son caractère à la fois hydrophobe et lipophile (amphiphile). Cette particularité pourrait expliquer sa grande activité photodynamique comparé à celle des autres photosensibilisants.

Ma et coll.⁴² ont mis en évidence l'efficacité du photoblanchiment de la m-THPC au sein des cellules V79 (hamster chinois). En effet, ils ont exposé à la lumière (tubes fluorescents

émettant de 375 à 450 nm) les cellules contenant le photosensibilisant. Ainsi, ils ont montré que le rendement de photoblanchiment (caractérisé par la baisse de fluorescence) de la m-THPC était supérieur à celui de la m-THPP et du Photofrin®.

Le suivi de la photodégradation de la m-THPC en solution dans un tampon (Phosphate Buffer Saline, PBS) avec ou sans protéines (Sérum de Veau Fœtal, SVF) irradié à 415 nm (Laser à Kripton, 3,1 mW/cm²) a montré l'apparition de nouvelles bandes à 325 nm et 450 nm caractéristiques de la formation de photoproduits⁴³. Mais cette étude a aussi montré une hausse de l'efficacité du photoblanchiment liée à la présence des protéines. Belitchenko⁴³ a expliqué ce comportement par le fait que la m-THPC se trouve dans un état d'agrégation lorsqu'elle est en solution dans le PBS seul. Et l'ajout de protéines (SVF) entraîne une monomérisation de la m-THPC, car l'efficacité du photoblanchiment de la m-THPC en solution dans le méthanol a été lié au fait que la m-THPC se trouvait à l'état de monomère dans ce solvant.

L'équipe de Forrer⁴⁴ a mené des études sur les cinétiques de disparition de fluorescence in vivo de la m-THPC dans la cavité bucale et dans l'œsophage après injection intraveineuse chez plusieurs patients (0,15 mg/kg de m-THPC, illumination laser à 514 nm à 100 mW/cm² 96 heures après l'injection). Il en ressort que les résultats expérimentaux indiquent une cinétique de second ordre et que les niveaux de nécrose peuvent être mis en relation avec l'inverse du taux de disparition de fluorescence.

La m-THPC a montré une excellente capacité à éradiquer certaines tumeurs (des mésothéliomes malins et des tumeurs au niveau de la cavité buccale) et une sélectivité vis-à-vis des tissus in vivo, permettant un traitement jusqu'à 6 mm d'épaisseur⁴⁵.

Les informations concernant la m-THPBC sont plus clairsemées. Elles font état de ses propriétés photophysiques dans divers milieux^{37, 38} mais aussi de l'efficacité photodynamique de la m-THPBC mise en contact avec des cellules tumorales Colo 26 (colon de souris)⁴⁶. Toutefois celle-ci reste moins efficace que la m-THPC car les phénomènes d'aggrégation et d'oxydation entraînent une baisse de son activité photodynamique⁴⁶. Une étude récente à mis en évidence l'avantage d'un traitement dans le proche infrarouge (740 nm) via la m-THPBC sur des tumeurs in vivo chez les rats⁴⁷.

3.5 Caractérisation de l'oxygène singulet

La réaction de photodégradation de la m-THPC produit de l'oxygène singulet par le biais du mécanisme de type II. Hadjur et coll.⁴⁸ ont étudié le comportement de la m-THPC dans des solutions aqueuses contenant 10 % de SVF après irradiation à 650 nm. Ils ont ajouté aux solutions de m-THPC des enzymes antioxydantes (superoxyde dismutase, catalase) pour mettre en évidence le mécanisme de type I et de la deferoxamine. Ils ont également utilisé des « quenchers » d'oxygène singulet pour mettre en évidence le mécanisme de type I et de la deferoxamine. Ils ont également utilisé des « quenchers » d'oxygène singulet pour mettre en évidence le mécanisme de type II (1,4-diazabicyclo-[2,2,2] octane (DABCO) et l'histidine), mais aussi la molécule de 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) qui réagit avec l'oxygène singulet pour produire de l'orthodibenzoylbenzène (o-BB). Ainsi, en comparant les spectres d'absorption et de fluorescence des solutions de m-THPC avec ou sans ces différentes molécules sondes - mais aussi les rendements quantiques de production de l'oxygène singulet - Hadjur et coll. ont démontré que l'oxygène singulet jouait un rôle important dans la photodégradation de la m-THPC et dans la formation de ses photoproduits.

4 Spectrométrie de masse et photosensibilisant

Les porphyrines et les métalloporphyrines ont été très étudiées ces vingt dernières années par spectrométrie de masse. Afin d'obtenir les empreintes spectrales de ces composés, un certain nombre de méthodes d'ionisation ont été utilisées comme l'impact électronique (EI)⁴⁹, l'ionisation chimique (CI)⁵⁰, le bombardement rapide d'atome (FAB)⁵¹, la désorption par plasma⁵², la désorption laser⁵³, l'électrospray (ESI)⁵⁴, l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI)⁵⁵, et la désorption laser assistée par matrice (MALDI)^{56, 57}. L'utilisation de la spectrométrie de masse par impact électronique a permis d'établir et d'obtenir des informations sur la structure des molécules analysées à partir des fragments des ions ayant une ou plusieurs charges⁴⁹. Dans ce cas, les empreintes spectrales montrent la présence de l'ion moléculaire M^{*+} ce qui permet une identification précise de la porphyrine étudiée. La forte fragmentation en impact électronique pour certaines porphyrines, mais aussi l'interaction entre l'analyte et la matrice utilisée en FAB, ont montré les limites de ces deux techniques. Ainsi, la désorption laser assistée par matrice est apparue comme une alternative intéressante, car elle offre des avantages certains par rapport aux autres méthodes d'ionisation. En effet, elle procure une certaine compatibilité avec ses matrices et elle permet

un contrôle du degré de fragmentation qui peut être ajusté avec la puissance laser. De plus, les études en MALDI/TOFMS sur les porphyrines y ont montré une grande sensibilité^{56, 57}.

L'analyse de photosensibilisant comme la protoporphyrine IX⁵⁸, l'hématoporphyrine dérivée⁵⁹ ou le Photofrin®⁵⁹ utilisant la désorption laser directe comme méthode d'ionisation a mis en évidence la présence de leur ion moléculaire M^{•+} respectif. Dans le cas plus précis du Photofrin®, qui est composé de plusieurs porphyrines à l'état de dimères ou d'oligomères, chacun des composés de son mélange a été identifié, mais aucune masse élevée prouvant la présence de dimère n'a été détectée⁵⁹. Ce fut également le cas lors de l'analyse de la m-THPC par cette même méthode⁵⁹, où seuls les ions moléculaires ou cationisés ont été détectés.

Toutes ces études ont en majeure partie été effectuées sur des porphyrines standard sans traitement photodynamique en vue d'obtenir leur empreinte caractéristique. En effet, seul Jones⁶¹ avait étudié la formation de produits issus d'une exposition à la lumière de la m-THPC par HPLC/ESIMS, au moment où nous avons débuté nos travaux en 1998.

En faisant le bilan de tous ces résultats, nous étions convaincus que l'association de la technique d'ionisation par MALDI couplée à la spectrométrie de masse combinée avec l'étude conjointe en spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et de fluorescence, nous permettrait une identification plus précise des espèces intervenant à chaque étape de la réaction photochimique. Ainsi, nous pouvions envisager une meilleure compréhension des mécanismes intervenant dans les processus de la thérapie photodynamique. Parallèlement à nos travaux, Blais et coll.⁶⁰ ont mis en évidence l'hydroxylation du photosensibilisant (dissous dans un mélange éthanol/eau) suite à une irradiation laser à 514 nm.

5 Références

- 1. Kessel D, Woodburn K, Int. J. Biochem. , 25, 1377, 1993.
- 2. Fischer AMR, Murphree AL, Gomer CJ, Lasers in surgery & medicine, 17, 2, 1995.
- 3. Guillemin F, Meunier A, Lignon D, Kosminski P, Diller ML, Falcoz-Vigne V, Med. Chir. Dig., 21, 197, 1992.
- Guillemin F, Patrice T, Brault D, D'Hallewin MA, Lajat Y, Leroy M, Meunier A, Lignon D, Path. Biol., 41, 110, 1993.
- 5. Forrer M, Mizeret J, Braichotte D, Wagnières G, Savary JF, Monnier P, Jichlinski P, Leisinger HJ, Van den Bergh H, Proc. SPIE, 2371, 109, 1995.
- 6. Monnier Ph, Savary M, Fontolliet Ch, Wagnières G, Chatelain A, Cornaz P, Depeursinge Ch, Van den Bergh H, Laser Tumour Therapy, Eds Telles MA, Espagne, Madrid, 1990.
- 7. Svanberg K, Svanberg S, La Recherche, 24, 686, 1993.
- 8. Von Tappeiner H, Jesionek A, Muench Med Worchschr, 1, 2042, 1903.
- 9. Policard A, C. R. Hebdomadaires Soc. Biol., 91, 1422, 1924.
- 10. Auler H, Banzer G, Z. Krebsforsch, 53, 65, 1942.
- 11. Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ, Proc. Soc. Exp. Viol. Med., 68, 640, 1948.
- 12. Lipson LR, Balds EJ, Olsen EM, J. Natl. Cancer Inst., 26, 1, 1961.
- 13. Lipson LR, Gray MJ, Baldes EJ, Cancer Congr. Tokyo, (abstract) 393, 1966.
- 14. Dougherty TJ, Grinder GB, Weishaupt KR, Boyle D, J. Natl. Cancer Inst., 55, 115, 1975.
- 15. Kelly JF, Snell ME, J. Urol., 155, 150, 1976.
- 16. Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC, Biochem. J., 261, 277, 1989.
- 17. Foote CS, Photochem. Photobiol., 54, 659, 1991.
- 18. Laustriat G, Biochimie, 68, 771, 1996.
- 19. Mac Robert AJ, Bown SG, Pillps D, Ciba Foundation Symposium, 146, 4, 1989.
- 20. Epe B, Chem. Bio. Interaction, 80, 239, 1991.
- 21. Weishaupt KR, Brakhage P, Dietel W, Proc. SPIE, 2324, 276, 1995.
- 22. Meunier-Reynes A, Dieblod S, Lignon D, Granjon Y, Guillemin F, Proc. SPIE, 1525, 177, 1991.
- 23. Kato H, J. Photochem. Photobiol., B : Biol., 42, 96, 1998.
- Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A, Cancer Res., 38, 2628, 1978.

- 25. Bonnett R, Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, Ed. Gordon and Breach Science Publishers, 2000.
- 26. Kessel D, Dougherty TJ, Rev. Contemp. Pharmacother., 10, 19-24, 1999.
- 27. Taber SW, Fingar VH, Coots CT, Wieman TJ, Clin. Cancer Res., 4, 2741, 1998.
- Morgan AR, Garbo GM, Keck RW, Selman SH, Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng., 847, 172, 1987.
- 29. Morgan AR, Garbo GM, Keck RW, Selman SH, Cancer Res., 48, 194, 1988.
- 30. Selman SH, Keck RW, Hamptom JA, J. Urol. , 156, 258, 1996.
- 31. Levy JG, Waterfield E, Richter A, Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng., 2078, 99, 1994.
- 32. Leung J, Semin. Oncol., 21, 4, 1994.
- 33. Bonnett R, Chem. Soc. Rev., 24, 19, 1995.
- Woodburn KM, Qing F, Miles DR, Kessel D, Luo Y, Young SW, Photochem. Photobiol., 65, 420,1997.
- 35. Kennedy JC, Pottier RH, J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 14, 275, 1992.
- 36. Strauss WSL, Sailer R, Schneckenburger H, Akgün N, Gottfried V, Chetwer L, Kimel S, J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 39, 176, 1997.
- 37. Bonnett R, Djebal BD, Hamilton PA, Martinez G, Wierrani F, J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 53, 136, 1999.
- 38. Bonnett R, Charlesworth P, Djebal BD,. Foley S, McGarvey MJ, Truscott TG, J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2, 325, 1999.
- 39. Wessels JM, Spoka R, Heil P, Seidlitz HK, Int. J. Radiat. Biol., 64, 475, 1993.
- 40. Peng Q, Moan J, Ma LW, Nesland SM, Cancer Res. , 55, 2620, 1995.
- 41. Rezzoug H, Barberi-Heyol M, Merlin JL, Bolotine L, Lgnon D, Guillemin F, Bull. Cancer, 83, 816, 1996.
- 42. Ma LW, Moan J, Berg K, Lasers Med. Sci., 9, 127, 1994.
- 43. Belitchenko I, Melnikova V, Bezdetnaya L, Rezzoug H, Merlin JL, Potapenko A, Guillemin F, Photochem. Photobiol., 67, 584, 1998.
- 44. Forrer M, Glanzmann T, Braichotte D, Wagnières G, Van den Bergh H, Savary JF, Monnier Ph, Proc. SPIE, 2627, 33, 1995.
- 45. Gupta G, Morton CA, Whitehurst C, Moore JV, Mackie RM, Brit. J. Dermato., 141, 385, 1999.
- 46. Grahn MF, McGuinness A, Benzie R, Boyle R, De Jode ML, Dilkes MG, Abbas B, Williams NS, J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 37, 261, 1997.
- 47. Rovers JP, De Jode ML, Grahn MF, Lasers in Surgery and Medicine, 27, 235, 2000.

- 48. Hadjur C, Lange N, Rebstein J, Monnier P, Van den Bergh H, Wagnières G, J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 45, 170, 1998.
- 49. Beato BD, Yost RA, Quirke JME, Org. Mass. Spectrom. , 24, 875, 1989.
- 50. Shaw GJ, Elington G, Quirke JME, Anal. Chem. , 53, 2014, 1981.
- 51. Miller JM, Mass. Spectrom. Rev., 9, 319, 1990.
- 52. Lindsey JS, Chaudary T, Chait BT, Anal. Chem. , 64, 2804, 1992.
- 53. Ha G, Hogan JD, Laude DA, J. Am. Soc. Mass Spectrom. , 4, 159, 1993.
- 54. Van Berkel GJ, McLuckey SA, Glish GL, Anal. Chem. , 63, 1098, 1991.
- 55. Rosell-Mele A, Carter JF, Maxwell JR, J. Am. Soc. Mass Spectrom., 7, 965, 1996.
- 56. Bartlet MG, Busch KL, Wells CA, Schey KL, J. Mass Spectrom., 31, 275, 1996.
- 57. Green MK, Medforth CJ, Muzzi CM, Nurco DJ, Shea KM, Smith KM, Lebrilla CB, Shelnutt JA, Eur. Mass Spectrom., 3, 439, 1997.
- 58. Hahn JH, Zenobi R, Zare RN, J. Am. Chem. Soc. , 109, 2842, 1987.
- 59. Zhan Q, Voumard P, Zenobi R, Anal. Chem., 66, 3259, 1994.
- 60. Kasselouri A, Bourdon O, Demore D, Blais JC, Prognon P, Bourg-Heckly G, Blais J., *Photochem. Photobiol.*, 70, 275, 1999.
- Jones RM, Wang Q, Lamb JH, Djebal BD, Bonnett R, Lim CK, J. Mass Chromatogr. A, 722, 257, 1996.

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

-

CHAPITRE II

MATERIELS ET METHODES

L'étude de la photodégradation de la m-THPC et des photosensibilisants en général en solution ou en milieu cellulaire fait l'objet de nombreuses études. Mais la majeure partie de ces travaux consiste en un suivi du comportement du spectre d'absorption et/ou de fluorescence au cours du traitement photodynamique (cf. Ch.I § 3.4). Les conclusions sont donc basées sur les changements d'aspect des bandes caractéristiques et/ou sur l'apparition de nouvelles bandes, mais ne permettent pas une identification précise des espèces jouant un rôle dans les mécanismes photodynamiques.

Les résultats obtenus lors des analyses de porphyrines par spectrométrie de masse et les études récentes sur la photodégradation de la m-THPC (cf. Ch.I § 4) prouvent l'utilité de cette technique d'analyse dans la compréhension de la PDT.

Ainsi, l'utilisation de la spectrométrie de masse à transformée de Fourier par résonance cyclotronique des ions couplée à la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI/FTICRMS) s'avère un outil complémentaire à la spectrophotométrie pour lever l'ambiguïté sur la nature des espèces présentes dans les solutions de photosensibilisant avant et après illumination laser.

Nous nous sommes aussi intéressés, durant nos travaux, à identifier la présence de l'oxygène moléculaire singulet en utilisant une sonde moléculaire spécifique. En effet, en réagissant avec l'oxygène singulet, elle se transforme en une autre molécule qui peut être caractérisée par MALDI/FTICRMS. De plus, l'utilisation de la chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par piégeage d'ions (GC/ITMS) a permis de vérifier la pureté des solutions étudiées. Cette étude a fait l'objet du mémoire de DEA de Jérôme Bour.

Ce chapitre va donc être consacré à la description des différentes techniques de spectrométrie de masse et de spectrophotométrie utilisées durant ces travaux. Nous nous attacherons aussi à décrire les protocoles mis en œuvre concernant l'étude des photosensibilisants (m-THPC et m-THPBC) avant et après illumination laser dans divers milieux de solvatation.
1 Spectrométrie de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier (FTICRMS)

1.1 Introduction

La spectrométrie de masse à transformée de Fourier par résonance cyclotronique des ions est une technique d'analyse dont le principe repose sur la détermination du rapport masse sur charge des ions formés. Ce rapport est obtenu par la mesure des fréquences cyclotroniques engendrées par un champ magnétique. C'est en 1974 que Alan Marshall et Melvin Comisarow¹ ont couplé pour la première fois la transformée de Fourier à une cellule ICR. Depuis, cette technique a connu un développement rapide et constant. A l'heure actuelle, il existe près de 300 instruments qui équipent les laboratoires de recherche à travers le monde, et les domaines d'applications vont de l'analyse des protéines à celle de composés minéraux²⁻



Figure II.1 - Schéma descriptif de la microsonde FTICRMS.

L'appareil que nous possédons au sein du laboratoire est un prototype unique (figure II.1). En effet, l'instrument initial, le FTMS 2000, était doté d'une source d'ionisation en impact électronique qui a subi des modifications pour être utilisé en tant que microsonde laser^{9, 10}. Dans le cadre de notre étude sur les photosensibilisants utilisés en PDT, nous avons utilisé la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) couplée à la FTICRMS. Nous allons décrire les principales caractéristiques de ce couplage.

1.2 Principe de la FTICRMS

Notre appareil possède une configuration du type double cellule cubique (5 cm de coté chacune). L'échantillon est placé à l'intérieur de la cellule source cubique centrée dans un champ magnétique de 3,04 T. Un pompage différentiel, qui assure un vide poussé de l'ordre de 10^{-6} à 10^{-7} Pa, permet le transfert des ions entre la cellule source et la cellule d'analyse. La cellule est constituée de trois paires de plaques nécessaires au piégeage des ions, deux plaques de détection et deux plaques d'excitation (figure II.2). Ainsi les ions, qui sont générés durant la désorption/ionisation laser sur la surface de l'échantillon, sont piégés selon l'axe z grâce au puits de potentiel établi par la tension appliquée sur les plaques de piégeage (+ 0,5 à 2 V en mode de détection positif). Les ions sont focalisés au centre de la cellule et contraints à adopter une orbite circulaire perpendiculaire au champ magnétique (mouvement cyclotronique) de faible rayon dans le plan xy.



Figure II.2 – Schéma de la cellule de la microsonde FTICRMS.

La présence du champ magnétique et du champ électrique entraîne un mouvement complexe des ions au sein de la cellule. Ce mouvement se décompose en trois modes d'oscillation différents, dont le plus remarquable est le mouvement cyclotronique.

Lors de leur génération par désorption/ionisation laser, les ions sont animés d'une vitesse \overline{V} au sein du plasma. La présence du champ magnétique B_o les soumet à la force de Lorentz F.

$$\vec{F} = q \cdot \left(\vec{V} \wedge \vec{B_o} \right)$$

L'accélération angulaire (en rad/s) est définie par :

$$\left\|\frac{d\vec{\mathbf{V}}}{dt}\right\| = \frac{(\mathbf{V}_{xy})^2}{r} = \mathbf{r} \cdot \omega^2 \text{ avec } \mathbf{V}_{xy} = \sqrt{\mathbf{V}_x^2 + \mathbf{V}_y^2}$$

Le champ magnétique est dirigé selon l'axe z et la force de Lorentz est dans le plan xy. Ainsi, nous pouvons définir la condition d'équilibre :

$$\frac{\mathbf{m} \cdot (\mathbf{V}_{xy})^2}{\mathbf{r}} = \mathbf{q} \cdot \mathbf{V}_{xy} \cdot \mathbf{B}_{c}$$

(r : le rayon de l'orbite en m, m : la masse de l'ion en kg et q : la charge de l'électron en C)

Nous en déduisons les formules de la vitesse angulaire et de la fréquence cyclotronique :

$$\omega_{c} = \frac{\mathbf{q} \cdot \mathbf{B}_{o}}{\mathbf{m}} (\text{rad/s})$$
$$\nu_{c} = \frac{\mathbf{q} \cdot \mathbf{B}_{o}}{2\pi \cdot \mathbf{m}} (\text{Hz})$$

Nous constatons ainsi pour chaque ion donné, que le rapport m/z correspond à une fréquence cyclotronique unique.

Il y a deux étapes distinctes dans la mesure de la fréquence cyclotronique :

- Excitation du mouvement cyclotronique.
- Détection du mouvement cyclotronique.

Excitation du mouvement cyclotronique

Dans un champ magnétique uniforme, tous les ions se déplacent selon leur propre fréquence cyclotronique. Ce mouvement d'ensemble est désordonné (chaque ion a sa propre trajectoire). En vue d'une détection des ions, leur mouvement orbital doit devenir cohérent, ainsi les ions de même masse ont une trajectoire identique. Tout ceci est obtenu pas l'application d'un balayage en fréquence rapide. Ce balayage en fréquence couvre toutes les fréquences cyclotroniques des ions piégés pour une gamme de masse allant de 17 à 5000 u. Quand la fréquence appliquée est égale à la fréquence cyclotronique d'un ion donné, l'ion absorbe de

l'énergie. Son énergie cinétique E_c augmente par un processus de transfert d'énergie. Elle a pour expression :

$$\mathbf{E}_{c} = \frac{1}{2} \cdot \mathbf{m} \cdot \mathbf{V}^{2} = \mathbf{m} \cdot \boldsymbol{\omega}_{c}^{2} \cdot \mathbf{r}^{2}$$

Ainsi, il y a augmentation du rayon r de la trajectoire de l'ion. Après un temps très court d'interaction avec la fréquence responsable de ce phénomène, tous les ions d'une même masse sont en phase et ont la même trajectoire : leur mouvement est devenu cohérent et un signal peut alors être détecté. Ce phénomène de transfert d'énergie est appelé Résonance Cyclotronique des Ions (ICR). Il peut être utilisé pour accélérer les ions ou n'importe qu'elle particule chargée.

Détection du mouvement cyclotronique cohérent

Lors de l'excitation, les ions sont animés d'un mouvement circulaire cohérent. Ainsi leur trajectoire les amène au voisinage des plaques de détection. Si nous prenons le cas des ions positifs, en s'approchant de façon alternative de l'une des deux plaques, ils vont attirer les électrons, ce qui induit un courant alternatif ou courant image. Les deux plaques sont connectées à un circuit électrique qui permet la détection d'un courant alternatif sous une forme temporelle (figure II.3).

Dans la pratique, c'est un circuit RLC qui permet la détection du courant et sa conversion en tension alternative V(t) :

$$V(t) = \frac{N \cdot q \cdot r}{d \cdot C \cdot \cos(\omega_c t)}$$

- N: Nombre d'ions de masse m détectés.
- q : Charge des ions (C).
- r : Rayon de l'orbite circulaire des ions (m).
- d : Distance séparant les deux plaques de la capacité (0,05 m).
- C : Valeur de la capacité (12 μ F).
- ω_c : Vitesse angulaire des ions (rad/s).
- t : Temps de mesure (s).



Figure II.3 – Principe de détection des ions (en mode positif).

Une tension $V_m(t)$ est induite par chaque ion à la masse m. Il en résulte un signal composite, qui est la superposition de toutes les tensions images $V_m(t)$:

$$V(t) = \sum_{m} V_{m}(t) \cdot \cos(\omega_{c}t)$$

La tension V(t) subit alors un certain nombre de traitements mathématiques afin d'obtenir un spectre de masse. L'application mathématique la plus importante est l'application de l'algorithme Fast Fourier Transform (FFT).

Avant de réaliser la transformée de Fourier, nous pouvons employer divers artifices pour améliorer les spectres obtenus. Il s'agit de l'apodisation et du « remplissage » de la mémoire par des zéros (zero filling).

L'apodisation consiste à combiner le signal temporel obtenu à une fonction définie. Son but est la réduction des oscillations de la ligne de base du spectre à proximité des pics.

Le remplissage des zéros a une autre fonction qui permet d'obtenir plus d'informations à partir d'un interférogramme donné. En effet, la transformée de Fourier génère des fréquences positives et négatives. Le nombre de points du spectre réel dans le domaine des fréquences est donc la moitié du nombre de points détectés. En ajoutant en mémoire à la suite du signal détecté un certain nombre de fois autant de zéros qu'il y a de points de mesure, il y a une augmentation artificielle du nombre de points du spectre dans le domaine des fréquences. Ceci est important notamment pour la précision en masse et en intensité car plus un pic est constitué de points, meilleur sera la détermination de son maximum¹¹.

L'opération de transformée de Fourier permet de convertir le signal V(t) appartenant au domaine du temps en un signal appartenant au domaine des fréquences. Chaque fréquence est ensuite associée à une masse selon la relation $v_+ = \frac{a}{m} + \frac{b}{m^2}$ (a et b sont deux constantes déterminées par calibration et m correspond à la masse de l'ion). Le résultat obtenu est un spectre de masse qui porte en ordonnée l'intensité du signal et en abscisse le rapport masse/charge des ions détectés.

Ce type d'analyse est appelé mode direct ou large bande. Il permet une résolution en masse de 100 à 10000 environ.

Pour augmenter considérablement cette résolution, il faut utiliser le mode hétérodyne : l'analyse s'effectue alors sur une plage réduite de masses. Grâce à l'addition et à la soustraction d'un signal sinusoïdal de référence ayant une fréquence proche de celle de la plage de masse étudiée, et après un filtrage adéquat et une transformée de Fourier, nous obtenons des résolutions en masse allant de 10.000 à 1.000.000⁴.

1.3 Séquence expérimentale

La séquence conventionnelle d'une analyse FTICRMS est constituée de cinq événements principaux : l'ionisation, le délai d'ionisation, l'excitation, la détection et l'éjection finale de tous les ions (figure II.4).



Figure II.4 – Séquence expérimentale standard d'une analyse FTICRMS.

- L'ionisation laser : le temps d'ionisation est fixé par le temps de pulse du laser. Nous ne fixons dans cette séquence que le potentiel de piégeage. Il prendra cependant une valeur se situant entre +0,25 et +2,0 V, suivant la quantité d'ions positifs détectés au cours de toutes nos séquences.
- Le délai d'ionisation : il sert généralement lors des études des réactions ion-molécule. Il sera fixé à 0,001 s lors de nos analyses standard.
- Pour l'excitation, nous fixons dans cette séquence la vitesse de balayage (Hz/s) et les limites en masse. Le temps d'excitation est alors déduit des paramètres précédents. On peut en revanche modifier l'atténuation du signal en dB (5 dB dans notre cas). La gamme de masse a été définie de m/z = 30 à 2000 avec une vitesse de balayage de l'ordre de 1250 Hz/µs.
- La détection : en mode de détection positif, nous définissons la masse initiale de détection, le nombre de points d'acquisition et l'atténuation du signal. Nous débutons la détection généralement à m/z = 17 ce qui correspond à une fréquence d'acquisition de 5333Hz.
- L'éjection finale de tous les ions "Quench" : un fort potentiel est appliqué sur les plaques pour éjecter tous les ions de la cellule et effectuer une nouvelle analyse.

1.4 Performances et limites de la FTICRMS

Performances de la FTICRMS

Les performances de la microsonde laser FTICRMS sont nombreuses, mais en particulier :

- Elles possèdent une très haute résolution : en mode hétérodyne une résolution supérieure à 1.500.000 à la masse m/z = 1000 permet la séparation des ions isobariques¹².
- C'est une technique parfaitement adaptée pour étudier des réactions ion/molécule mais également à l'isolement d'un ion et à l'étude des ions fils produits par CID (Collision Induced Dissociation), procédé utile à la détermination structurale des ions.
- La possibilité d'analyser des échantillons massifs solides.

Limites de la FTICRMS

Certaines limites ou contraintes sont cependant inhérentes à l'emploi de la spectrométrie de masse FTICR :

 L'analyse en FTICRMS demande une maîtrise de nombreux paramètres ayant une influence certaine sur la formation et la détection des ions.

- La maintenance de l'aimant supraconducteur à 4K nécessite l'utilisation de fluides cryogéniques (hélium et azote liquide) onéreux.
- Les produits présentant une tension de vapeur trop faible se vaporisent dans l'enceinte d'échantillonnage qui est sous ultravide (10⁻⁶ Pa).

1.5 Désorption/Ionisation laser

L'ionisation est une étape primordiale en spectrométrie de masse. C'est elle qui détermine le nombre d'ions présents et leur répartition géométrique. Elle définit également leur distribution en énergie cinétique donc leur rayon de giration initial et leur répartition d'énergie interne c'est leur capacité à se fragmenter. Les phénomènes se produisant pendant l'ionisation dépendent de la technique utilisée, certains sont bien connus, d'autres restent très obscurs.

L'appareil FTICRMS dont nous disposons au sein de notre laboratoire, est couplé à une source d'ionisation laser. Cette méthode permet l'analyse d'échantillons solides massifs, mais aussi sous formes de dépôts.

La désorption/ionisation laser des molécules organiques possède de nombreux avantages :

- Choix d'échantillons très large (non volatils ou thermolabiles, isolants).
- Grande liberté de choix dans les paramètres expérimentaux en raison de la diversité des sources laser disponibles. Dans notre cas, il est possible d'utiliser trois lasers différents permettant d'obtenir des longueurs d'onde allant de 193 à 355 nm.
- Focalisation du faisceau laser sur une surface très petite (de l'ordre du μm) permettant d'effectuer des microanalyses.

1.5.1 Les lasers

Notre appareil est doté d'un système d'optique de Cassegrain inversée. Il permet la focalisation du laser sur la cible, l'éclairage et la visualisation de l'échantillon. Cette optique est située à l'intérieur de la chambre du spectromètre. La position des lentilles centrales est réglable de l'extérieur afin d'ajuster la focalisation du laser sur l'échantillon en fonction de la longueur d'onde utilisée (de 193 à 355 nm). La qualité du point de focale d'un laser dépend de la qualité de l'optique du spectromètre, mais aussi de plusieurs paramètres intrinsèques au laser utilisé. En effet le rayonnement laser est fonction de la géométrie de la cavité et de son

٤

mode rayonnement qui détermine sa longueur d'onde, sa directivité, sa brillance spectrale (ou irradiance), sa cohérence et sa divergence.

L'irradiance (Irr), qui est reliée à l'énergie du laser, est définie comme la puissance émise par unité de surface.

$$Irr(W/cm^2) = \frac{E}{S \cdot \tau}$$

- E : Energie photonique déposée sur la cible (J).
- S : Surface irradiée (cm²).
- τ : Durée de l'impulsion laser (s).

Nous mesurons l'énergie du laser à l'entrée du hublot de la chambre du spectromètre à l'aide d'une cellule photosensible connectée à un oscilloscope numérique Hewlett Packard (type 54600A Oscilloscope). Nous effectuons ensuite une mesure exacte de l'énergie déposée sur l'échantillon à l'aide d'un terme correctif provenant du facteur d'absorption des lentilles. Le diamètre des impacts est mesuré quant à lui sur des échantillons d'aluminium ou de polyéthyléne téréphtalate. Un télescope permet la variation du diamètre d'impact laser sur l'échantillon donc de l'irradiance. Nous pouvons ainsi calculer les valeurs d'irradiances pour chaque position possible des lentilles du télescope.

Dans le cadre de nos analyses en FTICRMS, nous avons utilisé un laser à colorant TDL 90 (Quantel, Les Ulis, France) utilisant la rhodamine (Exciton, Optilas, France) comme colorant organique. Le pompage est effectué par la seconde harmonique ($\lambda = 532$ nm) d'un laser Nd-YAG (Brillant B, Quantel, Les Ulis, France). Il émet une longueur d'onde de 710 nm qui, après utilisation de cristaux doubleurs (KDP), permet d'obtenir la longueur d'onde de 355 nm (contrôlé à l'aide d'un monochromateur), que nous utiliserons comme +19Xd'ionisation laser.

1.5.2 Désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI)

Hillemkamp et coll.^{13.a} sont les premiers à évoquer le concept de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) dans leur travaux en 1988^{13.b}. Ils décrivent une nouvelle technique qui permet le passage en phase gazeuse de molécules à détecter sous formes intactes en les incluant dans une matrice. Cette dernière, pour être efficace, doit répondre à certains critères :

- Elle doit favoriser la séparation des molécules cibles les unes des autres.
- Elle doit posséder une solubilité identique aux molécules cibles.
- Elle doit absorber à la longueur d'onde du laser d'ionisation.
- Elle doit permettre la formation de liaisons hydrogènes intermoléculaires favorisant les transferts d'énergie au sein de l'échantillon.
- Elle doit favoriser l'ionisation en induisant notamment des transferts de protons de la matrice vers la molécule cible.

En premier lieu, la technique MALDI a été couplée à un spectromètre de masse à temps de vol¹⁴. Dans un second temps, d'autres séparateurs ont été testés notamment les spectromètres de masse à transformée de Fourier à résonance cyclotronique des ions (FTICRMS)¹², mais aussi les pièges à ions¹⁵. Ces deux types de couplage ont permis d'obtenir des résolutions spectrales plus importantes, mais aussi d'effectuer des études en mode MS/MS¹⁶.

Nos études ont été réalisées au laboratoire avec un couplage MALDI/FTICRMS. Nous développerons plus en détail dans les paragraphes suivants la méthode de préparation des échantillons qui est adaptée au milieu utilisé.

1.5.2.1 Le Principe du MALDI

La technique MALDI fait intervenir la détection des échantillons dans un composé organique de faible poids moléculaire, celui-ci étant en excès par rapport aux molécules cibles (échantillon/matrice = 1/1000). Après évaporation du solvant, le dépôt solide cristallisé résultant est irradié par un laser à impulsions dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption de la matrice. Pour obtenir un résultat maximal, il est préférable que la molécule cible à analyser n'absorbe pas à cette longueur d'onde.

En MALDI, l'excès de matrice par rapport à la molécule cible fait que les photons du laser rencontrent statistiquement plus de molécules de matrice que de molécules cibles. La matrice va notamment servir à protéger les molécules cibles des photons incidents de l'impact laser. Lors de l'irradiation, il y a absorption sélective de l'énergie par la matrice. Cet apport d'énergie induit un processus de désorption correspondant à un changement de phase hors

équilibre thermodynamique (phase condensée vers phase gazeuse). Au cours du processus de désorption qui suit l'impact laser, une très faible partie de l'énergie absorbée par la matrice est transférée au x molécules cibles ; ce qui se traduit par une co-éjection d'espèces moléculaires (M) intactes et de fragments de la matrice (figure II.5).



Figure II.5 - Le principe du MALDI.

Le rendement d'ionisation est faible. Il a été estimé à 10^{-4} environ¹⁷. Les ions sont majoritairement produits par des processus de protonation $[M+H]^+$, de déprotonation $[M+H]^-$ et de cationisation $[M+K]^+$ et $[M+Na]^+$.

Les principaux atouts de la méthode MALDI :

- La désorption de molécules intactes en mode positif du type : [M+H]⁺, [M+Na]⁺ ou [M+K]⁺.
- La faible détection des fragments.
- La sensibilité élevée qui rend l'utilisation de cette technique compatible avec les exigences des biologistes : la quantité de produit à analyser sur le porte-échantillon est de l'ordre de la picomole sans purification exhaustive.
- Une détermination précise des masses moléculaires (0,1 à 0,01 %).
- La rapidité et la simplicité de mise en œuvre.

1.5.2.2 Les mécanismes du MALDI

Le phénomène MALDI est influencé par de nombreux paramètres. En effet, des études ont porté sur les effets de l'irradiance^{18, 19}, de la longueur d'onde¹⁹ et de la durée de l'impulsion laser²⁰ sur le rendement d'ions. Les auteurs ont constaté que de bons résultats étaient obtenus uniquement dans une gamme d'irradiances très étroites supérieures ou égales au seuil de formation des ions qui est typiquement de 10^6 à 10^7 W/cm² selon la longueur d'onde et l'échantillon analysé.

Le transfert de protons de la molécule de matrice vers la molécule cible demeure l'hypothèse la plus communément admise pour expliquer l'ionisation des molécules.

Soit une molécule de matrice mH (notation qui rend compte de la présence d'un atome d'hydrogène labile dans la molécule) et une molécule cible M, la molécule mH sous l'effet de l'impulsion laser absorbe les photons et se retrouve dans un état excité :

$$mH \xrightarrow{h\nu} mH^{\bullet}$$

Les molécules mH[•], ainsi excitées, possèdent un excès d'énergie qui est ensuite redistribué soit par fragmentation, soit par transfert d'énergie vibrationnelle aux molécules cibles et de matrices environnantes.

Il s'ensuit une transition de phase instantanée d'un petit volume de l'échantillon au cours de laquelle il y a co-éjection de molécules de matrices intactes ou fragmentées et de molécules cibles intactes sous forme gazeuse. Le gaz résultant de cette éjection de matière subit alors une expansion adiabatique dans le vide sous la forme d'un jet supersonique.

C'est dans ce gaz en expansion qu'est supposé intervenir l'ionisation des molécules cibles par réaction acide/base²¹.

 $mH^{\bullet} + M \xrightarrow{h\nu} m^{-} + (M + H)^{+}$

 $mH^{\bullet} + MH \xrightarrow{h\nu} m^{-} + (MH + H)^{+}$

Les molécules de matrices excitées agissent comme des acides, transférant leur(s) proton(s) aux molécules cibles ou à d'autres molécules de matrices.

Ainsi, nous allons mettre à profit cette méthode pour réaliser la détection de molécules de photosensibilisants sous forme intacte.

1.5.2.3 Les facteurs importants du MALDI

Les travaux publiés à ce jour ont fait ressortir l'importance de trois facteurs lors de l'utilisation du MALDI : les caractéristiques laser (comme nous l'avons vu précédemment), le choix de la matrice et le mode de préparation des échantillons.

La matrice

La matrice joue un rôle prépondérant dans le processus MALDI. Elle assure trois fonctions principales :

- Elle sert « d'agent dispersant » afin de minimiser les interactions intermoléculaires de l'analyte. La formation d'une solution solide homogène représente le cas idéal.
- Elle constitue un centre de transfert d'énergie entre le rayonnement laser et le composé analysé; elle protège ainsi les molécules du composé étudié d'une dégradation thermique ou photochimique durant l'irradiation laser.
- Elle favorise l'ionisation par protonation, déprotonation ou cationisation. Mais les mécanismes régissant les processus d'ionisation ne sont pas clairement établis.

Comme nous l'avons vu précédemment, les critères de choix d'une matrice sont multiples. En effet, cette dernière doit obéir à certaines conditions :

- La compatibilité physico-chimique. Afin d'obtenir une solution solide homogène, le composé étudié et la matrice doivent être solubles dans les mêmes solvants. Il faut que l'intégrité des molécules cibles soit préservée. Il ne faut pas que la matrice présente une réactivité vis-à-vis du composé à étudier.
- L'absorption photonique. La valeur optimale de cette grandeur est difficile à déterminer car elle dépend à la fois du coefficient d'absorption molaire ε et de la structure du film cristallisé de la matrice. En pratique, les matrices efficaces ont un $\varepsilon > 10^3$ L/cm/mol, ce qui limite le choix des matrices à des composés aromatiques possédant des substituants, qui ont des effets hypsochromes ou bathochromes sur les spectres d'absorption. Mais, il

faut garder à l'esprit qu'un fort coefficient d'absorption molaire n'implique pas forcément une matrice efficace.

- La volatilité. La matrice doit présenter une vitesse d'ablation relativement importante, afin de créer un jet supersonique permettant la co-désorption des molécules cibles. Elle doit être également stable à l'irradiation laser car des photoproduits trop nombreux pourraient rendre l'interprétation spectrale difficile.
- D'autres paramètres importants tels que la formation possible de liaisons hydrogène avec les molécules cibles - dues en particulier à la présence sur la matrice de groupements OH (ou NH) - et les propriétés physico-chimiques du réseau cristallin sont à prendre en considération. Dans le cas présent, compte tenu de la structure du photosensibilisant (fonction OH et délocalisation π), les deux types d'interactions sont envisageables.

En pratique, parmi de nombreux composés sélectionnés selon ces critères, seul un nombre très restreint donne des résultats. En outre, certaines matrices semblent être moins sensibles que d'autres en présence de contaminants, souvent rencontrés dans les échantillons biologiques (cations métalliques, détergents, ...). Il est donc nécessaire d'adapter la nature de la matrice à chaque type de famille de composés étudiés.

Préparations des échantillons

De manière générale, la préparation des échantillons en vue d'une analyse par la technique MALDI passe par deux étapes. La première consiste à préparer une solution contenant la matrice et les molécules cibles et la seconde est relative à la déposition de cette solution sur le porte échantillon MALDI.

Dans notre cas particulier, il nous a fallu adapter les deux étapes en fonction du milieu utilisé lors des analyses.

Durant l'étude du photosensibilisant en solution (organique, aqueuse et physiologique), nous avons mélangé de manière intime les molécules cibles et la matrice. Pour cela, nous avons utilisé 20 μ L d'une solution contenant la matrice à une concentration de 10⁻² M et 180 μ L d'une solution contenant le photosensibilisant à la concentration de 10⁻⁵ M. Le rapport échantillon/matrice était de 1/1000. 6 μ L de cette solution ont ensuite été déposés sur le porte échantillon métallique en titane utilisé pour les analyses MALDI. Après évaporation du solvant sous un flux d'air chaud, nous avons obtenu un film dû à la co-cristallisation des

molécules de matrice et des molécules cibles (figure II.5). L'échantillon est alors prêt pour l'analyse MALDI/FTIRCMS.

2 Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par piégeage des ions

Le dispositif expérimental (Varian, Les Ulis, France) utilisé est composé d'un four chromatographique (GC 3800) équipé d'un injecteur programmable en mode split/splitless (1079 universal capillary) suivi d'un spectromètre de masse à piégeage d'ions (SaturnTM 2000). Cet appareil a la particularité de posséder deux sources d'ionisation, une par impact électronique (EI) et une par ionisation chimique (CI).



2.1 Chromatographique en phase gazeuse

Figure II.6 – Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à piégeage d'ions.

En chromatographie en phase gazeuse, l'échantillon est vaporisé et injecté au sommet de la colonne. La séparation et le déplacement des échantillons sont assurés par un flux de gaz vecteur qui sert de phase mobile. Contrairement à la plupart des autres types de chromatographie, il n'y a pas d'interaction entre les molécules à analyser et la phase mobile ; sa seule fonction est de transporter les échantillons dans la colonne. Celle-ci est composée d'une phase stationnaire solide sur laquelle la rétention des échantillons résulte d'une adsorption physique. Ainsi la chromatographie en phase gazeuse permet la séparation de mélanges de composés par rapport à leur température de vaporisation.

La figure II.6 nous montre les trois zones qui conditionnent le transfert des espèces vers le détecteur, dont nous allons décrire les paramètres spécifiques qui leur sont associés.

L'injecteur (Varian 1079) peut être utilisé dans cinq modes différents : avec ou sans division du flux (Mode « split/splitless »), sans division avec un programme de température (« température ramped splitless »), injection direct (« on-column ») ou injection d'un grand volume (« large volume »). Le passage d'un mode à l'autre nécessite d'adapter les programmes de température, le débit de gaz vecteur et parfois le changement d'insert.

Dans notre cas particulier, nous avons opté pour le mode split isotherme, qui est utilisé pour l'analyse d'échantillons relativement concentrés et purs. En effet, par une division au niveau de l'injecteur, la saturation des détecteurs est évitée. Une partie des produits vaporisés est introduite directement dans la colonne alors que le reste est évacué vers une ligne de purge (figure II.7). La configuration dont nous disposons au laboratoire permet un contrôle des débits par une électrovanne ainsi nous disposons d'un flux d'hélium constant durant toute la durée de l'analyse. Ce flux d'hélium est égal à 1 mL/min.



Figure II.7 – Parcours du gaz vecteur en mode split.

Ce mode d'injection donne lieu à des temps de rétention très courts et des pics chromatographiques très fins. La largeur des pics est généralement inférieure à une seconde et il faut donc injecter les mélanges rapidement. L'introduction des espèces s'effectue manuellement, les variations de volume injecté entraînent de grande différences au niveau des intensités chromatographiques des pics (de l'ordre de 20 %).

Pour notre étude nous avons opté pour les paramètres suivant :

- Les solutions étaient relativement concentrées (10⁻³ mol/L).
- Pour minimiser les écarts de volumes injectés, nous avons utilisé des volumes de 0,5 μL.
- La température de l'injecteur est restée constante à 280 °C.

La colonne utilisée est une « DB5-MS J&W Scientific », non polaire de dimensions 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m. Les limites en température de cette colonne varient de – 60 °C à 325/350 °C. Sa phase est composée de (5 % - Phenyl) – methylpolysiloxan. Cette colonne présente l'avantage de posséder un faible « relargage » en limite de température (320 °C).

Pour l'étude des mélanges de m-THPC et de DPBF nous avons travaillé sur une plage de température allant de 60 °C à 280 °C. La première rampe de température a été définie de 60 °C à 120 °C avec une vitesse de 20 °C/min pour permettre de ne pas saturer le multiplicateur d'électrons lors de la détection du solvant. Nous avons ensuite effectué un palier de 120 °C pendant 10 minutes pour minimiser le bruit de fond et obtenir la meilleure répétabilité possible. La seconde rampe de température nécessaire à la vaporisation de nos composés, allait de 120 °C à 280 °C avec une vitesse de 10 °C/min. Le programme chromatographique se finissant par un palier de 15 minutes à la température finale nécessaire à la détection des espèces vaporisées (figure II.8).



Figure II.8 – Rampe de température.

La jonction colonne/spectromètre est assurée par une ligne de transfert dont la température est égale à 200 °C pour éviter la condensation des produits au niveau de la jonction et ainsi permettre un bon transfert des espèces vers le spectromètre de masse.

2.2 Le piège à ions quadripolaire

L'ionisation des molécules neutres provenant de la colonne chromatographique s'effectue par impact électronique (figure II.9). Un courant électrique de l'ordre de 10 à 20 μ A traverse un filament (rhénium) et les électrons, émis par effet Joule, sont accélérés et focalisés par un système de lentille à l'entrée du dispositif. L'électrode cylindrique située en dessous de l'électrode chapeau inférieure permet, par l'application d'un potentiel de + 150V à -150V, le passage des électrons. Le temps d'ionisation peut ainsi varier de 10 μ s à 25 ms. L'énergie cinétique (70 eV) acquise par les électrons au cours de l'accélération est alors suffisante pour permettre, par réaction ion/molécule, l'ionisation des espèces.



Figure II.9 – Représentation schématique du piège à ions.

Le piégeage des ions formés s'effectue par l'application d'une tension alternative de fréquence fixe (1,1 Mhz) sur l'électrode circulaire. On parlera par la suite de tension RF car les fréquences de cette tension alternative se situent dans le domaine des radiofréquences. Le confinement des ions est alors assuré par la présence d'un gaz tampon (hélium provenant de la colonne). Le potentiel appliqué sur les deux autres électrodes chapeaux est en général nul mais dans les phases d'éjection ou de séquences MS/MS, des tensions alternatives supplémentaires seront appliquées pour améliorer le signal (modulation axiale).

La détection des ions s'effectue au moyen d'une dynode de conversion. Le multiplicateur d'électrons convertit alors le courant ionique obtenu en courant électrique produisant un potentiel proportionnel à l'intensité du signal.

En ce qui concerne la pression résiduelle, un vide de l'ordre de 10⁻⁴ Pa est maintenu dans le piège et une température de 150 °C est appliquée pour éviter tous les phénomènes de recondensation.

2.3 Modes d'ionisation du piège à ions quadripolaire

2.3.1 Mode de fonctionnement en impact électronique

L'acquisition d'un spectre de masse par le piège ionique quadripolaire consiste en une fonction de balayage MS/EI qui repose sur deux principales étapes : (Figure II.10)



Figure II.10 - Séquence MS/EI.

L'étape d'ionisation : pendant un temps d'ionisation fixé entre 10 μ s et 25 ms, le potentiel de grille situé au-dessus de l'électrode chapeau supérieure est porté à une valeur de +180 V pour permettre le passage des électrons vers le piège à ions. Suite aux multiples collisions entre les électrons et les molécules de l'échantillon, les ions formés et les fragments caractéristiques de la molécule sont piégés dans la cellule. Pendant cette période, une tension de haute fréquence et d'amplitude 100-500 V est appliquée sur l'électrode circulaire.

L'étape de détection : cette étape consiste à appliquer une tension alternative RF (f=1,1 MHz) sur l'électrode circulaire. L'amplitude de cette tension varie progressivement pour permettre l'éjection successive des ions par instabilité axiale. Une forte tension négative est appliquée sur le multiplicateur d'électrons pour attirer les ions vers lui. Mais celui-ci n'en détecte qu'une partie. En effet, l'éjection des ions s'effectue en direction des deux électrodes

chapeaux (supérieure et inférieure). Une partie des ions est donc neutralisée par l'électrode chapeau supérieure.

Cette méthode d'éjection résonante a été proposée par l'équipe de Todd²² et développée sur le SATURN 2000 (Varian). Elle repose sur le principe d'éjection des ions en déplaçant successivement leur point de fonctionnement et provoquant ainsi leur instabilité suivant la direction axiale. Pour ce faire, il faut appliquer une tension alternative (f=1,1 MHz) sur l'électrode circulaire. A faible potentiel, les ions oscillent suivant une trajectoire stable dans la cavité du piège à ions. Mais dès que l'amplitude du potentiel augmente, le paramètre de stabilité de chaque ion augmente et les ions se déplacent successivement sur l'axe jusqu'à la limite de stabilité.

2.3.2 Mode de fonctionnement en ionisation chimique

L'ionisation chimique (CI) est une technique dite « douce » qui produit des ions ayant un minimum d'excès d'énergie et limite ainsi les phénomènes de fragmentations. Elle est complémentaire à l'ionisation par impact électronique (EI) et permet d'obtenir des informations sur la masse moléculaire des composés analysés.

Le produit réactif doit avoir une pression de vapeur supérieure à la pression interne du spectromètre. La pression du gaz est alors de 10 Pa, ce qui est nettement supérieur à la pression interne de l'appareil. Le libre parcours moyen d'une espèce dans ces conditions est en moyenne de 10^{-4} m contre 2 m dans des conditions normales. Afin de ne pas saturer le dispositif, il est important de régler avec précision le débit de gaz introduit. Au cours de cette étude, nous avons utilisé de l'acétonitrile (CH₃CN).

Le gaz est ionisé par un flux d'électrons ce qui produit un nuage d'ions et ce sont ces ions qui vont ioniser les espèces neutres introduites selon quatre réactions :

Transfert de protons : cette réaction est possible si l'affinité protonique (AP) de la molécule d'analyte (M) est supérieure à celle du gaz réactif (R).

$$R \xrightarrow{e^{+}} R^{+} + 2e^{-}$$

$$R^{+} + R \longrightarrow RH^{+} + [R - H]^{+}$$

$$(RH)^{+} M \longrightarrow MH^{+} + R$$
Si AP(M) > AP(R)

Addition d'un fragment : lorsque l'affinité protonique de l'ion réactif est supérieure à celle de la molécule AP(F+)>AP(M).

 $F^{+} + M \longrightarrow [F + M]^{+}$ Avec F = fragment du gaz réactif, R^{•+} $\longrightarrow F^{+} + N^{\bullet}$.

 Transfert de charge : l'ionisation par impact électronique du gaz réactif induit la formation d'ion radicalaire R^{•+} pouvant réagir avec la molécule M.

$$R^{\bullet+} + M \longrightarrow M^{\bullet+} + R$$

Cette réaction exothermique ne peut avoir lieu que si l'énergie de recombinaison (ER) de l'ion réactif $R^{\bullet+}$ est supérieure à l'énergie d'ionisation de la molécule M. De plus, l'énergie de recombinaison est définie comme étant l'inverse de la variation de l'enthalpie de la réaction en phase gazeuse : $ER(R^{\bullet+}) = -\Delta H_f^{\circ}$.

 Abstraction d'hydrure : c'est une réaction ayant lieu lors de la réaction des molécules ayant de faibles affinités protoniques tel que les alcanes.

 $F^+ + M \longrightarrow [M - H]^+ + FH$

F⁺ est l'ion fragment décrit précédemment.

Ainsi, cette technique d'ionisation entraîne la perte d'un hydrogène et ainsi la formation favorable des ions [M-H]⁺, caractéristiques des molécules analysées, sans qu'il y ait de fragmentation.

La nature du gaz réactif utilisé est le premièr paramètre, sans doute le plus important. Nous avions plusieurs possibilités de choix de gaz et nous avons opté pour l'acétonitrile²³. C'est un produit couramment utilisé et qui ne forme pas d'ions primaires de masse supérieure à m/z = 54. En effet, les ions primaires formés, dans les conditions standard, sont aux masses m/z = 39, 40 ,41. Lors de l'utilisation de ce mode d'ionisation, il y a formation d'ions protonés (m/z = 40, 41, 42 respectivement [CH₂CN]⁺, [CH₃CN]⁺ et [CH₃CN+H]⁺) et d'ions par addition de fragment (m/z = 54 [CH₂CN₂]⁺) (figure II.11).

L'affinité protonique de l'acétonitrile est de 779,2 kJ/mol, ainsi l'utilisation de ce réactif comme gaz CI permet l'obtention de molécules ionisées par échange de protons [M+H]⁺.



Figure II.11 - Spectre de masse de l'acétonitrile en Mode CI (gaz ionisant acétonitrile).

Bien que les paramètres définissant la séquence d'ionisation de l'acétonitrile ne soient pas contenus dans la bibliothèque du logiciel (Saturn 5.2), la consultation de documents du constructeur d'un logiciel plus récent nous ont permis de trouver ces données.



Figure II.12 – Paramètres de l'ionisation chimique.

La masse minimale des ions piégés lors de la détection a été fixée à m/z = 60 pour augmenter la gamme de masses détectables et éliminer le signal de l'ion m/z = 54 relatif à l'ion $CH_2CN_2^+$.

L'amplitude d'éjection intervient lors de l'éjection des ions indésirables formés lors de la période d'ionisation par impact électronique. Ainsi, tous les ions de rapport masse sur charge (m/z) égal ou supérieur au niveau du potentiel correspondant fixé entre 0 et 65 V seront éjectés avant la séquence de réaction. Nous évitons ainsi, en diminuant le nombre d'ions présent de faible masse, d'obtenir un bruit de fond trop intense au niveau du chromatogramme

et de perdre la sensibilité de détection (une valeur nulle supprime l'éjection au risque de saturer le détecteur).

3 Spectrophotométrie d'absorption et de fluorescence

3.1 Spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible

La spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible est surtout employée pour l'analyse qualitative et quantitative de composés organiques et inorganiques. Cette technique, qui repose sur l'absorption de la lumière, permet de détecter les groupement chromophores dans l'ultraviolet et le visible. Il est possible de présumer de la nature des groupements absorbants en comparant le spectre de l'analyte à ceux des molécules plus simples qui contiennent différents groupements chromophores. Les spectres ne présentent cependant pas de structure suffisamment fine pour permettre l'identification certaine d'un analyte. Dés lors, les indications qualitatives fournies par le spectrophotomètre doivent être complétées par d'autres données physiques ou chimiques comme la spectrométrie de masse par exemple.

Le spectrophotomètre ultraviolet/visible utilisé lors de nos analyses est un modèle Lambda 14 (Perkin Elmer). La gamme de longueur d'onde s'étend de l'ultraviolet à 190 nm au proche infrarouge à 1100 nm. Le dispositif est équipé d'un système à double faisceau (figure II.13). Deux sources lumineuses sont disponibles. La première est une lampe au deutérium qui permet de générer un faisceau ultraviolet entre 190 et 350 nm. La seconde est une lampe halogène qui balaye l'intervalle de longueur d'onde 350 - 1100 nm. Le monochromateur, qui est constitué par un réseau de diffraction (1053 lignes/mm), permet la sélection des différentes longueurs d'onde provenant des sources lumineuses. Le rayonnement sélectionné grâce à ce réseau est ensuite réfléchi par un miroir concave, qui le dirige vers un miroir semi-transparent. Celui-ci permet la séparation du faisceau en deux faisceaux de même intensité, deux miroirs permettent de diriger l'un vers l'échantillon et l'autre vers la référence. Après avoir traversé la cellule de référence et celle de l'échantillon, les deux faisceaux sont focalisés à l'aide de lentilles sur des photodiodes qui mesurent ainsi leur intensité lumineuse (figure II.13).

Un ordinateur de type PC permet outre le pilotage de l'appareil de mesure, la lecture en ligne du spectre d'absorption et le traitement informatique des données.



Figure II.13 - Système à double faisceau.

Les paramètres de mesure du spectrophotomètre sont résumés dans le tableau II.1.

Paramètres	
Vitesse de balayage	240 nm/min.
Largeur de fente	2 nm
Largeur de bande de « lissage »	4 nm
Intervalle de longueur d'onde	190 - 1100 nm

Tableau II.1 - Paramètres de mesure du spectrophotomètre ultraviolet/visible.

Les solutions étudiées possèdent une concentration de 10⁻⁵ M et sont placées dans des cuves en quartz Suprasil ayant un volume de 3,4 mL. Les cuves sont fermées à l'aide de bouchons en Teflon, permettant une évaporation quasi nulle du solvant. De plus, elles ont la particularité de pouvoir être mises sous agitation magnétique. La largeur des cuves est de 1 cm.

3.2 Spectrophotométrie de fluorescence

La spectrophotométrie de fluorescence consiste à mesurer le spectre d'émission d'un composé suite à son excitation par une longueur d'onde correspondant à une bande d'absorption.

Les analyses en spectrophotométrie de fluorescence ont été effectuées au Centre Alexis Vautrin (Nancy). L'appareil utilisé est un spectrofluorimètre LS50B (Perkin Elmer), il est équipé d'une lampe xénon comme source d'excitation. Les spectres sont balayés entre 600 et 750 nm. L'analyse des spectres est réalisée à l'aide d'un logiciel FL data Manager.

Paramètres	
Longueur d'onde d'excitation	415 nm
Largeur de fente d'excitation	2,5 nm
Largeur de fente d'émission	2,5 nm
Intervalle de longueur d'onde détection	600 – 750 nm

Le tableau II.2 contient les paramètres de l'appareil utilisés lors des mesures de fluorescence.

Tableau II.2 - Conditions expérimentales lors des analyses par fluorescence.

Les solutions de photosensibilisants (10^{-5} M) étudiées sont excitées à la longueur d'onde de 415 nm, qui correspond au maximum d'absorption (Bande de Soret). Les spectres de fluorescence sont mesurés sur l'intervalle 600 – 750 nm, caractéristique des bandes d'émission des photosensibilisants analysés. Les mesures sont effectuées à l'aide de cuves en quartz avec une largeur de 1 cm.

4 Traitement photochimique

L'objectif principal de notre travail est la compréhension des mécanismes se produisant durant la thérapie photodynamique. Pour atteindre ce but, il nous faut caractériser les photosensibilisants et leurs photoproduits en milieu cellulaire. C'est pourquoi nous avons mis au point un protocole expérimental qui nous permet de suivre par différentes techniques d'analyses le comportement du photosensibilisant durant son illumination laser.

Nous avons tout d'abord étudié le comportement des photosensibilisants en solution dans différents solvants en se rapprochant progressivement du milieu biologique pour ainsi évaluer à chaque étape l'influence de l'environnement de solvatation. Nous avons finalement abouti à l'étude du comportement de la m-THPC en présence de plaquettes sanguines.

Avant de décrire en détail le protocole d'illumination laser, nous allons insister sur la préparation des solutions de photosensibilisant qui reste une étape importante de notre étude.

4.1 Préparation des échantillons

4.1.1 Présentation des composés étudiés

Les photosensibilisants qui font l'objet de nos travaux sont :

- La 5,10,15,20-méso(tétrahydroxyphenyl) porphyrine (m-THPP), qui possède un poids moléculaire de 678 g/mol.
- La 5,10,15,20-méso(tétrahydroxyphenyl) chlorine (m-THPC), qui possède un poids moléculaire de 680 g/mol.
- La 5,10,15,20-méso(tétrahydroxyphenyl) bactériochlorine (m-THPBC), qui possède un poids moléculaire de 682 g/mol.

Ces trois composés nous ont été gracieusement fournis par la société Scotia Pharmaceuticals, (Stirling, U.K.) responsable de leur développement.

4.1.2 Mise en solution des échantillons

Les photosensibilisants que nous utilisons ont la particularité d'être insolubles dans l'eau. C'est pourquoi, nous devons préparer une solution stock dans laquelle nous solubilisons les composés en milieu éthanolique. Cette solution possède une concentration de 10^{-3} mol/L, ce qui nous permet d'obtenir une concentration de 10^{-5} mol/L pour les solutions finales.

Avant de passer à des études en milieu biologique, nous nous sommes orientés vers différents types de solutions afin d'évaluer le comportement des photosensibilisants dans chacune d'elles. Nous avons suivi un progression logique en passant du milieu organique au milieu aqueux, avant de finir par le milieu physiologique.

4.1.2.1 Milieu organique

Le solvant, que nous utilisons ici, est l'éthanol absolu (Prolabo SA, Fontenay-Sous-Bois, France). Celui-ci a été distillé deux fois, de manière à s'affranchir de la présence éventuelle d'impuretés. La préparation de la solution s'effectue en diluant cent fois la solution stock de photosensibilisant. Toute l'opération s'effectue à l'abri de la lumière afin d'éviter une photodégradation du produit étudié. Il est à noter que des études préliminaires ont été

conduites sur les photosensibilisants en solution dans le méthanol. Nous avons abandonné ce solvant pour conserver une certaine homogénéité avec les autres travaux.

4.1.2.2 Milieu aqueux

Pour travailler en milieu aqueux, nous avons dilué la solution stock avec de l'eau bidistillée. La majorité de nos analyses a été effectuée sur un mélange éthanol/eau (1/99) (v/v). Nous reviendrons plus tard sur le choix de ce gradient et sur sa détermination (cf. CH.IV & 2).

4.1.2.3 Milieu physiologique

Nous avons utilisé un tampon aqueux, le Phosphate Buffer Saline (PBS), pour se mettre dans des conditions physiologiques. Le gradient utilisé est le même que celui du milieu aqueux à savoir éthanol/PBS (1/99) (v/v). Le PBS (Life Technologies, Gibco BRL, Paisley, Scotland) est composé de plusieurs sels (KCl, KH₂PO₄, NaCl, Na₂HPO₄ - 7 H₂0) en solution dans l'eau, pour un pH de 7,4²⁴. Le PBS étant conservé à 4°C, il faut le laisser remonter en température avant son utilisation.

Nous avons aussi mis les photosensibilisants en présence de protéines par l'enrichissement du milieu PBS avec 0 à 2 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Dominique Dutscher SA, Brumath, France). Le SVF est conservé par congélation, donc il faut attendre qu'il soit à température ambiante avant de l'ajouter à la solution de photosensibilisants.

Avec ou sans protéines lorsque le photosensibilisant est mis en solution dans le PBS, il faut attendre une trentaine de minutes afin que la solvatation soit optimum.

Il est à noter que lorsque nous travaillons dans ces conditions, nous devons prendre des précautions afin d'éviter un contact prolongé à l'air du PBS et du SVF, laquelle entraînerait une dégradation de ces deux produits.

4.1.2.4 Milieu biologique

Nous avons orienté notre choix d'étude sur les plaquettes sanguines. Ce choix a été dicté par le fait que ces cellules ne possèdent pas de noyau tout en gardant toutes les caractéristiques et les mêmes métabolites propres aux autres cellules. Ceci n'enlève rien à l'intérêt de ces travaux car les études actuelles sur la m-THPC indiquent qu'elle n'a pratiquement aucune action au niveau du noyau cellulaire, mais serait plutôt présente au niveau d'organites cellulaires localisés dans le cytoplasme tels que les mitochondries ou les lysosomes²⁵.

Le détail sur la préparation des solutions contenant le photosensibilisant et les plaquettes sanguines sera abordé dans le chapitre V.

4.2 Protocole d'illumination laser

Le traitement laser (figure II.14) des solutions de photosensibilisants est effectué à l'aide d'une cuve en quartz (volume = 3,4 mL, trajet optique = 1 cm). Cette cuve possède un système d'agitation magnétique, qui permet un mouvement constant de la solution durant l'illumination laser.



Figure II.14 - Montage expérimental.

La source de lumière utilisée est un laser à colorant, le TDL 50 (Quantel, Les Ulis, France), dont le pompage est effectué par la seconde harmonique d'un laser Nd-YAG ($\lambda = 532$ nm, durée d'impulsion = 12 ns, énergie de sortie = 400 mJ). Ce laser fonctionne avec un colorant organique, le DCM, pour obtenir la longueur d'onde de 650 nm ou le LDS 750 pour obtenir 735 nm (Exciton, Optilas, France). Les solutions de photosensibilisants ont été irradiées avec une puissance laser de 300 mW (30 mJ), une fréquence de 10 Hz pour une irradiance de 10^7 W/cm². Avec ces paramètres, chaque période d'illumination correspondait à une durée de 60 minutes. Mais comme nous avons utilisé un laser pulsé, le temps effectif de l'illumination n'est que de 0,4 ms (calculé par la formule suivante $t_{eff} = t_{ill*}f.t_p$; $t_{ill} = 60x60 = 3600$ s; f = 10 Hz; $t_p = 12$ ns). La longueur d'onde utilisée durant l'illumination laser correspondait à une forte absorption du photosensibilisant étudié (dans le cas de la m-THPC $\lambda = 650$ nm). Il est à noter que tous les paramètres du laser ont fait l'objet d'un contrôle systématique. En effet, avant chaque irradiation laser, nous mesurions la puissance laser à l'aide d'une cellule de mesure d'énergie et la longueur d'onde à l'aide d'un monochromateur.

Le suivi de la réaction de photodégradation a été effectué par des mesures en spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et/ou de fluorescence. En effet, nous effectuons un contrôle de l'évolution du spectre d'absorption des solutions de photosensibilisants à chacune des étapes de l'illumination laser. Parallèlement, nous avons effectué des prélèvements afin de caractériser les différentes espèces présentes à chacune des étapes par MALDI/FTICRMS.

5 Caractérisation de la formation d'oxygène singulet en solution

Les réactions faisant intervenir l'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$ sont d'un grand intérêt de par leur importance dans de nombreux systèmes chimiques et biologiques de photooxydation incluant la thérapie photodynamique (PDT). Cette dernière est basée sur la photoexcitation d'un agent photosensible en présence d'oxygène. L'énergie ainsi absorbée par le photosensibilisant est transférée à l'oxygène, conduisant à la production d'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$ qui peut à son tour réagir avec d'autre composés organiques pour donner les produits d'oxydation. Afin d'amener de nouvelles informations sur les mécanismes complexes relatifs à l'activité photodynamique de la m-THPC, nous avons tenté de caractériser la formation de l' ${}^{1}O_{2}$ en solution qui joue un rôle important dans la phototransformation de ce composé.

Notre étude a porté sur des solutions dans l'éthanol contenant de la m-THPC et une sonde spécifique de l'oxygène moléculaire singulet, le diphénylisobenzofurane (DPBF) (Aldrich, France). Ce composé a la particularité de se transformer en orthodibenzoylbenzène (o-BB)

(Interchim, France) en présence d' ${}^{1}O_{2}$ suite à suite à une réaction photochimique. En effet, le DPBF (270 g/mol) produit par réaction avec l'oxygène moléculaire singulet (figure II.15) via une cycloaddition [4+2] un endoperoxyde intermédiaire peu stable, qui se transforme rapidement en o-BB (286 g/ml)²⁶.



Figure II.15 – Photooxydation du DBPF.

Cette réaction peut être utilisée comme test afin de confirmer la présence de $1'^{1}O_{2}$ durant la phototransformation de la m-THPC, en caractérisant l'apparition de l'o-BB par spectrométrie de masse.

Un mélange m-THPC (10⁻⁵ mol/L) / DPBF (10⁻³ mol/L) en solution dans l'éthanol dans les mêmes conditions que décrites auparavant a donc subi une irradiation laser à 650 nm.

La caractérisation des différentes étapes de ce protocole ont été menées par deux techniques de spectrométrie de masse :

- Le MALDI/FTICRMS.
- La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse par piégeage des ions (GC/ITMS).

6 Références

- 1. Comisarow MB, Marshall AG, Chem. Phys. Lett. , 25, 282, 1974.
- 2. Van Vaeck L, Struyf H, Van Roy W, Adams F, Mass Spectrom. Rev., 13, 189, 1994.
- 3. Van Vaeck L, Struyf H, Van Roy W, Adams F, Mass Spectrom. Rev., 13, 209, 1994.
- 4. Marshall AG, Verdun FR, Fourier transforms in NMR, optical, and mass spectrometry, Elsevier Scientific, Amsterdam, 1990.
- 5. Marshall AG, Grosshans PB, Anal. Chem., 63, 215A, 1991.
- 6. Guan S, Marshall AG, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 146/147, 261, 1995.
- Dienes T, Pastor SJ, Schürch S, Scott JR, Yao J, Cui S, Wilkins CL, Mass Spectrom. Rev., 15, 163, 1996.
- 8. Comisarow MB, Marshall AG, J. Mass Spectrom., 31, 581, 1996.
- 9. Muller JF, Tolitte F, Krier G, Pelletier M, Brevet Français n°8809438, 1989.
- 10. Pelletier M, Krier G, Muller JF, Weil D, Johnston M, Rapid Commun. Mass Spectrom. , 2, 146, 1988.
- 11. Comisarow MB, Melka JD, Anal. Chem. , 51, 2198, 1979.
- 12. Castro JA, Koster C, Wilkins C, Rapid Commun. Mass Spectrom. , 6, 239, 1992.
- 13. a. Hillemkamp F, Karas M, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 200, 71, 2000.
 b. Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillemkamp F, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 8 A, 935, 1988.
- 14. Chambers DM, Goeringer DE, McLuckey SA, Glish GL, Anal. Chem. , 65, 14, 1993.
- 15. Bolbach G, Riahi K, Spiro M, Brunot A, Breton F, Blais JC, Analusis, 21, 383, 1993.
- Blais JC, Bolbach G, Riahi K, Spiro M, Brunot A, Breton F, J. Chim. Phys. , 90, 1399, 1993.
- 17. Mowry CD, Johnston MV, , Rapid Commun. Mass Spectrom. , 7, 569, 1993.
- 18. Ens W, Mao Y, Mayer F, Standing K, Rapid Commun. Mass Spectrom. , 5, 117, 1991.
- 19. Overberg A, Karas M, Bahr U, Kaufmann R, Hillenkamp F, Rapid Commun. Mass Spectrom., 4, 293, 1990.
- 20. Demirev P, Westmann A, Reimann CT, Hakansson P, Barofsky D, Sundqvist BUR, Cheng YD, Seibt W, Siegbahn K, Rapid Commun. Mass Spectrom., 6, 187, 1992.
- Jonsson GP, Hedin AB, Hakansson PL, Sundqvist BUR, Save BG, Nielsen PF, Roepstroff P, Kamensky I, Lindberg MSL, Anal. Chem., 58, 1084, 1986.

- 22. Strafford GC, Kelley PE, Syka JEP, Reynolds WE, Todd JFJ, Tradli P, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 60, 85, 1984.
- 23. Monetti G, Rapid Commun. Mass Spectrom., 10, 167, 1996.
- 24. Dulbecco R, Vogt M, J. Exp. Med., 98, 167, 1954.
- 25. Ma LW, Moan J, Berg K, Lasers Med. Sci., 9, 127, 1994.
- 26. Wasserman HH, Scheller JR, Cooper JL, J. Am. Chem. Soc., 94, 173, 1972.

CHAPITRE III

COMPORTEMENT DES PHOTOSENSIBILISANTS EN SOLUTION DANS L'ETHANOL

CHAPITRE III

COMPORTEMENT DES PHOTOSENSIBILISANTS EN SOLUTION DANS L'ETHANOL

Les techniques d'analyse employées pour étudier les photosensibilisants et leurs photoproduits sont généralement la spectrophotométrie d'absorption et/ou de fluorescence. Celles-ci permettent d'avoir un suivi de l'évolution spectrale des solutions étudiées et d'émettre des hypothèses sur la formation d'éventuels photoproduits. Ces hypothèses sont basées sur la décroissance et le changement d'aspect des bandes caractéristiques du photosensibilisant suite à une exposition à la lumière, mais aussi sur l'apparition de nouvelles bandes d'absorption et/ou de fluorescence. Mais ces techniques ne conduisent pas à une identification sans équivoque des espèces qui rentrent en jeu dans les réactions photochimiques mises en œuvre. C'est Jones¹ qui en premier a proposé une étude visant à identifier la nature des espèces formées suite à une photooxydation en utilisant la technique de l'HPLC couplée à la spectrométrie de masse avec une ionisation par électrospray (HPLC/ESI/MS).

C'est pourquoi la technique du MALDI/FTICRMS, avec en parallèle des analyses spectrophotométriques, semble une méthode d'analyse de choix pour la détection et pour la caractérisation des photosensibilisants et de leurs photoproduits suite à une illumination laser. Dans cette partie, nous allons aborder le comportement des photosensibilisants (m-THPC et m-THPBC) en milieu organique, plus précisément en solution dans l'éthanol.

Dans un premier temps, les empreintes spectrales de chaque agent thérapeutique (m-THPP, m-THPC et m-THPBC) seront examinées et serviront de référence pour la suite de ce travail.

Dans un second temps, nous montrerons que le MALDI/FTICRMS apporte des informations plus fournies et plus précises sur la nature des espèces présentes en solution. Ces informations seront utiles à la compréhension du comportement des photosensibilisants suite à leur traitement photochimique.

1 Analyse par MALDI/FTICRMS des photosensibilisants en solution dans l'éthanol

1.1 Choix de la matrice

Le choix de la matrice est un paramètre important lors des analyses par MALDI/FTICRMS. Ainsi, la partie préliminaire de nos travaux a consisté à déterminer la meilleure matrice à utiliser pour caractériser les photosensibilisants. Dans ce but, nous avons testé plusieurs matrices (l'acide 3,5-dihydroxybenzoïque, la 3-nitroaniline, l'acide 4-hydroxy-3-methoxy cinnamique) mais aussi trois longueurs d'onde d'ionisation 193, 266 et 355 nm, dans les mêmes conditions expérimentales. Des différents résultats obtenus (figure III.1 et III.2), nous avons porté notre choix sur l'utilisation de l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB) en tant que matrice avec comme longueur d'onde d'ionisation 355 nm. En effet, les résultats obtenus dans ces conditions (figure III.2b), dont les spectres de masse montrent les signaux caractéristiques des photosensibilisants, présentent :

- Une bonne détection : les spectres MALDI/FTICRMS montrent des pics de masse avec des intensités importantes et un bon rapport signal/bruit pour l'analyse de solution à 10⁻⁵ mol/L de photosensibilisants.
- Une grande résolution : nous pouvons observer sur les spectres de masse obtenus le pic caractéristique de l'espèce détectée ainsi que sa distribution isotopique.
- Une bonne reproductibilité : l'analyse à divers endroits sur le dépôt procure des résultats identiques, ce qui est dû à une bonne homogénéité du dépôt MALDI.



Figure III.1 – Spectre MALDI/FTICRMS (λ = 355 nm; Iπ. = 10⁷ W/cm²) de la m-THPC en solution dans l'éthanol (10⁻⁵ mol/L) utilisant comme matrice (a) l'acide 3,5-dihydrobenzoïque, (b) l'acide 4-hydroxy-3methoxy cinnamique et (c) la 3-nitroaniline.

Ici, il convient de remarquer que la résolution n'a pas été optimisée, seules les intensités des pics de masse sont significatives car elles sont obtenues dans les mêmes conditions d'analyses (figure III.1).

Ceci pouvant s'expliquer par le fait que la 2,5 DHB est soluble en milieu organique et aqueux et possède une bande d'absorption (figure III.2a) proche de la longueur d'onde d'ionisation que nous utilisons en analyse MALDI/FTICRMS (355 nm). De plus, la 2,5 DHB est une matrice classique très utilisée en MALDI^{2, 3} et qui s'avère très efficace dans la caractérisation de composés organiques et de protéines de hautes masses⁴.



Figure III.2 – (a) Spectre d'absorption UV/Visible de la 2,5-DHB en solution dans l'éthanol (10⁻⁵ mol/L);
(b) Spectre MALDI/FTICRMS (λ = 355 nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) de la m-THPC en solution dans l'éthanol (10⁻⁵ mol/L) utilisant comme matrice la 2,5 DHB.

Il est vraisemblable que les résultats auraient été améliorés à 337 nm. Mais ceci nécessite un laser à azote, non disponible actuellement au sein de notre laboratoire.

1.2 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) porphyrine (m-THPP)

La m-THPP, dont la formule brute est $C_{44}H_{30}N_4O_4$, possède quatre liaisons C=C en position $\beta\beta'$ (cf. Ch.I § 3.1) sur le noyau pyrrolique (figure III.3). La porphyrine se présente sous forme de cristaux violets (Scotia Pharmaceuticals, Stirling, U.K.). Sa masse molaire est de 678 g/mol.

Nous constatons sur le spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPP en solution dans l'éthanol (1,04 10⁻⁵ mol/L), la présence des cinq bandes caractéristiques : la bande de Soret et les quatre Q-bandes (figure III.4a) dont les valeurs caractéristiques sont résumées dans le
tableau III.1. Le spectre de fluorescence de la m-THPP montre une bande à 649 nm, la longueur d'onde d'excitation étant 415 nm.



Figure III.3 – Structure chimique de la m-THPP.

Bandes d'absorption Bande de Soret		Longueurs d'onde 417 nm	ε (L/mol.cm) 175 952
	III	546 nm	5 654
	п	588 nm	4 471
	I	646 nm	2 904

Tableau III.1 – Caractéristiques spectrales de la m-THPP en solution dans l'éthanol (1,04 10⁻⁵ mol/L).

Les coefficients d'absorption molaire ε sont calculés à l'aide de la loi de Beer-Lambert :

$$\varepsilon \left(\mathbf{L} / \mathbf{cm} \cdot \mathbf{mol} \right) = \frac{\mathbf{Abs}}{\mathbf{l} \cdot \mathbf{c}}$$

Où, Abs correspond à la valeur de l'absorption à la longueur d'onde donnée, l au trajet optique (1 cm) et c à la concentration du photosensibilisant (mol/L).



Figure III.4 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible et (b) spectre (i) d'absorption et (ii) de fluorescence de la m-THPP en solution dans l'éthanol (1,04 10⁻⁵ mol/L).

La figure III.5 correspond au spectre MALDI/FTICRMS (355 nm, 10^7 W/cm^2) de cette même solution. Nous pouvons y observer le pic significatif [m-THPP+H]⁺ (m/z = 679). Nous notons aussi la présence des pics satellites aux masses m/z = 680, 681 et 682 dus aux contributions isotopiques en ¹³C, identifiées grâce à une simulation permettant le calcul des masses théoriques de chacun des pics.



Figure III.5 – Spectre MALDI/FTICRMS de la m-THPP en solution dans l'éthanol (1,04 10⁻⁵ mol/L).

1.3 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine⁵ (m-THPC)

La m-THPC qui est le photosensibilisant d'intérêt pour nos études, se présente sous forme d'une poudre très fine et violette (Scotia Pharmaceuticals, Stirling, U.K.). Par rapport à la molécule de la m-THPP, la molécule de la m-THPC ne possède plus que trois liaisons C=C en position $\beta\beta$ ' (cf. Ch.I § 3.1) sur le noyau pyrrolique (figure III.6).



Figure III.6 – Structure chimique de la m-THPC.

Elle présente les caractéristiques chimiques suivantes : formule brute : $C_{44}H_{32}N_4O_4$; masse molaire : 680 g/mol ; une forte absorption dans la région spectrale du rouge à 650 nm (tableau III.2) et un maximum de la bande de Soret se situant à 417 nm (figure III.7a). Nous y observons non seulement un épaulement de la bande de Soret à 406 nm mais aussi les autres Q-bandes à 517 nm, 542 nm et 597 nm. C'est la capacité à absorber dans le rouge qui confère un rôle important à la m-THPC dans le développement de la PDT. En effet, cette forte absorbance dans la région du rouge coïncide avec l'absorption des tissus, ce qui constitue un atout majeur pour le traitement par PDT⁶.

De plus, l'excitation de la m-THPC à 415 nm en spectrophotométrie de fluorescence procure une émission à 653 nm caractéristique du photosensibilisant (figure III.7b).



Figure III.7 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible et (b) spectre (i) d'absorption et (ii) de fluorescence de la m-THPC en solution dans l'éthanol (1,02 10⁻⁵ mol/L).

Bandes d'absorption Bande de Soret		Longueurs d'onde 417 nm	ε (L/mol.cm) 194 495
	Ш	542 nm	8 981
	II	597 nm	4 010
	I	650 nm	40 990

Tableau III.2 – Caractéristiques spectrales de la m-THPC en solution dans l'éthanol (1,05 10⁻⁵ mol/L).

Sous nos conditions expérimentales (355 nm, 10^7 W/cm²), le spectre de masse relatif à la m-THPC montre un pic prédominant à m/z = 681 qui correspond à l'ion [m-THPC+H]⁺, nous observons aussi le pic moléculaire [m-THPC]^{•+} avec une faible intensité à la masse m/z = 680

(figure III.8). Il est à noter la présence des signaux dus aux contributions en ${}^{13}C$ aux masses m/z = 682, 683 et 684.



Figure III.8 – Spectre MALDI/FTICRMS de la m-THPC en solution dans l'éthanol (1,02 10⁻⁵ mol/L).

1.4 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine

La molécule de m-THPBC possède deux liaisons C=C et deux liaisons C-C en position $\beta\beta$ ' (cf. Ch.I § 3.1) sur le noyau pyrrolique (figure III.9). La masse molaire de la m-THPBC est de 682 g/mol et sa formule brute C₄₄H₃₄N₄O₄ (Scotia Pharmaceuticals, Stirling, U.K.).



Figure III.9 – Structure chimique de la m-THPBC.

Cette nouvelle configuration structurale de la molécule de m-THPBC entraîne des changements sur son spectre d'absorption ultraviolet/visible (figure III.10a). Les deux principaux sont le déplacement vers les courtes longueurs d'onde (« blue-shift ») de la bande

de Soret et l'apparition d'un forte absorption à 735 nm (tableau III.3). En effet, la m-THPBC présente un spectre d'absorption ultraviolet/visible (figure III.10a) comportant plusieurs bandes de grande intensité (353, 374, 517 et 735 nm). Tout comme la m-THPC, l'absorption de la m-THPBC dans le proche infrarouge est un atout pour son utilisation en PDT. Car c'est une longueur d'onde qui correspond à une forte pénétration de la lumière dans les tissus⁷.



Figure III.10 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible et (b) spectre (i) d'absorption et (ii) de fluorescence de la m-THPBC en solution dans l'éthanol (10⁻⁵ mol/L).

Bandes d'absorption Bande de Soret		Longueurs d'onde	ε (L/mol.cm) 154 049
		374 nm	
Q-Bands	IV	517 nm	57 980
	I	735 nm	130 333

Tableau III.3 – Caractéristiques spectrales de la m-THPBC en solution dans l'éthanol (1,02 10⁻⁵ mol/L).

L'empreinte spectrale de la m-THPBC en solution dans l'éthanol (figure III.11) obtenue lors des analyses effectuées en MALDI/FTICRMS, montre deux pics importants. Le premier correspond à l'ion [m-THPBC-H]⁺ à la masse m/z = 681 et le second, qui est le pic majoritaire, correspond à l'ion [m-THPBC]^{•+} à la masse m/z = 682.

Ce n'est pas le signal correspondant à l'ion $[m-THPBC+H]^+$ à m/z = 683 qui est majoritairement représenté sur la figure III.11. Ceci peut s'expliquer par le fait que les analyses MALDI/FTICRMS ont été effectuées en utilisant 355 nm comme longueur d'onde d'ionisation laser. Or, la solution de m-THPBC dans l'éthanol possède une forte absorption dans cette région spectrale. De ce fait, nous sommes plutôt dans un mécanisme de désorption laser directe avec une postionisation laser au niveau du nuage gazeux induit par l'impact laser.



Figure III.11 – Spectre MALDI/FTICRMS de la m-THPBC en solution dans l'éthanol (1,02 10⁻⁵ mol/L).

Ainsi, les études menées sur les trois photosensibilisants (m-THPP, m-THPC et m-THPBC) par spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et de fluorescence complétée par les analyses en MALDI/FTICRMS sur les photosensibilisants en milieu organique permettent une caractérisation et une identification sans équivoque de ces composés, notamment par leur empreinte spectrale caractéristique. Ceci va nous permettre d'obtenir une identification précise de la présence ou non de ces composés après traitement laser.

2 Photodégradation de la m-THPC en solution dans l'éthanol

2.1 Caractérisation des photoproduits de la m-THPC

Pour étudier le comportement de la m-THPC en milieu organique (éthanol), nous avons mis au point un protocole spécifique⁵. Il se décompose en quatre étapes distinctes qui font chacune l'objet d'analyses par spectrophotométrie d'absorption et de fluorescence, et par MALDI/ FTICRMS :

- Etape 0 : m-THPC (10⁻⁵ mol/L) non illuminée en solution dans l'éthanol bidistillé.
- **Etape 1** : première illumination de la solution de m-THPC (λ =650 nm, t_{exp} = 45 min soit t_{cum} = 0,3 ms, puissance laser = 300 mW, temps de pulse = 12 ns, fréquence = 10 Hz, Irr = 10⁷ W/cm²).
- Etape 2 : période de repos à l'obscurité et à température ambiante pendant 540 minutes.

Etape 3 : seconde illumination de la solution de m-THPC (λ =650 nm, t_{exp} = 45 min soit t_{cum} = 0,3 ms, puissance laser = 300 mW, temps de pulse = 12 ns, fréquence = 10 Hz, Irr = 10⁷ W/cm²).

Tous les paramètres du protocole laser (longueurs d'onde et énergie laser) ont fait l'objet d'une optimisation et sont contrôlés systématiquement (respectivement à l'aide d'un monochromateur et d'une cellule de mesure d'énergie) pendant le suivi de la réaction (cf. Ch.II § 4.2).



Figure III.12 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol; (i) avant illumination laser; (ii) immédiatement après la première illumination laser (650 nm, 300 mW); (iii) après 540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité; (iv) immédiatement après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW), (b) zoom de l'intervalle 350-450 nm.

Le spectre avant irradiation laser (figure III.12i, qui correspond à celui de la figure III.7 page 63) nous montre les pics de la bande de Soret à 417 nm et son épaulement à 406 nm, mais aussi les quatre Q-Bands à 517, 542, 597 et 650 nm.

Après la première illumination laser (figure III.12ii), la valeur de l'absorbance de l'épaulement de la bande de Soret (405 nm) a subi une réduction approximative de 12 %, tandis qu'aucun changement n'a été observé à 417 nm. Une baisse significative (30 %) de l'intensité de la bande à 650 nm a été observée (O) liée en même temps à l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 620 nm (\Box). Nous pouvons associer les changements d'aspect de la bande de Soret à l'augmentation de l'absorption à 418 nm suite à l'irradiation de la solution de m-THPC (figure III.13).



Figure III.13 – Spectre d'absorption différentielle de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol ; (i) avant illumination laser; (ii) immédiatement après la première illumination laser (650 nm, 300 mW); (iii) après 540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité; (iv) immédiatement après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW).

L'illumination laser a pour conséquences la photodégradation de la m-THPC caractérisée par la baisse de l'intensité de la bande d'absorption caractéristique à 650 nm et la formation de photoproduits caractérisée par l'apparition de nouvelles bandes d'absorption à 418 et 620 nm. Mais le produit formé reste une porphyrine car le spectre d'absorption ultraviolet/visible montre encore la présence de la bande de Soret et des Q-bandes.

Suite à la mise à l'obscurité pendant une période de 540 minutes, nous observons une augmentation de l'intensité des bandes d'absorption 620 nm et 418 nm. Il est à noter que nous avons effectué une expérience témoin en laissant dans le noir pendant 540 minutes une solution de m-THPC dans l'éthanol non irradiée. Aucun changement au niveau du spectre d'absorption ultraviolet/visible n'a alors été observé par rapport à celui de la solution initiale. Ainsi, les bandes d'absorption correspondant à 620 nm et 418 nm sont conséquentes à la première étape d'illumination laser et sont représentatives de la formation d'un ou plusieurs photoproduits. L'apparition de ce ou ces derniers est également mise en évidence par les études en absorption différentielle (figure III.13). Celles-ci nous montrent une augmentation significative des bandes d'absorption à 620 et 418 nm après la première phase d'illumination et durant la période de 540 minutes dans le noir. La seconde illumination de cette même solution de m-THPC dans l'éthanol entraîne une baisse de l'absorption à 620 nm et simultanément l'apparition de deux nouvelles bandes à 460 nm (+) et 775 nm (Δ) (figure III.12 et III.13). Ces deux nouvelles bandes révèlent l'apparition de nouveaux photoproduits suite à cette deuxième illumination.

L'évolution des intensités des bandes d'absorption d'intérêt (460, 620, 650 et 755 nm) est représentée sur la figure III.14. Cette représentation permet de voir facilement les corrélations existant entre la diminution de l'intensité de la bande d'absorption à 650 nm avec la hausse de celle située à 620 nm pendant la période de stockage dans le noir. De même, une augmentation en parallèle des deux bandes d'absorption 460 et 775 nm est remarquée. Ceci laisserait supposer que celles-ci sont représentatives d'un même photoproduit.



Figure III.14 – Evolution des bandes spécifiques (460, 620, 650 et 775 nm) d'absorption de la m-THPC en solution dans l'éthanol durant le protocole d'illumination laser.

Parallèlement, nous avons effectué des analyses en spectrophotométrie de fluorescence après chaque étape du protocole (figure III.15). Les résultats obtenus ont mis en évidence la baisse de fluorescence (photoblanchiment) de la m-THPC en solution dans l'éthanol à 653 nm avec pour longueur d'onde d'excitation 415 nm. Ces mesures ont aussi montré l'apparition d'une bande à 625 nm après la première irradiation laser. De plus, cette bande augmente durant l'étape 2 et décroît après l'étape 3. Il est donc possible d'associer l'apparition de la bande d'absorption à 620 nm avec celle de la bande de fluorescence à 625 nm.



Figure III.15 – Spectre de fluorescence de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol ; (i) avant illumination laser; (ii) immédiatement après la première illumination laser (650 nm, 300 mW); (iii) après 540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité; (iv) immédiatement après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW).

Il est difficile de tirer des conclusions précises quant à la nature de ces photoproduits en se basant exclusivement sur les résultats obtenus lors des analyses en spectrophotométrie. Cependant, la hausse de la bande de Soret à 418 nm, avec en parallèle l'apparition de la bande à 620 nm et de la bande de fluorescence à 625 nm lors de l'étape de stockage de la solution illuminée indiquerait la formation d'un produit intermédiaire. Suite à la seconde illumination, il y a formation d'un photoproduit final caractérisé par l'apparition des bandes à 460 et 775 nm. Cependant, comme nous l'avons signalé, il est ici indispensable de connaître la nature chimique des photoproduits intermédiaires ou finaux et c'est la raison pour laquelle nous avons étudié ces mêmes solutions par MALDI/FTICRMS.

Sur le spectre MALDI/FTICRMS de la solution éthanolique de m-THPC avant traitement laser (figure III.16i) nous retrouvons l'empreinte spectrale caractéristique du photosensibilisant avec notamment le pic m/z = 681 relatif à l'ion $[m-THPC+H]^+$. L'analyse de la solution obtenue après la première illumination laser montre, outre le massif propre à la présence de la m-THPC, deux nouveaux pics de faible intensité à m/z = 713 et 714 (figure III.16ii). Nous pouvons également observer la présence de deux signaux dont le rapport masse sur charge m/z = 742 et 743, d'intensité cependant très faible (figure III.16ii). Après la période de stockage pendant 540 minutes dans le noir et à température ambiante de la solution pré-irradiée de m-THPC, nous pouvons observer une hausse significative du massif centré sur les rapports m/z = 742 et 744. Nous avons noté la même tendance pour le massif autour de m/z = 713 et 714, dont l'intensité est globalement inférieure à celle du groupe de pics autour de m/z = 742 (figure III.16iii).



Figure III.16 – Spectres MALDI/FTICRMS (λ = 355 nm; Irr. = 10⁷ W/cm²) de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol; (i) avant illumination laser; (ii) immédiatement après la première illumination laser (650 nm, 300 mW); (iii) après 540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité ; (iv) immédiatement après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW).

Après la seconde irradiation laser (650 nm, 300 mW), le spectre de masse montre les mêmes distributions en masse autour de m/z = 713 et m/z = 742. Cependant, le massif de pics autour de m/z = 713 est maintenant prédominant par rapport à celui autour de m/z = 742 (figure III.16iv). De plus, l'observation de la présence des pics de masses m/z = 678 et m/z = 679 indiquerait une déshydrogénation de la molécule m-THPC suite à la seconde illumination laser.

Suite aux études effectuées à la fois par spectrophotométrie ultraviolet/visible et par spectrométrie de masse, nous pouvons corréler le massif centré sur m/z = 742 aux bandes d'absorption égale à 620 nm. Cette corrélation est rendue possible tout d'abord par la

similitude de l'évolution de l'intensité de la bande 620 nm qui est semblable à l'évolution des intensités des pics de masses centrés autour de m/z = 742 après le stockage dans le noir sous température ambiante. De plus, à partir de la même démarche, il semble que la distribution en masse autour de m/z = 713 soit corroborée avec l'apparition des bandes d'absorption égales à 460 et 775 nm. Il nous faut maintenant essayer d'identifier la nature du ou des photoproduits qui sont relatifs aux massifs centré sur m/z = 713 et 742.

2.2 Identification des massifs autour des m/z = 713 et 742

Les analyses effectuées par MALDI/FTICRMS ont permis dans un premier temps de formuler plusieurs hypothèses concernant la nature des distributions en masses centrées autour de m/z = 713 et 742 (figure III.17).



Figure III.17 – Premières hypothèses formulées primitives pour expliquer les différents massifs détectés⁵.

La nature de ces massifs sera discuter plus en détail au cours de cette partie.

2.2.1 Identification du massif autour de m/z = 742

Lors des premières analyses effectuées par MALDI/FTICRMS sur les solutions de m-THPC en milieu éthanol, un massif de pics de masse centré autour de la m/z = 742 a été mis en évidence⁵. Nous avions émis alors plusieurs hypothèses quant à la formation des composés

correspondants à savoir l'ajout sur la molécule de départ m-THPC de deux motif [•]CH₂OH ou encore de quatre fonctions hydroxyles [•]OH par substitution de quatre hydrogènes.

En outre, les résultats obtenus par Zenobi et coll.⁸ sur l'analyse de la m-THPC par spectrométrie de masse par ionisation laser (L2MS) indiquent, outre le pic de masse correspondant à l'ion moléculaire $[m-THPC]^{\bullet+}$ (m/z =680), un massif dont les pics de masse prédominants se situent à m/z = 742, m/z = 744 et m/z = 746. Une hypothèse a été suggérée concernant notamment l'espèce ionisée m/z = 746. Elle serait due à l'intervention d'un précurseur chloré lors de la synthèse de la m-THPC pour lequel les groupements hydroxyphenyls seraient remplacés par quatre entités fonctionnelles contenant du chlore. Celle-ci nous a paru difficilement explicable. Toutefois elle nous a conforté dans le fait que la détection du massif centré sur m/z = 742 ne provenait pas d'un artefact ou d'une pollution exogène.

Par ailleurs, les résultats de l'équipe de Limbach⁹ concernant l'analyse de la molécule zincoctaethylporphyrine par ESIMS laissent apparaître une distribution isotopique équivalente à celle trouvée dans notre cas autour de m/z = 742.

Ainsi, une première vérification s'imposait, à savoir la recherche de traces de zinc au niveau des différents solvants et composés utilisés lors de nos recherches sur la m-THPC en solution dans l'éthanol. Des analyses ont été effectuées par ICP/MS d'une part sur le solvant éthanol Normapur utilisé, et d'autre part sur ce même solvant mais ayant subi une bidistillation (solvant que nous utilisons pour toutes les expériences sur les photosensibilisants) et sur une solution de m-THPC dans l'éthanol bidistillé. Il s'avère que la solution d'éthanol Normapur contient 2 μ g/L de zinc alors que le zinc n'a pas été détecté lors de l'analyse du même solvant bidistillé en laboratoire. En ce qui concerne la solution m-THPC dans l'éthanol bidistillé, la concentration en zinc est égale à 5 μ g/L. Ainsi, ces différentes analyses indiquent clairement que le zinc résiduel détecté provient de la m-THPC sur laquelle nous avons effectué nos expériences. Ceci expliquerait également le fait que l'équipe de Zenobi⁸ a observé le massif autour de m/z = 742.

Ainsi, toujours dans l'hypothèse où le zinc serait bien le cation divalent réactif, nous avons effectué des analyses sur le composé 5, 10, 15, 20-tétraphényl-21H, 23H porphyrine zinc

(ZnTPP) commercialisé par la société Acros Organics (France). Sa formule brute est $C_{44}H_{28}N_4Zn$ pour une masse molaire égale à 676,15 g/mol. Le spectre d'absorption ultraviolet/visible dans l'éthanol (figure III.18a) laisse apparaître deux Q-bandes situées à 596 nm et 557 nm et la bande de Soret à 422 nm. Les analyses MALDI/FTICRMS (figure III.18b), quant à elles, indiquent la présence du pic pseudo moléculaire [TPP+H]⁺ (m/z = 615) et ses satellites, mais aussi un massif correspondant à la distribution isotopique [ZnTPP]^{•+} (m/z = 676, 677, 678, 679, 680, 681 et 682). La détection de la porphyrine de libre TPP laisserait à penser que :

i) le rendement d'ionisation de la molécule TPP en ion pseudo-moléculaire [TPP+H]⁺ serait supérieur à celui du complexe ZnTPP,

ii) le composé ZnTPP commercial est donné à 95 % de pureté et ainsi peut-on penser qu'il y a des traces de porphyrine libre TPP au sein même du produit,

iii) l'étape de désorption/ionisation laser induirait une décomposition du cation Zn^{2^+} par un mécanisme de photodissociation faisant intervenir un processus de transfert de charge au niveau du macrocycle.

Un comportement similaire a été décelé lors des études effectuées par spectrométrie de masse L2TOFMS similaire sur l'octoaethylporphyrine de cuivre (CuOEP) par l'équipe de Dale¹⁰. En effet, sous une ionisation à 193 nm à forte irradiance (5 MW/cm²), cette molécule subit une « démétalation »pour conduire à un spectre de masse indiquant le pic moléculaire [CuOEP]^{•+} (m/z = 596) et le pic [M-Cu+2H]⁺ (m/z = 535).



Figure III.18 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible du ZnTPP en solution dans l'éthanol (10^{-5} mol/L); (b) Spectres MALDI/FTICRMS du ZnTPP en solution dans l'éthanol (10^{-5} mol/L) ($\lambda = 355$ nm; Irr. = 10^{7} W/cm²).

Ainsi, ces études révèlent que nos conditions opératoires MALDI/FTICRMS permettent la détection du complexe porphyrine-zinc notamment grâce à la distribution isotopique caractéristique du zinc. Somme toute, cette distribution concernant le composé ZnTPP est bien la même que celle trouvée avec la solution de m-THPC dans l'éthanol aux écarts de masse prêts.

Lors des analyses sur le comportement de la molécule m-THPC en milieu éthanol, il est apparu, suite à la période de 540 minutes dans le noir, une bande d'absorption à 620 nm avec en corollaire la mise en évidence d'un massif de pic de masse centré sur m/z = 742 (figure III.16 page 71). Suite à une seconde illumination laser, l'intensité respective de ces deux signaux s'est vue abaissée avec une apparition en parallèle de deux nouvelles bandes d'absorption à 460 et 775 nm, ceci étant corroboré par la détection d'un massif de pic centré autour de m/z = 713 (figure III.16 page 14).

Les études ont alors porté sur la vérification selon laquelle les bandes d'absorption situées à 460 nm et 775 nm, après la seconde illumination laser, sont liées à la disparition de la bande à 620 nm qui serait caractéristique de la présence du complexe Zn-m-THPC dans notre solution.

Des études complémentaires ont été réalisées, à la lumière naturelle et à température ambiante, par spectrophotométrie ultraviolet/visible sur trois solutions préparées de la façon suivante : une concentration en sels CuSO₄, 5 H₂O et FeSO₄, 7 H₂O à une concentration de $4,61 \, 10^{-6}$ mol/L ceux-ci pris respectivement en solution en présence de m-THPC à $2,34 \, 10^{-5}$ mol/L, pour la solution avec le sel de zinc ZnSO₄, 7 H₂O à une concentration de $4,61 \, 10^{-6}$ mol/L et la m-THPC est à $1,02 \, 10^{-6}$ mol/L. Ces conditions ont été choisies ainsi car il s'est avéré que l'apparition de la bande à 620 nm était dépendante des concentrations respectives de la m-THPC et des sels utilisés. Ainsi, nous devons travailler en excès en ce qui concerne les sels de cuivre et de fer mais en défaut dans le cas du zinc.

Les mesures par spectrophotométrie ultraviolet/visible ont été faites en trois temps :

i) pour chacun des trois sels mis en solution avec la m-THPC,

ii) après quatre jours de stockage dans le noir à température ambiante,

iii) suite à la remise à la lumière naturelle pendant deux heures (figure III.19).

Au temps t₀, correspondant aux solutions de départ m-THPC/ZnSO₄, m-THPC/FeSO₄ et m-THPC/CuSO₄, les spectres d'absorption sont caractéristiques de la présence en m-THPC avec notamment les bandes situées à 420 nm (bande de Soret) et à 650 nm. Suite à la période de stockage de quatre jours dans le noir, il y a apparition de la bande à 620 nm pour chacune des solutions analysées, accompagnée de la baisse de la bande d'absorption à 650 nm avec disparition de l'épaulement à 405 nm de la bande de Soret. A noter toutefois la disparition totale de la bande à 650 nm en ce qui concerne le mélange m-THPC/CuSO₄, ce qui indiquerait une réactivité plus importante entre la m-THPC et le sel de cuivre comparé aux deux autres. Du fait de l'apparition, dans les trois cas, de la bande à 620 nm, nous pouvons penser que celle-ci est relative au phénomène de complexation de chacun des cations par la m-THPC. Enfin, lors de la remise à la lumière naturelle pendant deux heures, les spectres d'absorption concernant les sels CuSO₄ et FeSO₄ n'indiquent aucun changement, ce qui laisserait penser que le fer et le cuivre se complexent de manière irréversible.



Figure III.19 – Spectres d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC en solution dans l'éthanol en présence de (a) ZnSO₄, 7 H₂O; (b) CuSO₄, 5 H₂O et (c) FeSO₄, 7 H₂O.

En ce qui concerne le mélange m-THPC/ZnSO₄, cette bande d'absorption diminue alors que la bande à 650 nm reste stable. Néanmoins, deux bandes d'absorption apparaissent à 460 nm et 775 nm et le maximum de la bande de Soret à 415 nm diminue.

Ces études montrent que la présence des deux bandes 460 nm et 775 nm n'existent que pour la solution m-THPC/ZnSO₄ pour laquelle nous avons également une bande d'absorption à 620 nm après la période de stockage dans le noir. Ainsi, l'hypothèse selon laquelle le produit correspondant à la bande d'absorption 620 nm et au massif centré autour de m/z = 742 serait le complexe Zn-m-THPC est renforcée.



Figure III.20 – Spectres de masse (a) simulé, (b) MALDI/FTICRMS de la molécule de Zn-m-THPC et (c) distribution isotopique du zinc.

Néanmoins, pour apporter des arguments supplémentaires, une solution de m-THPC/ZnCl₂ (7,5 10^{-6} mol/L / 1,7 10^{-5} mol/L) dans l'éthanol a été étudiée par spectrophotométrie ultraviolet/visible et par MALDI/FTICRMS, cette dernière technique étant utilisée suite à la période de stockage dans le noir et après la seconde illumination laser. Lors de son analyse, la solution m-THPC/ZnCl₂ après la période de stockage dans le noir (figure III.21a), montre à nouveau l'apparition de la bande d'absorption à 620 nm (\Box). Suite à la seconde illumination laser à 650 nm, il y a diminution de l'intensité de cette bande avec apparition des bandes d'absorption 460 nm (+) et 775 nm (Δ) (figure III.21a). Ces résultats corroborent tout à fait ceux trouvés lors des études précédentes effectuées sous la lumière naturelle. De plus, le spectre MALDI/FTICRMS de la solution m-THPC/ZnCl₂ laissée dans le noir après la première illumination laser (figure III.21b) indiquent la présence des pics de masse caractéristiques de la molécule m-THPC à savoir [m-THPC+H]+ (m/z = 681) avec la

distribution isotopique en ¹³C. De plus, il apparaît que le massif est centré autour de m/z = 742, ce qui indique que celui-ci est bien lié à l'apparition de la bande à 620 nm (\Box) qui elle-même serait liée à la complexation du zinc par la molécule m-THPC.

L'analyse par MALDI/FTICRMS apparaît ici comme de toute première importance car, en analysant de façon précise la distribution des pics de masse centrés autour de m/z = 742, nous avons émis l'hypothèse que ces derniers seraient caractéristiques du complexe formé entre un atome de zinc et la molécule de m-THPC. En effet, le zinc compte cinq isotopes à savoir ⁶⁴Zn (48,6 %), ⁶⁶Zn (27,9 %), ⁶⁷Zn (4,1 %), ⁶⁸Zn (18,8 %) et ⁷⁰Zn (0,7 %). Nous voyons ainsi la similitude entre le spectre de simulation de la molécule de Zn-THPC (figure III.20) et le spectre concernant la solution éthanolique de m-THPC gardée dans le noir 540 minutes après illumination laser (figure III.16iii page 71).



Figure III.21 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible du mélange m-THPC/ZnCl₂ en solution dans l'éthanol ; (i) avant illumination laser; (ii) après la première illumination laser (650 nm); (iii) après 540 min au

repos à température ambiante dans l'obscurité; (iv) après la seconde illumination laser (650 nm) ; Spectres MALDI/FTICRMS du mélange m-THPC/ZnCl₂ en solution dans l'éthanol ($\lambda = 355$ nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (b) après la première illumination laser et la période de repos au noir et à température ambiante ; (c) après la seconde illumination laser (650 nm). Suite à la deuxième illumination laser (figure III.21c), le spectre de masse montre la présence d'un massif situé autour de m/z =713 en corrélation avec l'apparition des bandes d'absorption 460 nm (+) et 775 nm (Δ). Ainsi, celles-ci seraient caractéristiques des photoproduits dont nous allons discuter la nature dans la partie suivante (cf. Ch.III § 2.2.2).

Suite à ces recherches, nous pouvons conclure que le massif situé autour de la masse m/z = 742, en corrélation avec les analyses effectuées par spectrophotométrie ultraviolet/visible et par MALDI/FTICRMS, est relatif à la présence de zinc complexé par le photosensibilisant m-THPC.

2.2.2 Identification du massif autour de m/z = 713

Etant donné l'écart de masse égal à 32 entre la molécule de départ m-THPC (M = 680 g/mol) et le ou les photoproduits correspondants au massif centré autour de m/z = 712, nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle nous sommes en présence d'une photooxygénation via l'absorption de la lumière par le photosensibilisant (PS). Cependant, il nous est difficile à ce stade de déterminer si cette photooxygénation est faite selon un processus direct de type $PS+O_2 \xrightarrow{hv}PSO_2$ ou selon un processus indirect (ou photosensibilisé) du type $PS+O_2 \xrightarrow{hv/PS} PSO_2$. Néanmoins, plusieurs possibilités s'offrent à nous pour expliquer la nature de ces composés.

Hypothèse 1

L'addition, selon une réaction de type II faisant intervenir l'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$, sur une double liaison aboutissant à la formation d'un dioxetane qui est cependant très instable, ce qui nous conduit à rejeter cette hypothèse.



Hypothèse 2

La possibilité d'avoir une réaction de type Diels-Alder sur un système conjugué selon le processus I ou la formation d'un hyperoxyde via le réarrangement à partir d'un intermédiaire perepoxyde (processus II), compte tenu de la structure de la molécule de départ m-THPC, la réaction de type Diels-Alder ne peut s'effectuer que sur le noyau pyrrolique au niveau des sites pyrroliques A et C et la formation de l'hyperoxyde peut quant à elle être envisageable soit sur le noyau tétrapyrrolique soit au niveau des groupements hydroxyphenyls. Cependant, compte tenu d'une part de la rigidité et de la stabilité du système aromatique constitué de 18 électrons π et d'autre part que la formation de l'hyperoxyde (présentant un certain degré de stéréosélectivité et régiosélectivité) fait intervenir un réarrangement de type allylique, cette seconde hypothèse est écartée également.



Hypothèse 3

Les amines sont sensibles vis-à-vis des agents oxydants. La réaction la plus importante concerne les amines tertiaires qui peuvent être oxydées par le peroxyde d'hydrogène en oxydes d'amine ou N-oxydes correspondants.



Cette réaction ne peut se faire qu'en présence de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Ce composé peut être généré via le mécanisme photochimique de type I qui veut que le sensibilisateur à l'état triplet soit à l'origine de la formation d'ion-radicaux ou de radicaux pouvant être par la suite oxydés par l'oxygène dissout sous son état fondamental :

$$PS(S_0) \xrightarrow{h\nu} PS^*(S_1) \xrightarrow{croisement} PS^*(T_1)$$
(1)

$$PS^{*}(T_{1}) + PS \longrightarrow PS_{ox}^{\bullet+} + PS_{réd}^{\bullet-}$$
(2)

$$PS_{r\acute{ed}}^{\bullet-} + O_2 \longrightarrow PS(S_0) + \frac{O_2^{\bullet-}}{anion \ superoxyde}$$
(3)

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \longrightarrow O_2^{\bullet-} + O_2^{2-}$$
 (4)

$$O_2^{\bullet-} + H^+ \longrightarrow HO_2^{\bullet}$$
(5)

La protonation de l'anion superoxyde provoque sa dismutation rapide, essentiellement suivant les équations chimiques (6) et (7), la dismutation simple (8) étant cinétiquement défavorisée et lente même en présence d'eau :

$$O_2^{\bullet-} + HO_2^{\bullet} \longrightarrow O_2 + HO_2^{-} \tag{6}$$

$$HO_{2}^{\bullet} + HO_{2}^{\bullet} \longrightarrow O_{2} + \frac{H_{2}O_{2}}{\text{peroxyde d'hydrogène}}$$
(7)

$$O_2^{\bullet-} + O_2^{\bullet-} \xrightarrow{2 H_2 O} O_2 + H_2 O_2 + 2 OH^-$$
 (8)

La possibilité de déprotonation par l'anion superoxyde doit rester en mémoire dans toutes les réactions impliquant des composés contenant des atomes d'hydrogène acides et labiles.

Ainsi, par ce système réactionnel, nous voyons la possibilité de la formation via des processus radicalaires de l'entité peroxyde d'hydrogène intervenant dans la formation des N-oxydes. Ainsi, il est tout à fait envisageable d'être en présence de N-oxydes (chlorine-N-oxyde) en ce qui concerne la détection du ou des photoproduits autour de la masse m/z = 712. Compte tenu de la répartition des charges, l'entité (R)₃-N⁺-O⁻ est neutre et ne peut donc être détectée suite à une analyse par FTICRMS. Cependant, dans le cas où nous considérons le processus MALDI

prédominant, compte tenu de la présence de deux sites d'attaque pour la protonation (deux fonctions N-oxyde), nous serions en droit d'attendre un signal prédominant à m/z = 713, si nous considérons la capture d'un seul cation H⁺ sur une des fonctions N-oxyde, ce qui est le cas si nous nous référons aux résultats obtenus (figure III.16iv page 71).

Hypothèse 4

Cette quatrième hypothèse porte sur la participation de deux radicaux [•]OH pour aboutir aux composés hydroxylés, qui s'effectuerait soit par addition, soit par substitution de ces deux groupements [•]OH sur la molécule de m-THPC. La technique MALDI/FTICRMS va nous permettre de lever l'ambiguïté substitution/addition par la détermination des masses exactes des espèces détectées (tableau III.4).



		[dihydroxy-m-THPC+H] ⁺
m/z mesurée		713,24321
m/z calculée pour le cas de la substitution	$[C_{34}H_{32}O_6N_4+H]^+$	713,23946
m/z calculée pour le cas de l'addition	$[C_{34}H_{34}O_6N_4+H]^+$	715,25511
		1 / 710

Tableau III.4 – Simulation de l'espèce du massif autour de m/z = 713.

Dans ce but nous avons effectué une simulation des spectres de masse correspondant au deux réactions sur lesquel nous observons l'ion moléculaire protoné $[M+H]^+$ et sa distribution isotopique (figure III.22b et III.22c). Si nous comparons ces spectres à celui correspondant à la m-THPC en solution dans l'éthanol suite à la seconde irradiation à 650 nm (figure III.22a), nous remarquons que le signal à la masse m/z = 713 (résolution 3000) est prédominant comme sur le spectre de masse correspondant à la substitution des deux groupements [•]OH (figure III.22b). Si nous comparons maintenant le rapport m/z mesuré et le m/z calculé pour le cas de la substitution (tableau III.4), nous remarquons que les deux masses sont proches. Ce résultat conforte notre hypothèse quant à la formation du dihydroxy-m-THPC par le biais d'une substitution. Celle-ci s'effectuerait sur deux atomes d'hydrogènes remplacés par deux groupements [•]OH soit sur le cycle tetrapyrrolique, soit sur les groupements hydroxyphenyls.



Figure III.22 – (a) Spectre MALDI/FTICRMS (2,5 DHB, 355 nm, 10⁷ W/cm²)de la m-THPC en solution dans
l'éthanol (10⁻⁵ mol/L mol/L) après la deuxième irradiation laser (650 mn, 300 mW) ; (b) Spectre de masse simulé de l'ion moléculaire protoné pour la molécule de dihydroxy-m-THPC obtenu par substitution de deux groupements [•]OH ; (c) Spectre de masse simulé de l'ion moléculaire protoné pour la molécule de dihydroxy-m-THPC obtenu par substitution de deux dihydroxy-m-THPC obtenu par addition de deux groupements [•]OH ;

Après analyse sur la m-THPC en milieu organique (éthanol) par spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et par MALDIFTICRMS, nous pouvons tirer plusieurs conclusions importantes :

(1) Par ces deux techniques, nous avons suivi la photodégradation de la m-THPC (évolution de la bande d'absorption à 650 nm et du signal à m/z = 681).

(2) Mise en évidence de la phototransformation de la m-THPC après la seconde illumination laser (apparition des bandes d'absorption à 460 et 775 nm et massif autour de m/z = 713).

(3) Détermination de la nature du ou des photoproduits générés par illumination laser. Il semble donc que deux hypothèses peuvent être prises en compte : la première concernant la formation de N-oxydes et la seconde concernant la formation d'un composé dihydroxylé. Compte tenu des travaux effectués par d'autres équipes¹, l'hypothèse selon laquelle nous serions en présence d'un photoproduit semble raisonnable. Celui-ci pourrait être identifié comme étant le dihydroxy-m-THPC (formule brute : $C_{34}H_{32}O_6N_4$ et poids moléculaire : 712 g/mol)⁵.

Remarque : la très forte différence des spectres entre le chromophore dihydroxy-m-THPC et le spectre final (absorbant à 460 et 775 nm) tendrait à renforcer la première hypothèse.

2.3 Mise en évidence de la présence d'oxygène singulet moléculaire

Les travaux énoncés dans ce chapitre ont été effectués avec le concours de Monsieur Jérôme Bour et ont fait l'objet de son mémoire de stage de DEA (Diplôme d'Etudes Approfondies, 2001).

L'oxygène singulet moléculaire ${}^{1}O_{2}$ suscite toujours un grand intérêt scientifique dans la compréhension des réactions de photooxydation. Parmi les techniques permettant de mettre en évidence cette espèce réactive de l'oxygène, nous pouvons signaler la détection résolue dans le temps de la luminescence de l'oxygène singulet située à 1 269 nm, correspondant à une transition caractéristique de l'émission entre l'état excité singulet ${}^{1}O_{2}$ et l'état fondamental triplet de l'oxygène moléculaire ${}^{3}O_{2}{}^{11}$. La longueur d'onde d'excitation (675 nm, correspondant au maximum d'absorption du photosensibilisant) est générée par un oscillateur optique paramétré large bande, pompé par la troisième harmonique d'un laser Nd-YAG (355 nm), pour un temps de pulse de 4 à 6 ns avec une énergie de 0,5 à 0,8 mJ.

Aussi, la technique d'absorption en temps résolu à 5 200 cm⁻¹ [${}^{1}O_{2} \rightarrow {}^{3}O_{2}$] permet la détection de l'oxygène moléculaire singulet au sein de solvants hydrocarbonés (toluène, n-hexane) sous pression atmosphérique¹². Cette méthode permet non seulement de caractériser l'espèce réactive oxygénée mais fournit également des informations sur l'effet du solvant sur la transition radiative ${}^{1}O_{2} \rightarrow {}^{3}O_{2}$.

En parallèle, il existe des tests indirects caractéristiques de la présence de l'oxygène moléculaire singulet. Ceux-ci sont basés sur l'utilisation de sondes organiques spécifiques telle que la molécule de 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF). Par réaction avec l'oxygène singulet via une cycloaddition [4+2] (figure III.23), cette molécule de masse molaire 270 g/mol produit un endopéroxyde peu stable qui se transforme rapidement en orthodibenzoylbenzène II (o-BB) de masse molaire 286 g/mol (cf. Ch.I § 5).

Cette réaction peut être considérée comme un gage de présence d'oxygène singulet¹³ dans les processus à la fois chimiques et biologiques pour les raisons suivantes :

i) la molécule de DPBF réagit rapidement avec l'oxygène singulet ${}^{1}O_{2}$ (k = 7 10⁸ M⁻¹.s⁻¹ dans le benzène à 25 °C et 8 10⁸ M⁻¹.s⁻¹ dans le méthanol),

ii) la molécule de DPBF ne réagit pas avec l'état fondamental triplet moléculaire de l'oxygène,

iii) la seule réaction de la molécule de DPBF avec l'oxygène singulet ${}^{1}O_{2}$ est le caractère chimique selon DPBF + ${}^{1}O_{2} \rightarrow$ o-BB contrairement à des réactions à caractère physique du type A + ${}^{1}O_{2}$ (singulet) \rightarrow A + ${}^{3}O_{2}$ (triplet).



Figure III.23 – Photooxydation du DBPF.

Parmi les nombreux travaux effectués sur l'utilisation de la molécule de DPBF, notons les travaux d'Hadjur et coll.¹⁴ sur la production d'oxygène singulet par le photosensibilisant m-THPC. Il y est montré notamment qu'il n'y a pas d'interaction significative entre le DPBF et l'état fondamental ou le premier état singulet excité de la m-THPC. Par la mesure de l'absorbance de la DPBF à 415 nm d'une solution éthanolique aérée contenant le mélange m-THPC (1,6 10^{-6} mol/L)/DPBF (25 10^{-6} mol/L) en fonction du temps d'illumination, les auteurs indiquent que l'oxygène singulet peut être généré à partir de la photosensibilisation de la m-THPC. Les résultats obtenus par la méthode Stern-Volmer sur l'évolution du rapport $1/\phi_{DPBF}$ en fonction de 1/[DPBF], ont révélé un rendement quantique de formation de l'oxygène singulet égal à 0,30 dans l'éthanol et dans le solvant PBS avec ajout de 10 % de sérum de veau fœtal.

Les travaux menés par Reddi et coll.¹⁵, montrent par mesure de luminescence que le temps de vie de l'oxygène moléculaire singulet en solution dans l'éthanol saturé en oxygène était réduit par addition de DPBF. La diminution de concentration de celle-ci suivie par spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible indiquerait une vitesse de réaction DPBF + ${}^{1}O_{2}$ égale à 10⁹ M⁻¹.s⁻¹.

Des études¹⁶ ont été également menées sur l'inactivation de l'oxygène singulet ${}^{1}O_{2}$ par la vitamine E (α -tocopherol) dans les systèmes de membranes liposomiales. Pour cela, les

auteurs ont mis en œuvre des expériences cinétiques basées sur la réaction compétitive entre la vitamine E (de 25 10^{-6} mol/L à 250 10^{-6} mol/L) et le DPBF (250 10^{-6} mol/L) au niveau des membranes liposomiales et d'une solution éthanolique, l'oxygène moléculaire ${}^{1}O_{2}$ étant généré par irradiation à l'aide d'une lampe tungstène (85 W, 1564 lumen) en présence de deux agents photosensibles, le bleu de méthylène et l'acide 12-(1-pyrène) dodecanoïque. Ainsi, la constante de vitesse de désactivation de l'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$ dans les lyposomes utilisés a été estimée égale à 8,3 10^{4} s⁻¹. De plus, la vitesse de réaction de la DPBF sur ${}^{1}O_{2}$ a été notée égale à 6,5 10^{7} M⁻¹.s⁻¹ avec l'acide 12-(1-pyrène) dodecanoïque comme agent photosensible et à 9,6 10^{7} M⁻¹.s⁻¹ pour le bleu de méthylène au niveau des liposomes alors qu'elle est égale à 1,5 10^{8} M⁻¹.s⁻¹ (12-(1-pyrène) dodecanoïque) et 2,5 10^{8} M⁻¹.s⁻¹ (bleu de méthylène) en solution dans l'éthanol.

Ainsi, la molécule DPBF est acquise comme une sonde moléculaire spécifique de la présence dans le milieu de l'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$. Dans ce contexte, il nous est apparu particulièrement intéressant de mener des études sur la caractérisation de l'oxygène réactif par le DPBF en utilisant une technique jusque là encore peu utilisée dans ce domaine : la spectrométrie de masse. En effet, nous voulons non pas caractériser la présence d'oxygène singulet par disparition de la molécule sonde de DPBF mais bien par l'identification du produit final à savoir l'o-BB, ce qui est une nouvelle approche.

Aussi, étant donné que le fait que la m-THPC est susceptible de générer l'espèce réactive ${}^{1}O_{2}$, nous avons mis en œuvre des études sur des solutions éthanoliques constituées d'un mélange m-THPC (10^{-5} mol/L) et DPBF (10^{-3} mol/L) sous conditions standard (pression atmosphérique et température ambiante). L'objectif principal de ces recherches réside dans la mise en évidence de l'efficacité de la technique MALDI/FTICRMS à déceler la présence de cette espèce réactive qu'est l'oxygène singulet en solution.

2.3.1 Analyse par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS de la molécule de 1,3 diphénylisobenzofurane (DPBF) et ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) en milieu éthanol

Nous nous attacherons dans cette première partie de l'étude à l'analyse des différents standards (DPBF et o-BB) afin de collecter des données spécifiques à chacun d'eux et ainsi de

pouvoir identifier sans équivoque leur présence ou non au sein de la solution étudiée. Pour cela, nous avons préalablement solubilisé ces composés dans l'éthanol, puis ces derniers ont été étudiés par GC/ITMS et par MALDI/FTICRMS.

2.3.1.1 Analyse de la 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) en milieu éthanolique

L'analyse par GC/ITMS (figure III.24) fait apparaître un seul pic chromatographique à un temps de rétention égal à 32,2 minutes. L'empreinte spectrale en mode d'ionisation par impact électronique du composé relatif à ce pic révèle un pic de masse majoritaire m/z = 270 et une distribution de fragments de plus petite masse et de faible intensité (figure III.24a). La comparaison de ce spectre avec la banque de données NIST 97 permet de conclure sans équivoque à la caractérisation de la molécule de DPBF. De plus, l'analyse en mode d'ionisation chimique indique un pic de masse caractéristique de l'ion [DPBF+H]⁺ à la masse m/z = 271 (figure III.24b), par échange du proton de l'ion réactif de l'acétonitrile protoné [CH₃CN+H]⁺ avec la molécule DPBF. Ces premières mesures indiquent que nous travaillons avec un produit pur et qui est parfaitement identifiable par cette technique.



Figure III.24 –Chromatogramme et spectres de masse par ionisation (a) en impact électronique et (b) en ionisation chimique du DPBF en solution dans l'éthanol à 10⁻³ mol/L.

L'analyse du composé standard DPBF par MALDI/FTICRMS (figure III.25a), indique quant à elle deux pics de masse m/z = 270 et m/z = 271, relatifs respectivement à [DPBF]⁺ et [DPBF+H]⁺. La détection simultanée, avec une intensité quasi-équivalente, de ces deux pics moléculaires indiquerait que nous sommes en présence d'une « self ionisation-chimique » au sein du nuage gazeux induit par l'impact laser à λ = 355 nm. Outre ces deux pics caractéristiques de la présence de la molécule DPBF, nous avons également constaté l'apparition des espèces ionisées $[DPBF+K]^+$ à m/z = 309 et $[DPBF+COOH]^+$ à m/z = 315, ce dernier correspondant à une carboxylation de la molécule par réaction avec une molécule de matrice. Pour expliquer le pic à m/z = 325, il demeure deux hypothèses : une première qui consisterait à dire que nous sommes en présence de l'ion $[(DPBF-H)+OH+K]^+$ et une seconde qui consisterait à dire que la molécule o-BB se serait formée lors du phénomène désorption/ionisation laser et qu'elle serait présente sous la forme $[o-BB+K]^+$.

Toutefois, nous pouvons apercevoir sur le spectre (spectre cumulé à l'issu de 10 impacts laser) MALDI/FTICRMS (figure III.25a) relatif à la solution avant illumination laser, un pic de faible intensité m/z = 287 correspondant à l'ion [o-BB+H]⁺, le fait que l'intensité relative de m/z = 287 augmente après l'illumination laser à 650 nm confirmerait plutôt la seconde hypothèse.



Figure III.25 – Spectre MALDI/FTICRMS du DPBF en solution dans l'éthanol (10⁻³ mol/L) (a) avant irradiation laser et (b) après irradiation laser (650 nm, 300 mW).

De plus, l'identification de la molécule de DPBF par GC/ITMS après illumination laser d'une solution éthanolique composée de DPBF pure, démontre que cette molécule est stable sous nos conditions d'illumination laser à 650 nm. L'analyse en MALDI/FTICRMS (figure III.25b) de cette même solution montre à nouveau une légère apparition du pic m/z = 287 caractéristique de l'ion $[o-BB+H]^+$. Ainsi, il semble qu'il y ait une faible proportion de molécules o-BB formées lors du processus désorption/ionisation laser assistée par matrice au sein de notre spectromètre de masse FTICRMS, ce qui n'est pas aberrant car la technique MALDI implique une irradiation ultraviolette (355 nm). Les études menées à la fois par GC/ITMS et MALDI/FTICRMS sur la molécule de DPBF permettent de caractériser sans

équivoque cette dernière, notamment grâce à son temps de rétention ($t_R = 32,2 \text{ min}$) et à son empreinte spectrale caractéristique, principalement par les pics de masse m/z = 270, m/z = 309 et m/z = 315.

2.3.1.2 Analyse de l'orthodibenzoylbenzène (o-BB) en milieu éthanolique

Le chromatogramme montre un pic au temps de rétention $t_R = 29,9$ min (figure III.27). Le spectre de masse obtenu par ionisation par impact électronique laisse apparaître le pic moléculaire m/z = 286 caractéristique de l'ion [o-BB]⁺⁺ (figure III.27a). En outre, nous pouvons voir la présence de pics caractéristiques m/z = 209, m/z = 181, m/z = 105 attribués respectivement aux espèces ionisées [o-BB-Ph]⁺, [o-BB-(PhCO)]⁺ et [PhCO]⁺. Ce dernier est particulièrement important car ce fragment ne peut provenir que de la molécule parent o-BB et constitue donc une preuve supplémentaire de la présence de cette molécule (figure III.26). Nous notons la détection du pic très majoritaire [o-BB+H]⁺ sur le spectre de masse en mode d'ionisation chimique (figure III.27b).



Figure III.26 – Mécanismes de fragmentations de l'o-BB observés par EI en GC/ITMS.



Figure III.27 – Chromatogramme et spectres de masse par ionisation (a) en impact électronique et (b) en ionisation chimique de l'o-BB en solution dans l'éthanol à 10⁻³ mol/L.

Le spectre MALDI/FTICRMS de l'o-BB en solution éthanolique (figure III.28a) laisse apparaître trois pics caractéristiques m/z = 287, m/z = 309, m/z = 325 correspondant respectivement aux espèces ionisées $[o-BB+H]^+$, $[o-BB+Na]^+$ et $[o-BB+K]^+$. Il est à noter la faible intensité du pic de masse pseudomoléculaire $[o-BB+H]^+$ par rapport aux espèces cationisées contrairement aux analyses par MALDI/FTICRMS effectuées sur le standard DPBF sur lesquelles les ions m/z = 270 et m/z = 271 étaient les plus intenses. De plus, nous voyons que l'impact laser durant l'étape de désorption/ionisation n'altère en rien la molécule d'o-BB qui reste intacte et donc permet une identification sans ambiguïté de celle-ci par MALDI/FTICRMS. Le spectre MALDIFTICRMS (figure III.28b) obtenu après illumination laser d'une solution éthanolique composée d'o-BB pur, démontre que cette molécule est stable sous nos conditions d'illumination laser à 650 nm car nous retrouvons une empreinte spectrale similaire à celle obtenue avant traitement laser (figure III.28a).



Figure III.28 – Spectre MALDI/FTICRMS de l'o-BB en solution dans l'éthanol (10⁻³ mol/L) (a) avant irradiation laser et (b) après irradiation laser (650 nm, 300 mW).

Les deux techniques d'analyse permettent effectivement une différentiation et une caractérisation sans ambiguïté des deux composés standard DPBF et o-BB en solution dans l'éthanol d'une part par leur temps de rétention respectif $t_R = 32,2$ et 29,9 minutes, et d'autre part par les pics de masse caractéristiques à savoir m/z = 270, 271 et 309 et m/z = 287 et 325 pour o-BB. Toutefois, en mode d'ionisation MALDI, l'impact laser induit déjà une part de transformation de la DPBF en o-BB, qui est somme toute minime, mais néanmoins significative.

2.3.2 Analyse du mélange DPBF (10⁻³ mol/L) / m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol

Les études concernant le mélange DPBF/m-THPC ont été effectuées par MALDI/FTICRMS et par GC/ITMS avant et après illumination laser ($\lambda = 650$ nm) de ce mélange pendant 1 heure à 300 mW.

Avant illumination laser, nous retrouvons le pic chromatographique caractéristique de l'espèce DPBF à $t_R = 32,2$ min (figure III.29), identification confirmée par le spectre de masse obtenu par ionisation en impact électronique. La transformation est totale au bout d'une heure soit un temps d'illumination effectif égal à 0,4 ms (cf. Ch.I § 4.2).



Figure III.29 – Chromatogrammes du mélange DPBF (10⁻³ mol/L) / m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol avant et après irradiation laser à 650 nm.

L'analyse de cette même solution DPBF/m-THPC avant illumination laser par MALDI/FTICRMS (figure III.30a) apporte plusieurs informations :

i) la mise en évidence de la m-THPC notamment par la présence du pic moléculaire m/z = 681 relatif à l'ion $[m-THPC+H]^+$, de l'ion $[m-THPC+OH]^+$ à m/z = 697 et du pic de masse m/z = 742 correspondant à l'espèce ionisée $[m-THPC-2H+Zn]^+$, le zinc provenant selon les résultats évoqués précédemment du composé cristallisé m-THPC de départ (cf. Ch.III § 2.2.1)

ii) nous retrouvons le pic moléculaire $[DPBF]^{*+}$ (m/z = 270) avec les pics caractéristiques $[DPBF+K]^{+}$ (m/z = 309) et $[DPBF+COOH]^{+}$ (m/z = 315). La présence des pics de masse m/z = 287 de faible intensité par rapport à celui relatif à $[DPBF]^{*+}$ et m/z = 325 $[DPBF+K]^{+}$ reflète la formation minime lors de l'étape désorption/ionisation laser (λ = 355 nm) mise en œuvre durant les analyses MALDI/FTICRMS. La détection du pic m/z = 303, correspondant à l'endopéroxyde protoné intermédiaire, appuie le fait que nous avons bien une faible proportion d'o-BB formé.



Figure III.30 – Spectres cumulés (10 impacts à 10 endroits différents) MALDI/FTICRMS du mélange DPBF (10⁻³ mol/L) / m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol (a) avant irradiation laser et (b) après irradiation laser (650 nm, 300 mW).

En résumé, avant illumination laser, les études menées à la fois par GC/ITMS et par MALDI/FTICRMS indiquent que nous sommes bien en présence de DPBF et de m-THPC, grâce notamment aux empreintes spectrales spécifiques à ces deux composés.

Après 60 minutes d'illumination laser ($\lambda = 650$ nm) du mélange (DPBF/m-THPC), nous voyons (figure III.29) <u>disparaître totalement</u> le pic chromatographique relatif à la DPBF

($t_R = 32,2 \text{ min}$) avec l'apparition d'un pic à un temps de rétention $t_R = 29,9 \text{ min}$, caractéristique de l'o-BB. Remarque : la disparité entre les intensités et les aires des deux pics chromatographiques avant et après illumination laser à 650 nm peut être due au fait que le volume injecté n'a pas été totalement le même dans les deux cas car la phase d'injection a été faite manuellement. En ce qui concerne les analyses par MALDI/FTICRMS, nous remarquons la disparition du pic moléculaire [DPBF]^{•+} (m/z = 270) et une augmentation du pic m/z = 325, relatif à [o-BB+K]⁺ (figure III.30b). Remarquons également que l'intensité du pic m/z = 287 relatif à l'espèce [o-BB+H]⁺ est plus importante avant illumination laser (figure III.30a) comparée à celle tracée lors des analyses de la DPBF standard (Cf. figure III.25a page 88). Cela est en accord avec la présence du photosensibilisant favorisant la production d'oxygène singulet et par la même l'augmentation de la proportion en o-BB. De plus, il semblerait qu'un seul impact laser lors de l'analyse MALDI contribue à la phototransfromation de la DPBF en o-BB, et ce d'autant plus efficacement qu'il y a présence de m-THPC.

Compte tenu du fait qu'il existe deux mécanismes principaux intervenant dans les processus de thérapie photodynamique, à savoir un mécanisme de type I (via des réactions radicalaires) et un mécanisme de type II (via la formation d'oxygène moléculaire singulet ¹O₂), nous avons mis en évidence par ces deux techniques complémentaires que sont la GC/ITMS et le MALDI/FTICRMS, que la molécule 1,3 diphénylisobenzofurane est bien une sonde permettant la détection in situ de l'oxygène moléculaire singulet via la formation de l'o-BB. Ces résultats nous indiquent clairement que la phototransformation de la molécule de DPBF en o-BB en solution ne peut se faire qu'en présence du photosensibilisant m-THPC qui joue donc un rôle majeur dans ce processus.

2.3.3 Analyses du mélange DPBF/m-THPC en solution éthanolique standard, oxygénée et appauvrie en oxygène

Après avoir mené à bien la caractérisation des composés diphénylisobenzofurane (DPBF) et orthodibenzoylbenzène (o-BB) par spectrométrie de masse, GC/ITMS et MALDI/FTICRMS en milieu organique (éthanol) avant et après illumination laser en présence de la m-THPC, nous allons montrer que l'oxygène moléculaire dissous dans la solution éthanolique joue un rôle dans l'apparition de l'espèce réactive ${}^{1}O_{2}$.

Il est toutefois important de noter que ces travaux constituent une toute première approche et en tant que tel demanderont à être approfondis par la suite.

Ainsi, un montage permettant - via un barbotage en oxygène (oxygène 5.0, Prodair) ou en argon (Argon U, Air Liquide) - d'enrichir ou d'appauvrir en oxygène le mélange DPBF (10⁻³ mol/L)/m-THPC (10⁻⁵ mol/L) a été mis ou point. Après avoir pesé la masse exacte de m-THPC (0,68 mg), celle-ci est placée dans un ballon 3 cols (250 mL) à tubulure latérale inclinée. Ce dernier est placé en fin de chaîne à distiller. Sur l'une des tubulures est placée une seringue qui permettra de recueillir la solution alors que par l'autre est engagé le capillaire permettant l'insufflation du gaz oxygène ou argon. Cette dernière est active dès le début de la distillation des 100 mL d'éthanol. Enfin, la quantité de DPBF est ajoutée à la solution éthanolique de m-THPC et le barbotage est reconduit pendant trente minutes.

Les études ont ainsi porté sur trois milieux à savoir une solution DPBF/m-THPC oxygénée, une autre appauvrie en oxygène et enfin une troisième laissée dans les conditions standard (température et pression ambiante, solvant n'ayant pas subi de barbotage).



Figure III.31 – Evolution de l'apparition d'o-BB par GC/ITMS après illumination laser (650 nm, 300 mW) du mélange DPBF (10⁻³ mol/L) / m-THPC (10⁻⁵ mol/L) dans l'éthanol.

Les analyses ont tout d'abord été effectuées par GC/ITMS en relevant l'évolution du rapport aire pic o-BB/ (aire pic o-BB + aire pic DPBF) en fonction du temps d'illumination laser (650 nm, 300 mW) des différentes solutions du mélange DPBF (10^{-3} mol/L)/m-THPC (10^{-5} mol/L) (figure III.31).

Il est important de noter que chacun des points qui apparaissent sur les courbes correspond à des solutions distinctes. Nous voyons clairement que l'apparition de l'o-BB est dépendante de la teneur en oxygène dissous dans la solution. En effet, alors que celle-ci est quasi-identique pour les deux solutions en milieu aéré et oxygéné, nous voyons qu'elle est minimisée lorsque la solution a subi un dégazage à l'argon. Il est à noter que l'apparition optimale de l'o-BB est effective pour un temps d'irradiation relativement court. En effet, ces courbes montrent la formation d'une zone en plateau à partir de 120 s pour chacune des trois conditions d'oxygénation (standard, enrichie en oxygène et dégazée sous flux d'argon). Ce temps d'illumination à 120 s correspond à un temps effectif égal à 14,4 μ s. Ainsi, en ce qui concerne les résultats concernant les analyses effectuées sous flux d'argon, ce temps de 14,4 μ s correspondrait à la « consommation » totale de l'oxygène moléculaire singulet 1O_2 par la réaction faisant intervenir la sonde moléculaire DPBF :

$$PS(^{3}T_{1})+^{3}O_{2} \rightarrow PS(^{1}S_{0})+^{1}O_{2}$$

$$DPBF+^{1}O_{2} \rightarrow o - BB$$
(II)

(PS : Photosensibilisant)

Compte tenu de la concentration initiale en DPBF (10^{-3} mol/L) et en formulant l'hypothèse selon laquelle la réaction de formation de l'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$ est totale **(I)**. Il convient de préciser que le protocole d'appauvrissement en oxygène (barbotage à l'argon) ne semble pas éliminer totalement l'oxygène moléculaire dissous.

Afin d'apporter des informations supplémentaires quant à la présence d'o-BB dans les solutions, nous avons étudié par MALDI/FTICRMS les mélanges DPBF/m-THPC en milieu standard et sous argon illuminés pendant 60 secondes à 650 nm. Nous remarquons sur le spectre de masse (figure III.32a) concernant le milieu argon la présence du pic de masse $[DPBF]^{+}$ (m/z = 270), et m/z = 287 relatif à l'espèce ionisée [o-BB+H]⁺. De plus, par la méthode interne de calibration, il s'avère que le pic de masse m/z = 309 est relatif à l'espèce [o-BB+Na]⁺ et non pas $[DPBF+K]^{+}$. Nous remarquons également la présence des pics de

masse m/z = 681 et m/z = 742 correspondant respectivement à $[m-THPC+H]^+$ et $[m-THPC+Zn-2H]^+$.

En ce qui concerne les études sur la solution en milieu standard (figure III.32b), nous voyons nettement une augmentation de l'intensité du pic m/z = 325 attribué à $[o-BB+K]^+$. De plus, il y a disparition du pic relatif à la DPBF (m/z = 270) avec la présence à nouveau du pic de masse m/z = 309 correspondant à $[o-BB+Na]^+$. Nous observons comme précédemment les pics de masse relatifs à $[m-THPC+H]^+$ et $[m-THPC+Zn-2H]^+$ à m/z = 681 et m/z = 742.

Ainsi, les analyses de ces deux solutions par MALDI/FTICRMS permettent de corroborer celles effectuées par GC/ITMS quant à la présence de l'o-BB en solution et ce de manière plus qualificatif, notamment avec la présence du pic $m/z = 270 [DPBF]^{*+}$ et $m/z = 325 [o-BB+K]^{+}$.



Figure III.32 – Spectres MALDI/FTICRMS du mélange DPBF (10⁻³ mol/L) / m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en milieu sous (a) argon et (b) standard au bout de 60 s d'illumination laser à 650 nm.

Cet ensemble de mesures nous permet de conclure que la présence à la fois d'oxygène dissous dans la solution et d'un photosensibilisant est nécessaire afin de former l'o-BB par transformation du DPBF.

2.3.4 Conclusion

Outre les techniques directes spécifiques de caractérisation de l'oxygène moléculaire singulet, nous avons montré par cette étude la possibilité de détection de façon indirecte de cette espèce oxygénée réactive via une sonde moléculaire spécifique : le 1,3-diphénylisobenzofurane
(DPBF). En effet, il est possible grâce à la spectrométrie de masse MALDI/FTICRMS et GC/ITMS de caractériser le produit final de la photooxydation du DPBF à savoir l'orthodibenzoylbenzène (o-BB). La méthode MALDI/FTICRMS ouvre des possibilités importantes notamment en ce qui concerne la détection de l'oxygène singulet au sein de milieux plus complexes tel que le milieu aqueux avec ou sans protéines ou les systèmes biologiques. La solution m-THPC (10^{-5} mol/L) / DPBF (10^{-3} mol/L) sur laquelle a été appliqué un barbottage à l'argon pendant 30 minutes montre une photooxydation de la DPBF en o-BB 20,6 % plus faible que dans les conditions standard. Cette expérience conforte le fait que la sonde DPBF est bien spécifique à la présence d'oxygène singulet dans les solutions analysées.

3 Référence

- 1. Jones RM, Wang Q, Lamb JH, Djebal BD, Bonnett R, Lim K, J. Chromatogr. A, 722, 257, 1996.
- 2. Kampmeier J, Dreisewerd K, Schürenberg M, Strupat K, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 169-170, 31, 1997.
- 3. Strupat K, Kampmeier J, Horneffer V, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 169-170, 43, 1997.
- 4. Bahr U, Stahl-Zeng J, Gleitsmann E, Karas M, J. Mass Spectrom., 32, 1111, 1997.
- 5. Angotti M, Maunit B, Muller JF, Bezdetnaya L, Guillemin, F, Rapid Commun. Mass Spectrom., 13, 597, 1999.
- Ris HB, Altermatt HJ, Nachbur B, Stewart JCM, Wang Q, Lim CK, Bonnet R, Althaus U, Int. J. Cancer, 53, 141, 1993.
- 7. Rovers PR, de Jode ML, Rezzoug H, Grahn MF, Photochem. Photobiol., 72: 358, 2000.
- 8. Zhan Q, Voumard R, Zenobi R, Anal. Chem., 66, 3259, 1994.
- 9. Vandell VE, Limbach PA, J. Mass Spectrom., 33, 212, 1998.
- 10. Dale MJ, Costello KF, Jones AC, Langridge-Smith PRR, J. Mass Spectrom., 31, 590, 1996.
- 11. Oelckers S, Ziegler T, Michler I, Röder B, J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 53, 121, 1999.
- 12. Weldon D, Ogilby PR, J. Am. Chem. Soc. , 120, 12978, 1998.
- Amat-Guerri F, Lempe E, Lissi EA, Rodriguez FJ, Trull FR, J. Photochem. Photobiol., A: Chem., 93, 49, 1996.
- 14. Hadjur C, Lange N, Rebstein J, Monnier P, Van den Bergh H, Wagnières G, J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 45, 170, 1998.
- 15. Reddi E, Valduga G, Rodgers MAJ, Jori G, Photochem. Photobiol., 54, 63, 1991.
- 16. Fukuzawa K, Matsuura K, Tokumura A, Suzuki A, Terao J, Free Radical Biology and Medecine, 22, 923, 1997.

CHAPITRE IV

DESHYDROGENATION DES PHOTOSENSIBILISANTS EN MILIEU AQUEUX ET PHYSIOLOGIQUE

CHAPITRE IV

DESHYDROGENATION DES PHOTOSENSIBILISANTS EN MILIEU AQUEUX ET PHYSIOLOGIQUE

L'objectif principal de notre travail est d'étudier le comportement des photosensibilisants (m-THPC et m-THPBC) en milieu cellulaire. Dans ce but, nous avons analysé ces deux molécules en milieu aqueux avant et après traitement laser. Mais comme nous l'avons vu précédemment, ces deux photosensibilisants sont insolubles dans l'eau. C'est la raison pour laquelle il faut solubiliser en premier lieu ces composés en milieu éthanolique puis diluer la solution dans de l'eau en proportion variable.

Ainsi, la première partie de notre travail a consisté à évaluer le comportement de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau lorsqu'elle était en solution dans un mélange éthanol/eau.

Puis nous avons prolongé nos travaux vers l'étude de la phototransformation de la m-THPC et de la m-THPBC en solution dans un mélange éthanol/eau avec deux gradients l'un était 24:76 v/v de et l'autre de 1:99 v/v.

Enfin, nous avons étudié l'influence de milieu physiologique en présence ou non de protéines sur la phototransformation de nos deux agents thérapeutiques. Pour cela, les solutions stocks dans l'éthanol des deux photosensibilisants ont été dilués dans un tampon physiologique, le « Phosphate Buffer Saline » (PBS). Le gradient éthanol/PBS était de 1:99 v/v. L'influence due aux protéines a été étudiée en rajoutant au mélange précédent du sérum de veau fœtal (SVF) avec un pourcentage compris entre 0 et 2 % v/v.

99

1 Comportement de la m-THPC en milieu aqueux : en solution dans un mélange éthanol/eau

Les résultats des analyses liés au comportement du spectre ultraviolet/visible de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau ont montré peu de changement dans l'allure générale du spectre entre 100 et 30 % en éthanol contenu dans le mélange (figure IV.1). Mais lorsque la quantité d'éthanol dans le mélange passe sous les 30 %, la bande de Soret subit un effet bathochrome. Un effet hypochromique et un élargissement de ces bandes sont aussi observés sur la figure IV.1 lorsque la proportion d'eau augmente. Il semble y avoir un effet de désolvatation de la molécule de 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine (m-THPC) lié à son caractère hydrophobe.



Figure IV.1 – Variation du spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau (de 100:0 à 10:90, v/v).

Une étude plus précise du gradient éthanol/eau entre 30 et 20 % en éthanol contenu dans le mélange (figure IV.2a) montre une phase de transition entre ces deux pourcentages. Ceci est confirmé si nous observons l'évolution du coefficient d'absorption molaire du maximum de la bande de Soret se situant à 416 nm en fonction du gradient éthanol/eau. Ainsi la figure IV.2b montre une allure sigmoïdale caractéristique d'un changement d'état de la solution. En effet, la littérature associe ce comportement au passage d'un état monomérique du photosensibilisant en milieu organique à un état agrégé en milieu aqueux¹. Plusieurs hypothèses ont été avancées ces dernières années sur la structure des photosensibilisants en milieux aqueux. Streckyte et coll.² ont parlé d'un équilibre entre les monomères et les formes agrégées pour le cas de l'hématoporphyrine et le dimethoxyhématoporphyrine. Tandis que

Rotomkis, lui, a avancé l'hypothèse de structures linéaires de porphyrines liées par covalence éther/ester et/ou carbone/carbone³. Et dans le cas du Photofrin II, ce serait des sandwichs liés par covalence qui entreraient en jeu⁴. De plus, nous avons constaté un changement de couleur de la solution avec l'augmentation de la proportion en eau, celle-ci passant de la couleur violette dans l'éthanol seul à la couleur jaune dans le mélange éthanol/eau. Ce changement peut s'expliquer une nouvelle fois par un phénomène de désolvatation de la molécule de m-THPC. Ce qui donne lieu à la formation de nanoparticules constituées de plusieurs molécules de m-THPC, qui vont diffuser la lumière, et ainsi entraîner un élargissement de la bande de Soret, une baisse et un effet bathochrome sur le maximum d'absorption de cette dernière (tableau IV.1).

Gradient éthanol/eau	λ_{max} Bande de Soret	Absorbance
100/0	416,83 nm	1,8009
30/70	416,28 nm	1,9175
29/71	416,31 nm	1,8743
28/72	416,32 nm	1,7835
27/73	416,34 nm	1,4033
26/74	416,56 nm	1,1337
25/75	417,17 nm	1,0007
24/76	423,43 nm	0,9706
23/77	426,25 nm	0,9012
22/78	428,50 nm	0,8287
21/79	430,66 nm	0,8818
20/80	430,61 nm	0,7883

Tableau II.1 - Variation du maximum de la bande de Soret de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau.

Lors des analyses en MALDI/FTICRMS pour les différents gradients éthanol/eau, nous avons constaté que le photosensibilisant est toujours caractérisé par son pic moléculaire protoné correspondant à l'espèce ionique [m-THPC+H]⁺ à la masse m/z = 681. Mais aussi l'apparition progressive d'un signal à m/z = 697 que nous avons identifié comme étant le pic de l'espèce protoné monohydroxy-m-THPC. Ceci a été obtenu en comparant la masse calculée théoriquement m/z_{calculée} = 697,24455 et la masse mesurée m/z_{mesurée} = 697,26380 du signal détecté correspondant à l'ion [m-THPC+OH]⁺.

Les éventuelles formes agrégées (dimère, trimère, ...) de la m-THPC n'ont jamais été décelées lors des analyses par MALDI/FTICRMS des solutions éthanol/eau.

Au vu de ces résultats, nous avons décidé d'étudier le cas où la m-THPC se situe sur la zone de transition de la courbe de la figure IV.2b. C'est-à-dire pour une solution de photosensibilisant avec un gradient éthanol/eau de 24:76 v/v. Une solution de m-THPC dans ces conditions de solvatation $(1,02\ 10^{-5}\ mol/L)$ a donc été irradiée par un laser à la longueur d'onde de 650 nm. Celle-ci a fait l'objet d'une analyse par spectrophotométrie ultraviolet/visible et par MALDI/FTICRMS avant et après illumination laser.



Figure IV.2 – (a) Variation du spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau (de 30:70 à 20:80, v/v) ; (b) Variation du coefficient d'extinction molaire à λ = 416 nm de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau (de 30:70 à 20:80, v/v).

Le spectre MALDI/FTICRMS avant traitement laser (figure IV.3b) montre les pics caractéristiques de la m-THPC en solution dans un mélange éthanol/eau. En effet, nous pouvons observer le pic à m/z = 681 ainsi que sa distribution isotopique correspondant à l'ion [m-THPC+H]⁺, mais aussi le pic à la masse m/z = 697 correspondant à l'espèce [m-THPC+OH]⁺. La figure IV.3a, qui correspond aux mesures d'absorption ultraviolet/visible avant et après l'illumination laser de la solution de m-THPC dans le mélange éthanol/eau 24:76 v/v, procure deux informations importantes. La première concerne la photodégradation de la m-THPC caractérisée par la baisse de l'intensité de sa bande d'absorption caractéristique à 653 nm dans ce solvant, gage de la baisse de la concentration de m-THPC en solution. La seconde concerne la phototransformation de la m-THPC caractérisée par le changement d'aspect de la bande de Soret (baisse d'intensité et rétrécissement de la largeur de bande à mihauteur). En effet, la bande de Soret sur le spectre est liée à la présence de cycles tetrapyrroliques en solution, son changement d'aspect peut être associé à un changement de la configuration de la molécule de m-THPC.

L'analyse par MALDI/FTICRMS de la solution après illumination laser à 650 nm a permis de valider ces informations. En effet, le spectre de masse nous montre la baisse du signal de l'ion $[m-THPC+H]^+$ qui met en évidence la photodégradation du photosensibilisant. L'apparition d'un nouveau pic autour de la masse m/z = 713, dont nous avons discuté la nature dans le chapitre précédent, met dans ce cas précis en évidence la formation de photoproduits. De plus, l'observation d'une hausse du signal à la masse m/z = 679 permet d'associer cette espèce à la déshydrogénation de la m-THPC. La nature de l'espèce liée à l'apparition de ce signal sera discutée plus en détail dans la suite de ce chapitre.



Figure IV.3 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (24:76, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min) ; Spectres
MALDI/FTICRMS de la m-THPC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (24:76, v/v) (λ = 355 nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (b) avant illumination laser; (c) après l'illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min).

La complémentarité de la technique MALDI/FTICRMS et de la spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible a permis de suivre et de mettre en évidence deux phénomènes suite à l'illumination laser à 650 nm de la m-THPC en solution dans un mélange éthanol/eau 24:76 v/v: la photodégradation de la m-THPC qui est caractérisée par la baisse de sa bande d'absorption caractéristiques à 650 nm et par la baisse d'intensité du signal à la masse

m/z = 681 et la formation de photoproduits qui est liée à l'apparition de nouveaux pics de masses (m/z = 679 et m/z = 713) avec un changement d'aspect de la bande de Soret.

2 Phototransformation de la m-THPC en solution dans un mélange éthanol/eau (1 : 99, v/v)⁵

Le milieu biologique est essentiellement constitué d'eau, c'est pourquoi notre étude sur le comportement de la m-THPC en milieu aqueux s'est orientée vers un mélange éthanol/eau avec un gradient de 1:99 v/v.

Le spectre d'absorption ultraviolet/visible (figure IV.4a), obtenu pour une solution de m-THPC à 10⁻⁵ mol/L, montre un déplacement de la bande de Soret et de son épaulement vers les hautes longueurs d'onde par rapport au milieu organique (éthanol), respectivement à 432 nm et 408 nm. Les Q-bandes ont aussi subi un effet bathochrome, leur maximum se situant à 525, 553, 600 et 653 nm. Mais la bande caractéristique de la m-THPC dans la région spectrale du rouge (653 nm) reste la plus intense, ce qui reste un atout majeur en vue de son illumination laser à 650 nm.

L'illumination laser de la solution de m-THPC a entraîné la disparition complète de l'épaulement de la bande de Soret à 408 nm, tandis que son maximum d'absorption a subi une réduction de 11 %. Tandis que nous pouvons observer une baisse significative de l'intensité de la bande d'absorption à 653 nm (61 %).

Les analyses menées en parallèle par MALDI/FTICRMS (figure IV.4b) sur la m-THPC en solution dans le mélange éthanol/eau (1:99; v/v) montrent que le photosensibilisant est caractérisé par un pic prédominant à la masse m/z = 681 (intensité 1120) correspondant à l'ion [m-THPC+H]⁺. Le spectre de masse obtenu contient aussi les signaux à m/z = 680 de faible intensité correspondant au pic moléculaire [m-THPC]^{•+}, ainsi qu'un groupe de pics autour de la masse m/z = 697 (intensité 50) attribué à l'ion [m-THPC+OH]⁺ qui correspond au monohydroxy-m-THPC. Les changements sur le spectre MALDI/FTICRMS suite à l'illumination laser de la solution de m-THPC sont reportés sur la figure IV.4c et sont caractérisés par une baisse de 50 % de l'intensité du signal caractéristique de notre composé à m/z = 681. De plus, nous pouvons observer sur ce même spectre de masse, une évolution de

l'intensité des pics autour de m/z = 697 (intensité 100) et une augmentation significative de l'intensité du signal à m/z =679. Il faut noter aussi la présence des pics à m/z = 695 et m/z = 696 liés à l'apparition du signal à m/z = 679.



Figure IV.4 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/ eau (1:99, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min) ; spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (λ = 355 nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (b) avant illumination laser; (c) immédiatement après l'illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min).

L'apparition du groupe de pics autour de la masse m/z = 713 que nous avions observé précédemment et identifié comme pouvant être le dihydroxy-m-THPC (cf. Ch.III § 3)⁶. Cette photohydroxylation de la m-THPC serait favorisée par la forte proportion en eau présente dans la solution. Le spectre de masse montre aussi la présence des pics 711 et 712 liés à l'apparition du signal m/z = 679 (figure IV.4c).

Ces résultats sont similaires à ceux obtenus par Blais et coll.⁷, mais toutefois dans des conditions expérimentales différentes. En effet, leur étude portait sur la photodégradation de la m-THPC dans un mélange éthanol/eau 50:50 v/v (0,2 mg/mL) suite à une illumination laser en continu à 514 nm (laser à argon). L'analyse des solutions avant et après illumination a été

effectuée par MALDI/TOFMS après une séparation par HPLC. Ainsi, ils ont mis en évidence la photohydroxylation de la m-THPC par la détection des pics de masses correspondant au espèces du monohydroxy-m-THPC, du dihydroxy-m-THPC et du trihydroxy-m-THPC. Ce qui est en accord total avec nos résultats. Les spectres ultraviolet/visible des pics chromatographiques ont la même distribution des Q-bandes de la m-THPC.

Les résultats observés par spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et par spectrométrie de masse indiquent que nous sommes en présence de deux processus. Le premier est la photodégradation de la m-THPC caractérisée par la baisse de l'absorbance à 653 nm et du signal à m/z = 681, ce qui prouve la disparition de la molécule de départ. Le second est la phototransformation de la m-THPC lié à l'apparition et l'évolution de plusieurs pics de masse, ce qui prouve la modification de la molécule de base.

La figure IV.5 montre l'évolution du rapport de l'intensité du signal à m/z = 679 sur l'intensité du signal à m/z = 681 en fonction du temps d'illumination laser de la solution de m-THPC dans le mélange éthanol/eau (1:99, v/v). Nous avons ainsi pu observer la cinétique d'apparition du photoproduit en faisant varier le temps entre 10 et 60 minutes d'irradiation laser, par l'augmentation linéaire du rapport I_{679}/I_{681} . Celle-ci indique que la photodégradation de la m-THPC est directement liée à l'apparition du signal m/z = 679 par le caractère linéaire de sa cinétique.



Figure IV.5 – Etude en MALDI/FTICRMS : évolution du rapport I_{679}/I_{681} en fonction du temps d'illumination laser de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v).

Deux hypothèses sont envisageables quant à la nature du photoproduit, dont la masse est m/z = 679, la première serait une déshydrogénation de la m-THPC, la seconde serait une déshydratation du monohydroxy-m-THPC. Mais nous pouvons rejetée cette dernière car le signal autour de la masse m/z = 697 caractéristique du monohydroxy-m-THPC présente une

certaine stabilité tandis que celui à m/z = 679 devient majoritaire. Ceci ne prouve aucun lien entre l'évolution des deux pics de masse. En revanche, la déshydrogénation est une hypothèse solide. Nous avons identifié le signal m/z = 679 comme étant l'ion [m-THPP+H]⁺ grâce à la comparaison de la masse calculée théoriquement m/z_{calculée} = 679,23398 et la masse mesurée m/z_{mesurée} = 679,23444. La m-THPP formée est donc issue de la photooxydation de la m-THPC suite à son illumination laser. De plus, ceci est en accord avec les travaux de Lim et coll.^{8, 9}, qui avait déjà conclu à une déshydrogénation de la m-THPC suite à ses études en HPLC/ESI/MS.

Nous pouvons associer les signaux observés à m/z = 695 et m/z = 711 (figure IV.4c) respectivement au monohydroxy-m-THPP et au dihydroxy-m-THPP.

3 Phototransformation de la m-THPBC en solution dans un mélange éthanol/eau (1 : 99, v/v)⁵

Comme nous l'avons vu précédemment, la molécule de 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine (m-THPBC) possède deux doubles liaisons C=C et deux simples liaisons C-C en position $\beta\beta$ ' (cf. Ch.I § 3.1) sur le noyau pyrrolique. Une déshydrogénation de ce photosensibilisant est potentiellement envisageable suite à l'illumination laser de la m-THPBC en solution en milieu éthanol/eau (cf. Ch.IV § 2). Dans ce but, nous avons étudié le comportement de celle-ci dans des conditions de solvatation avant et après traitement laser. Mais dans un premier temps, nous nous étions intéressés à son comportement en milieu organique, dont nous allons décrire les principaux résultats.

3.1 Photodégradation de la m-THPBC en solution dans l'éthanol

Pour étudier le comportement de la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine (m-THPBC) en solution dans l'éthanol suite à une illumination laser, nous avons opté pour un protocole classique. Ce protocole consiste en une irradiation laser de la solution de photosensibilisant pendant une durée de 60 minutes avec une puissance laser de 300 mW (cf. Ch.II § 4.2). Chacune des deux étapes a fait l'objet d'analyses par spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et par MALDI/FTICRMS.

Les irradiations ont été effectuées sur des solutions éthanoliques contenant la bactériochlorine avec trois longueurs d'onde, qui correspondaient à une bande d'absorption du composé ou en étaient proche :

- 650 nm qui est obtenue grâce au colorant DCM pompé à 532 nm.
- 735 nm qui est obtenue grâce au colorant LDS 750 pompé à 532 nm.
- 532 nm qui correspond à la seconde harmonique du laser de pompage Nd-YAG.

Les résultats obtenus pour les trois longueurs d'onde sont sensiblement les mêmes, avec toutefois un effet photodynamique plus important à 735 nm. En effet, cette longueur d'onde correspond à une bande d'absorption intense de la m-THPC en solution dans l'éthanol (figure IV.6a).

Nous allons essentiellement décrire les résultats obtenus dans le cas de l'irradiation laser à 532 nm. La figure IV.6a montre l'évolution du spectre d'absorption ultraviolet/visible de la solution de bactériochlorine avant et après illumination laser à 532 nm. Nous y retrouvons les bandes d'absorption caractéristiques du photosensibilisant dans ces conditions de solvatation. L'irradiation laser de la solution a entraîné une baisse significative de chacune des trois régions d'absorption de la m-THPBC (figure IV.6a) et notamment une baisse de 62 % de la bande à 735 nm caractéristique de la concentration en m-THPBC dans la solution. Ces données spectrophotométriques mettent en évidence la photodégradation de la m-THPBC en solution dans un solvant anhydre (éthanol absolu bidistillé) par la baisse importante de toutes les bandes caractéristiques du photosensibilisant sans réelle apparition de nouvelles bandes. Ceci nous a été confirmé en MALDI/FTICRMS où nous avons juste observé sur les spectres de masse effectués après traitement laser (figure IV.6c) une baisse de 62 % des intensités des pics de masse caractéristiques de la m-THPBC ([m-THPBC]^{*+} = 682 et [m-THPBC-H]⁺ = 681 figure IV.6b) sans apparition de nouveaux signaux.

Nous notons aussi la présence et l'évolution du groupe de pic à la masse = 744 (figure IV.6b et IV.6c). En se référant, dans le chapitre précédent (cf. Ch.III § 2.2.1), au fait que la distribution en masse de ce groupe de pics est similaire à celle du complexe zinc/ bactériochlorine et que la synthèse de la bactériochlorine est liée à celle de la m-THPC

(cf. Ch.I § 3.3). Nous pouvons avancer l'hypothèse que le groupe de pics autour de la masse m/z = 744 correspond à l'ion [Zn-m-THPBC]^{•+}.



Figure IV.6 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPBC (0,95 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol (i) avant et (ii) après illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min) ; spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPBC (0,95 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol (λ = 355 nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (b) avant illumination laser; (c) immédiatement après l'illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min).

3.2 Phototransformation de la m-THPBC en milieu éthanol/eau

La figure IV.7 montre les spectres d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPBC en solution dans un mélange éthanol/eau (1:99, v/v) pour les trois étapes de notre protocole d'illumination laser. C'est-à-dire, avant traitement laser, après la première illumination laser à 532 nm et après la seconde illumination laser à 650 nm.

Avant irradiation laser, nous retrouvons les bandes caractéristiques de la m-THPBC à 357, 380, 525 et 739 nm. Il y a aussi un effet bathochrome subi par rapport à la solubilisation dans l'éthanol.

Après l'exposition laser à la longueur d'onde de 532 nm (figure IV.7), le spectre d'absorption ultraviolet/visible montre une baisse de 48 % par rapport à la valeur initiale du maximum de la bande d'absorption à 380 nm. De plus, une décroissance significative a été observée pour les bandes à 525 et 739 nm. Cette baisse en absorbance est associée en parallèle à l'apparition de deux nouvelles bandes d'absorption à 432 et 655 nm.

Considérant les résultats obtenus lors de la première irradiation de la m-THPBC en solution éthanol/eau, cette même solution a fait l'objet d'une seconde illumination laser à la longueur d'onde de 650 nm. Le spectre final (figure IV.7) est caractérisé par la disparition des bandes à 357 et 380 nm, mais aussi par la décroissance de l'absorbance aux longueurs d'onde 525, 655 et 739 nm. Ainsi, le spectre d'absorption ultraviolet/visible indique que la molécule de m-THPBC en solution dans l'éthanol/eau subit une phototransformation en deux étapes suite à son irradiation laser à 532 nm (une longueur d'onde qui correspond à une absorption de la m-THPBC) puis à 650 nm (une longueur d'onde qui correspond à une absorption de la m-THPPC).



Figure IV.7 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPBC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (i) avant illumination laser, (ii) après la première illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min), (ii) après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min).

Les analyses MALDI/FTICRMS ont été effectuées en utilisant 355 nm comme longueur d'onde pour l'ionisation laser. Or cette longueur d'onde correspond à une forte absorption de la molécule de m-THPBC. Ainsi, sous ces conditions, la solution de m-THPBC avant illumination laser est caractérisée par un spectre de masse (figure IV.8i) sur lequel il y a prédominance du pic moléculaire [m-THPBC]^{•+} à m/z = 682 (•). Un pic moins intense a aussi été observé à la masse m/z = 681 (•) correspondant à [m-THPBC-H]⁺. Nous retrouvons ici les mêmes résultats que dans le cas de la solution de m-THPBC dans l'éthanol (cf Ch.III § 1.4).

Le spectre MALDI/FTICRMS obtenu pour la solution de m-THPBC dans l'éthanol/eau après illumination laser à 532 nm (figure IV.8ii), montre une hausse significative de l'intensité du pic à la masse m/z = 681 qui est devenu majoritaire par rapport au pic à la masse m/z = 682. En corrélation avec les résultats obtenus en spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/ visible, nous pouvons avancer l'hypothèse suivante sur le processus de phototransformation de la m-THPBC : il semblerait que nous sommes en présence d'une déshydrogénation de la m-THPBC entraînant la formation de molécules de m-THPC via une photooxydation.

Pour valider cette hypothèse, une analyse sur la même solution (m-THPBC en solution dans un mélange éthanol/eau à 1,02 10^{-5} mol/L avant et après illumination laser à 532 nm) a été effectuée en utilisant la technique du MALDI/FTICRMS en haute résolution (figure IV.8 α et IV.8 β). Pour cela, nous avons utilisé un spectromètre de masse HiRes MALDI/FTICRMS (induction magnétique de 4,7 T) de la société Ion Spec (Irvine, Etats-Unis) afin d'améliorer la résolution en masse. Le processus MALDI est induit à l'aide d'un laser argon (337 nm). Les ions formés dans une source externe sont accélérés puis freinés avant d'être piégés dans la cellule d'analyse par un champ électrique et refroidis grâce un flux d'argon. L'avantage de cette configuration, c'est la source d'ionisation externe à l'appareil, qui conduit à un meilleur vide dans la cellule et permet une optimisation indépendante des paramètres d'ionisation et de détection durant les analyses en HiRes MALDI/FTICRMS.

		Masses	Masses	Erreur relative
Ion	Symbole	théoriques	expérimentales	$[(m_{\rm T} - m_{\rm E})/m_{\rm T}]*10^6$
	Figure 8	m _T	m _E	(ppm)
$[m-THPP+H]^+$	-	679,234	679,237	4,59
$[m-THPC+H]^+$	•	681,250	681,253	4,36
[m-THPBC] ^{•+}	•	682,257	682,257	0
Pics Satellites ¹³ C		683,261	683,262	2,18
		684,264	684,268	5,89
		685,268	685,273	8,14

Tableau IV.2 - Comparaison entre les masses théoriques et expérimentales obtenues par

HiRes MALDI/FTICRMS.

Le tableau IV.2 résume les résultats obtenus, ils sont similaires à ceux obtenus lors des analyses précédentes mais avec une meilleure résolution en masse. Grâce a celle-ci, l'identification de tous les ions détectés a été effectuée sans aucune ambiguïté. Ainsi, la molécule de m-THPBC ([m-THPBC]^{•+},m/z = 682,257) irradiée à 532 nm entraîne la formation de la m-THPC ([m-THPC+H]⁺,m/z = 681,253). Il est à noter la présence d'un signal à m/z = 679,237 qui a été identifié comme étant l'ion [m-THPP+H]⁺ (\blacksquare).



Figure IV.8 – Gauche : Spectre MALDI/FTICRMS (3,04 T) de la m-THPBC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (355 nm; 10⁷ W/cm²) : (i) avant illumination laser, (ii) après la première illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min), (ii) après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min). Droite : Spectre HiRes MALDI/FTICRMS (4,7 T) de la m-THPBC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (337 nm) : (i) avant illumination laser, (ii) après la première illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min).

L'irradiation laser à 650 nm de la solution de m-THPBC pré-irradiée à 532 nm, a entraîné l'augmentation du signal à la masse m/z = 679 ([m-THPP+H]⁺), qui correspond à la déshydrogénation de la molécule de m-THPC formée après la première illumination laser à 532 nm (figure IV.8iii). Ce résultat à été confirmé lors des analyses en HiRes MALDI/FTICRMS, dont le spectre de masse montre la présence de l'ion protoné de la m-THPP (\blacksquare) avec un signal à m/z = 679,237 (figure IV.8y).



Figure IV.9 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPP (1,03 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min) ; spectres
 MALDI/FTICRMS de la m-THPP (1,03 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (λ = 355 nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (b) avant illumination laser; (c) immédiatement après l'illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min).

Nous avons mené une série d'expérimentations en parallèle, durant lesquelles la m-THPP en solution dans le mélange éthanol/eau (1:99, v/v) a subi des illuminations laser à 532 nm (figure IV.9) et à 650 nm. Chacune de ces solutions a fait l'objet d'un suivi par spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et par MALDI/FTICRMS. Les résultats obtenus ont montré une baisse significative des bandes d'absorption caractéristiques de la m-THPP sans apparition de nouvelles bandes d'absorption ou de nouveaux pics de masse. Il

apparaît que la molécule de m-THPP est le point d'arrivée de la réaction de photooxydation de la m-THPBC. En effet, de part sa structure, la molécule de m-THPP ne peut pas subir une déshydrogénation¹⁰.

Les autres signaux observés en MALDI/FTICRMS (figure IV.8) qui correspondent aux masses m/z = 695 et m/z = 697 peuvent être attribués respectivement au monohydroxy-m-THPP et au monohydroxy-m-THPC.

En conclusion de cette partie, nous pouvons affirmer que la technique MALDI/FTICRMS s'est avérée être un outil très performant et complémentaire à la spectrophotométrie d'absorption, qui a permis d'obtenir un maximum d'informations sur l'identification des photoproduits issus du traitement laser de la m-THPBC en solution dans l'éthanol/eau. Chacune des étapes de la réaction de photopxydation de la m-THPBC a été caractérisée par l'identification précise du photoproduit obtenu :

$$\begin{bmatrix} m - \text{THPBC} \end{bmatrix}^{\bullet+} \xrightarrow{\lambda 532 \text{ nm}} \begin{bmatrix} m - \text{THPC} + \text{H} \end{bmatrix}^{+} \xrightarrow{\lambda 650 \text{ nm}} \begin{bmatrix} m - \text{THPP} + \text{H} \end{bmatrix}^{+} \\ m/z = 682,257 \xrightarrow{m/z} 681,252 \xrightarrow{m/z} 679,237$$

De plus, les résultats obtenus sont en accord avec la bibliographie qui fait état de la combinaison de deux processus prédominants, le mécanisme de déshydrogénation mentionné par Jones⁸ lors de ses travaux sur la photooxydation de la m-THPC analysée par HPLC/ESI/MS et l'hydroxylation de la m-THPC discutée dans plusieurs autres articles^{7, 8, 9}.

4 Etudes de la phototransformation de la m-THPC et de la m-THPBC en milieu physiologique⁵

Dans le but de simuler les conditions du milieu biologique, les molécules de m-THPC et de m-THPBC ont été mises en solution dans un milieu physiologique avec ou sans présence de protéines. Pour cela, nous avons utilisé un tampon physiologique (PBS, Phosphate Buffer Saline) avec ou sans ajout de sérum de veau fœtal (SVF). Nous avons aussi fait varier la proportion de SVF dans les solutions afin d'évaluer l'influence des protéines sur le comportement des photosensibilisants. Aucun changement significatif n'a été observé, les résultats étaient similaires avec ou sans SVF. La seule influence probante est un niveau de

détection des signaux caractéristiques des photosensibilisants plus faible lorsque la proportion de SVF augmente. Nous allons donc nous contenter de décrire les résultats obtenus dans le cas où les photosensibilisants étaient en solution dans le mélange éthanol/PBS (1:99, v/v) sans SVF qui nous procurent les spectres MALDI/FTICRMS possédant une meilleure résolution en masse et un bon rapport signal sur bruit. Mais, à titre d'information, la figure IV.12 montre les spectres de masse obtenus pour une solution de m-THPC dans un mélange éthanol/PBS/SVF 1/98,6/0,6 v/v/v.



Figure IV.10 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS (1:99, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min) ; spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS (1:99, v/v) (355 nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (b) avant illumination laser; (c) après l'illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min).

L'observation des spectres d'absorption ultraviolet/visible avant et après illumination laser à 650 nm de la solution de m-THPC (figure IV.10a) montre un comportement identique à celui observé en milieu éthanol/eau. C'est-à-dire un baisse de la bande caractéristique à 654 nm et le changement d'aspect de la bande de Soret. Concernant le cas de la m-THPBC en solution dans le mélange éthanol/PBS irradiée à 532 nm (figure IV.11a), nous retrouvons aussi une évolution similaire du spectre d'absorption ultraviolet/visible avec la diminution de l'intensité

des bandes d'absorption caractéristiques du photosensibilisant avec augmentation en parallèle des bandes à 655 nm et 440 nm.

Le spectre de masse de la m-THPC en solution dans le mélange éthanol/PBS (figure IV.10b) montre quatre groupes de pics que nous avons associés avec les ions suivants : $[m-THPC+H]^+$ à m/z = 681, $\varepsilon [m-THPC+OH]^+$ à m/z = 697, $\varepsilon [m-THPC+Na]^+$ à m/z = 703 et à $\varepsilon [m-THPC+K]^+$ à m/z = 719. Dans le cas de la m-THPBC, le spectre MALDI/FTICRMS contient la même famille d'ions avec une hausse de une à deux unités de masse (figure IV.11b). La détection de ces ions peut s'expliquer par un processus d'hydroxylation dû à la présence d'eau dans le solvant ou par la formation d'adduits de sodium et de potassium dus à la présence des sels composant le PBS.



Figure IV.11 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPBC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS (1:99, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min) ; spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPBC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS (1:99, v/v) (355 nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (b) avant illumination laser; (c) après l'illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min).

Le suivi du comportement des photosensibilisants après leur irradiation laser (650 nm pour la m-THPC et 532 nm pour la m-THPBC) par MALDI/FTICRMS montre que les changements

majeurs sont caractérisés par la hausse des signaux à m/z = 679 et m/z = 681, correspondant respectivement à la déshydrogénation de la m-THPC et de la m-THPBC (figure IV.10c et IV.11c). Concernant les autres masses détectées, seule la présence de traces de $[M+OH]^+$ ou de molécules cationisées a été observée, tandis qu'il faut noter l'absence du dihydroxy-m-THPC détecté dans les conditions de solubilisation dans l'éthanol⁶.



Figure IV.12 – Spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS/SVF (1:98,6:0,4 v/v/v) (355 nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (a) avant illumination laser; (b) après l'illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min).

Les illuminations laser sur les solutions de m-THPC et m-THPBC dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) ont conduit à la mise en évidence la déshydrogénation des deux photosensibilisants par le biais d'une réaction de photooxydation. En milieu physiologique (PBS avec ou sans SVF), nous avons détecté les mêmes espèces (figure IV.10, IV.11, IV.12) qui entrent en jeux dans la déshydrogénation de la m-THPC et de la m-THPBC. En effet, la technique MALDI/FTICRMS a permis la caractérisation et l'identification des signaux m/z = 679 et m/z = 681 caractéristiques de la phototransformation de la m-THPC et de la m-THPC et de la m-THPC et de la m-THPC et de la m-THPBC en milieu aqueux⁵. Ces résultats laissent à penser que le(s) mécanisme(s) de photoblanchiment des photosensibilisants (m-THPC et m-THPBC) dans les cellules et les tissus vivants durant la thérapie photodynamique seront vraisemblablement du même type.

5 Conclusion

Nos conditions d'analyse en MALDI/FTICRMS lors de l'étude du comportement de la m-THPC et de la m-THPBC en milieu éthanol/eau 1:99 v/v et en milieu PBS avec ou sans SVF, ont permis de mettre en évidence les points suivants :

- Avant illumination laser : la présence du mono-hydroxy-m-THPC et du mono-hydroxy-m-THPBC, mais aussi des ions cationisés [M+Na]⁺ et [M+K]⁺. Nous avons donc mis en évidence l'influence du milieu de solvatation.
- Après illumination laser : la détection de la m-THPP et de la m-THPC suite à l'irradiation laser respective de la m-THPC et de la m-THPBC, permet de dire que la déshydrogénation de ces deux photosensibilisants est le principal processus ayant lieu en milieu aqueux.

Suite à ces résultats, nous pouvons résumer les différentes étapes de la photooxydation de la m-THPBC comme suit :

 $m - THPBC \xrightarrow{h\nu} m - THPC \xrightarrow{h\nu} m - THPP \xrightarrow{h\nu} dégradation$

L'irradiation progressive de la solution de m-THPBC entraîne la formation de la m-THPC puis de la m-THPP par une réaction de photooxydation. La m-THPP ne pouvant pas subir une déshydrogénation de part la stabilité de sa structure. Cependant son irradiation laser prolongée devrait se traduire par la formation de petites molécules¹⁰.

6 Références

- 1. Belintchenko I, Melnikova V, Bezdetnaya L, Rezzoug H, Merlin JL, Potapenko A, Guillemin F, *Photochem. Photobiol.*, **67**, 584, 1998.
- 2. Streckyte G, Rotomskis R, J. Photochem. Photobiol., B : Biol., 18, 259, 1993.
- 3. Rotomskis R, Streckyte G, Didziapetriene J., Proc. SPIE, 2370, 73, 1995.
- 4. Streckyte G, Rotomskis R, Biology, 3, 26, 1993.
- 5. Angotti M, Maunit B, Muller JF, Bezdetnaya L, Guillemin, F, J. Mass Spectrom., 36, 825, 2001.
- 6. Angotti M, Maunit B, Muller JF, Bezdetnaya L, Guillemin, F, Rapid Commun. Mass Spectrom., 13, 597, 1999.
- 7. Kasselouri A, Bourdon O, Demore D, Blais JC, Prognon P, Bourg-Heckly G, Blais J., *Photochem. Photobiol.*, 70, 275, 1999.
- Jones RM, Wang Q, Lamb JH, Djebal BD, Bonnett R, Lim CK, J. Mass Chromatogr. A, 722, 257, 1996.
- 9. Cai H, Wang Q, Luo J, Lim CK, Biomed. Chromatogr., 13, 354, 1999.
- 10. Bonnett R, Chemical Aspects of Photodynamic Therapy, Ed. Gordon and Breach Science Publishers, 2000.

CHAPITRE V

COMPORTEMENT DE LA TEMOPORFIN (m-THPC) EN MILIEU BIOLOGIQUE

CHAPITRE V

COMPORTEMENT DE LA TEMOPORFIN (m-THPC) EN MILIEU BIOLOGIQUE

Ce chapitre va faire l'état des lieux d'un travail préliminaire visant à valider un protocole d'analyse des photosensibilisants en milieu biologique par MALDI/FTICRMS. L'étude a porté sur la caractérisation de la m-THPC mise en contact avec des plaquettes sanguines humaines ou thrombocytes. Nous avons porté notre choix sur celles-ci car elles sont dépourvues notamment de noyau cellulaire permettant ainsi d'appréhender le problème de caractérisation de la m-THPC et de ses photoproduits en milieu cellulaire de manière simplifiée. De plus, les travaux de Rezzoug¹ ont montré que la m-THPC se localise essentiellement au niveau cytoplasmique et de façon moindre au niveau du noyau. Le fait de travailler avec des plaquettes sanguines, cellules anucléées ne devrait donc en rien interférer sur l'incorporation et la fixation de la m-THPC au sein de celles-ci.

Après une description des plaquettes sanguines, nous nous intéresserons au protocole d'analyse directe par MALDI/FTICRMS et à son optimisation. Puis nous insisterons sur les principaux résultats obtenus lors de l'analyse de la m-THPC au sein des plaquettes sanguines.

1 Les plaquettes sanguines ou thrombocytes

Les plaquettes sont des cellules sans noyau du sang, provenant des mégacaryocytes de la moelle osseuse. Elles se présentent comme des cellules anucléées, biconvexes, circulaires ou ovalaires dont le diamètre se situe entre 1,5 et 4 μ m (figure V.1). Le taux de plaquettes dans le sang fluctue habituellement entre 150 000 et 400 000 plaquettes/ μ L. Leur rôle principal consiste à maintenir l'étanchéité des vaisseaux et intervient dans la formation du caillot. Les plaquettes participent donc à la lutte antihémorragique et constituent des sortes de « rustines » au niveau de la paroi lésée ou non du vaisseau sanguin. La destruction des plaquettes s'effectue dans la rate, le foie et peut-être les poumons, dont les macrophages éliminent des plaquettes, à la fois par vieillissement progressif et par destruction au hasard.



Figure V.1 – Photographie de plusieurs formes de plaquettes sanguines.

Le prélèvement des cellules, en particulier des plaquettes sanguines, s'effectue à partir de techniques automatiques que l'on nomme « séparateurs de cellules ». C'est en quelque sorte une « écrémeuse » qui sépare suivant le principe de la force centrifuge, sélectivement le plasma contenant les plaquettes sanguines des éléments figurés contenus dans le sang que sont les globules rouges. Tout est piloté automatiquement par un moniteur qui tient compte des paramètres du donneur. Le sang circule dans un dispositif plastique à usage unique qui sépare les plaquettes du sang total et renvoie le sang épuré au donneur. Pour avoir une dose thérapeutique, il faut disposer d'au moins 400 milliards de plaquettes dans la poche de recueil. Chaque poche contient un anticoagulant (citrate-phosphate de dextrose) qui évite la coagulation des plaquettes jusqu'à cinq jours avant d'administrer les plaquettes à un patient.

Durant la période de survie des plaquettes, celles-ci sont conservées sous certaines conditions pour éviter leur coagulation. Les plaquettes doivent être en mouvement continu et la température maintenue entre 20 et 24 °C. Dans ce but, nous plaçons la pochette de cellules dans un bain thermostaté qui se situe sur un oscillateur pendulaire (2 oscillations par minute) doté d'un contrôle automatique de la température.

2 Protocole d'analyse des solutions de plaquettes sanguines par MALDI/FTICRMS

La partie préliminaire de nos travaux a porté sur la mise au point du protocole d'échantillonnage adéquat afin d'analyser les thrombocytes par MALDI/FTICRMS. Ce protocole s'articule autour de trois axes : la préparation des solutions contenant les plaquettes sanguines, la mise en contact de cette solution avec le photosensibilisant m-THPC et la préparation de l'échantillon en vue de son analyse via la technique MALDI/FTICRMS.

2.1 Préparation des plaquettes sanguines

Le plasma, partie liquide du sang dans laquelle se trouvent notamment les plaquettes, est constitué également de substances azotées (albumine, globulines, ...), de lipides, de glucides, d'éléments minéraux et divers métabolites. Il faut donc séparer les plaquettes sanguines du plasma afin de travailler dans des conditions optimales car la présence du plasma influence également l'incorporation du photosensibilisant au sein des cellules^{2, 3}. Cette séparation s'effectue par centrifugations successives. Dans ce but, nous prélevons 1 mL de concentré plaquetaire placé dans un microtube (1,5 mL) puis centrifugé durant 15 minutes à 5000 tours/min. Après avoir retiré le surnageant, un rinçage du culot obtenu avec 1 mL de PBS est effectué. Une seconde centrifugation est alors effectuée dans les mêmes conditions (5000 tours/min durant 15 minutes). Celle-ci terminée, il faut une nouvelle fois retirer le surnageant avant de remettre en suspension le culot obtenu dans 1 mL de PBS, cette préparation constituant la solution « stock » de plaquettes sanguines.

2.2 Mise en contact avec le photosensibilisant

Une solution de 1,5 mL a été préparée en prélevant 150 μ L de la solution « stock » de plaquettes sanguines auxquelles ont été ajoutés 15 μ L de la solution « stock » de m-THPC à 10⁻³ mol/L dans l'éthanol. En final, le complément est obtenu par ajout de 1335 μ L de tampon PBS.

Nous obtenons ainsi une solution laissée au repos pendant 30 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Le protocole de mise en contact cellulaire a été validé après une série d'études préliminaires. En effet, des mesures de fluorescence des solutions de m-THPC/ plaquettes sanguines ont été effectuées en fonction de la température et de la durée de mise en contact. Elles ont montré qu'il n'était pas nécessaire d'utiliser un incubateur thermostaté à 37 °C.

La figure V.2 montre, pour la solution dans laquelle le culot est remis en suspension dans le PBS après mise en contact des plaquettes avec la m-THPC pendant 30 minutes, la bande de fluorescence caractéristique de la m-THPC à 655 nm. Ceci tend à indiquer qu'il y a bien eu un transfert de m-THPC du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire des plaquettes sanguines. De plus, la fluorescence du surnageant est moins importante que celle du mélange m-THPC/plaquettes sanguines.



Figure V.2 – Spectre de fluorescence (λ_{exc} =415 nm) (i) du mélange m-THPC/plaquettes sanguines en solution dans le PBS, (ii) du culot issu de la centrifugation remis en suspension dans 1,5 mL de PBS, (iii) du surnageant après une centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min).

Le nombre d'étapes de centrifugation et de remise en suspension des plaquettes sanguines contenant le photosensibilisant dans le tampon PBS a lui aussi fait l'objet d'une étude systématique par spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible (figure V.3). Le spectre obtenu sur le surnageant retiré après une première centrifugation montre les bandes d'absorption caractéristiques de la m-THPC. Les analyses correspondant au surnageant retiré après la seconde centrifugation montrent une diminution de l'intensité de toutes les bandes d'absorption. Ceci indique donc une présence minime de m-THPC dans le surnageant. Une seule étape de centrifugation et de remise en suspension dans le tampon PBS est nécessaire à la préparation des solutions de plaquettes sanguines contenant la m-THPC.



Figure V.3 – Spectre d'absorption ultraviolet/visible (i) du mélange m-THPC/plaquettes sanguines en solution dans le PBS, (ii) du surnageant après la première centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min), (iii) du surnageant après la seconde centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min).

Ces études préliminaires ont été nécessaires pour la mise en œuvre du protocole de traitement des cellules afin d'aboutir à une solution mère à l'intérieur de laquelle est localiée le photosensibilisant m-THPC. Les études sur l'efficacité des remises en solution des cellules sont également déterminantes car elles nous assurent que la m-THPC susceptible d'être caractérisée par MALDI/FTICRMS ne peut provenir que du milieu intracellulaire des plaquettes sanguines.

2.3 Echantillonnage MALDI/FTICRMS

En vue d'analyser le photosensibilisant incorporé au niveau des plaquettes sanguines en milieu physiologique PBS, nous avons adopté la méthode de préparation utilisé par Karty⁴ lors de ses études par MALDI/TOFMS sur des bactéries *E.Coli*. Elle consiste à déposer dans

Chapitre V : Comportement de la Temoporfin (m-THPC) en milieu biologique

un premier temps 6 μ L du mélange plaquettes sanguines/m-THPC remis en solution dans le PBS sur le porte échantillon. Celui-ci est ensuite placé sous un bêcher éclairé par une lampe qui va provoquer une hausse de la température ambiante et donc l'évaporation complète du solvant. Ainsi, nous obtenons un « film » composé de plaquettes sanguines contenant le photosensibilisant. Dans un second temps, 2 μ L de la solution contenant la matrice (2,5 DHB à 10⁻¹ mol/L solubilisée dans de l'eau bidistillée) sont déposés directement sur le film obtenu précédemment. Après une nouvelle évaporation du solvant, nous obtenons un film quasi homogène par co-cristallisation des plaquettes sanguines avec les molécules de matrice. Cette méthode d'échantillonnage conduit à un rapport signal sur bruit optimal et permet une étude précise des photoproduits susceptibles d'être présents au sein des cellules après illumination laser.



Figure V.4 – Photos des dépôts MALDI (a) des plaquettes sanguines, (b) des plaquettes sanguines avec la matrice (2,5 DHB), (c) des plaquettes sanguines avec la m-THPC et (d) des plaquettes sanguines avec la m-THPC et la matrice (2,5 DHB).

Nous pouvons observer le recouvrement des plaquettes sanguines avec ou sans présence de m-THPC par la matrice 2,5 DHB (figure V.4).

3 Caractérisation de la m-THPC au sein des plaquettes sanguines

La première partie de nos travaux a porté sur l'analyse des plaquettes sanguines non exposées à la m-THPC, afin d'établir par MALDI/FTICRMS l'empreinte spectrale caractéristique de celles-ci.

Les résultats obtenus indiquent d'une part des pics de masse spécifiques aux éléments potassium (m/z = 39), sodium (m/z = 23) et calcium (m/z = 40), et d'autre part deux familles de pics de masse entre m/z = 300 et m/z = 600 (figure V.5). En effet, le spectre MALDI/FTICRMS résultant de l'analyse des plaquettes sanguines non exposées à la m-THPC en solution dans le PBS montre deux groupes de pics : en premier lieu, nous observons les masses m/z = 349, 394, 438, 482, 526, 570 (en bleu) et en second lieu, nous observons les masses m/z = 368, 410, 454, 498 (en rouge). Il est à noter que dans les deux familles chacune des masses est séparée par 44 unités de masse avec, pour les deux familles en questions, une distribution en forme de gaussienne centrée sur m/z = 438 pour la première et sur m/z = 410 pour la seconde.

Dans un premier temps, cette distribution en masse a été attribuée à la présence d'un sucre tel que le dextrose, hypothèse confortée par le fait qu'une solution de citrate-phosphate de dextrose est utilisée comme anticoagulant lors de la confection des poches de thrombocytes durant leur prélèvement.



Figure V.5 – Spectre MALDI/FTICRMS de plaquettes sanguines non exposées à la m-THPC en solution dans le PBS.

Un fait important à noter est que le spectre de masse ci-dessus ne laisse apparaître aucun signal entre m/z = 650 et m/z = 750. Ceci est un point intéressant car cet intervalle de masse correspond à la fenêtre de détection en MALDI/FTICRMS des pics caractéristiques de la m-THPC (m/z = 681) ainsi que des photoproduits déjà détectés.

La seconde partie de notre travail a porté sur la caractérisation de la m-THPC en milieu biologique, c'est-à-dire lorsqu'elle est mise en contact avec les thrombocytes en milieu tampon PBS.

Notre protocole d'analyse schématisé à la figure V.6 s'articule autour de quatre étapes :

- (i) Analyse de la solution de plaquettes sanguines après mise en contact avec la m-THPC (solution I).
- (ii) Analyse du surnageant après centrifugation de la solution I précédente.
- (iii) Analyse de la solution contenant le culot remis en solution dans du PBS (solution II).
- (iv) Analyse de la solution II constituée des plaquettes sanguines après traitement laser à 650 nm (45 minutes, 100 mW).



Figure V.6 – Protocole expérimental d'analyse des plaquettes sanguines après mise en contact avec la m-THPC par spectrophotométrie ultraviolet/visible et par MALDI/FTICRMS.

Le spectre d'absorption ultraviolet/visible de la solution contenant le mélange m-THPC/plaquettes sanguines juste après la période de mise en contact (30 minutes à température ambiante à l'abri de la lumière), montre deux bandes liées à la présence de la m-THPC à savoir la bande de Soret à 425 nm ainsi que la bande caractéristique de la m-THPC à 653 nm (figure V.7i).

Après centrifugation de cette solution, l'analyse du surnageant (figure V.7ii) laisse apparaître le spectre classique de la m-THPC en solution dans le PBS, avec toutefois une diminution de l'intensité de la bande d'absorption située à 653 nm de 23 %. Nous observons aussi une exaltation de la bande de Soret, compte tenu qu'ici nous sommes en milieu PBS exempt de cellule.

Concernant l'analyse du culot « plaquettaire » après redissolution dans le tampon PBS (figure V.7iii), nous retrouvons un profil de spectre comparable à celui correspondant au mélange plaquettes sanguines/m-THPC. De plus, l'intensité de la bande d'absorption à 653 nm est égale à 38 % de celle correspondant au mélange de départ.

L'illumination laser (figure V.7iv) entraîne une baisse générale du spectre d'absorption avec en particulier une perte d'intensité de 60 % de la bande à 653 nm. Ainsi, cette diminution de la bande caractéristique de la m-THPC laisse présumer qu'il y a eu photodégradation de la molécule de m-THPC contenue dans les plaquettes sanguines au cours de l'illumination laser.



Figure V.7 – Spectre d'absorption ultraviolet/visible (i) du mélange m-THPC/plaquettes sanguines en solution dans le PBS, (ii) du surnageant après une centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min), du culot remis en solution dans 1,5 mL de PBS (iii) avant illumination laser et (iv) après illumination laser (650 nm, 100 mW).

L'analyse du culot « plaquettaire » remis en solution dans le PBS après centrifugation du mélange m-THPC/plaquettes sanguines avant illumination laser (figure V.8iii) laisse

apparaître les pics caractéristiques de la m-THPC à m/z = 681 correspondant à l'ion $[m-THPC+H]^+$ ainsi que la distribution isotopique (m/z = 682, 683 et 684). Ce qui est la preuve de la présence du photosensibilisant au sein des plaquettes sanguines. Il est à noter que la détection, bien que perturbée par la complexité de l'échantillon analysé à savoir les plaquettes sanguines, est tout à fait acceptable et permet de tirer des informations précises des spectres obtenus. Pour chacune des solutions analysées, les spectres n'indiquent pas la présence des signaux concernant les ions [m-THPC+OH]⁺, [m-THPC+Na]⁺ et [m-THPC+K]⁺ observés lors des études effectuées sur la m-THPC en solution dans le milieu physiologique (cf Ch.IV § 4).



Figure V.8 – Spectre MALDI/FTICRMS (i) du mélange m-THPC/plaquettes sanguines en solution dans le PBS,
(ii) du surnageant après une centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min), du culot remis en solution dans
1,5 mL de PBS (iii) avant illumination laser et (iv) après illumination laser (650 nm, 100 mW).

L'analyse de cette même solution après traitement laser à 650 nm procure un spectre MALDI/FTICRMS (figure V.8iv) sur lequel nous pouvons observer le pic à m/z = 681 prouvant la présence de m-THPC, mais aussi l'apparition du signal à m/z = 679 caractéristique du mécanisme de déshydrogénation du photosensibilisant. Nous sommes donc une nouvelle fois en présence d'une réaction de photooxydation de la m-THPC entraînant la

formation de m-THPP ($[m-THPP+H]^+$ à m/z = 679) suite à son illumination laser à 650 nm et ce au sein même des plaquettes sanguines.

La figure V.8 montre une intensité du pic caractéristique de la m-THPC à la masse m/z = 681 ([m-THPC+H]⁺) est dépendant de la résolution du spectre de masse.

4 Conclusions

Suite à des recherches préliminaires par spectrophotométrie ultraviolet/visible qui ont conduit à une optimisation de la mise en contact des cellules (thrombocytes) avec la m-THPC (30 minutes, température ambiante à l'abri de la lumière) et du protocole d'échantillonnage destiné à l'analyse par MALDI/FTICRMS, il a été démontré que cette technique permettait la mise en évidence sans ambiguïté de la présence intracellulaire de la molécule de m-THPC. De plus, les analyses effectuées après illumination laser des cellules laissent apparaître une transformation de la m-THPC en m-THPP ce qui va dans le sens des résultats énoncés lors des analyses sur les solutions de m-THPC dans le mélange éthanol/eau (1:99, v/v). Néanmoins, il n'a en aucun cas été observé la présence de photoproduits tels que le monohydroxy-m-THPC ou le dihydroxy-m-THPC. Il apparaît donc que le phénomène principal de la photoréaction après illumination laser envers la m-THPC en milieu intracellulaire consiste en une déshydrogénation de cette dernière.
5 Références

- 1. Rezzoug H, Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 1997.
- 2. Kessel D, Dougherty TJ, Rev. Contemp. Pharmacother. , 10, 19, 1999.
- 3. Kessel D, Int. J. Clin. Pract. , 53, 263, 1999.
- 4. Karty JA, Lato S, Reilly JP, Rapid Commun. Mass Spectrom. , 12, 625, 1998.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Mon travail de thèse a consisté à apporter une contribution à l'évaluation de l'activité photodynamique lors du traitement laser de photosensibilisants utilisés dans le cadre du développement de la thérapie photodynamique. Cette étude à permis de mettre en évidence la complémentarité de la spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et de fluorescence avec la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions (MALDI/FTICRMS).

Les travaux réalisés tout au long de ces trois années de thèse se sont traduits par les résultats suivants :

Dans un premier temps, un protocole de suivi de la photoréaction de la 5,10,15,20méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine (m-THPC) a été mis en œuvre. Ce protocole consiste à exploiter en parallèle les données obtenues par méthodes spectrophotométriques (absorption ultraviolet/visible et fluorescence) d'une part et d'autre part celles acquises par désorption/ionisation laser assistée par matrice couplée à la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions (MALDI/FTICRMS).

L'examen systématique des spectres d'absorption ultraviolet/visible, de fluorescence et MALDI/FTICRMS obtenus suite à l'irradiation laser à 650 nm d'une solution de m-THPC dans l'éthanol a révélé à chacune des étapes du protocole un comportement spécifique :

Tout d'abord, une première irradiation a eu pour conséquence une diminution à la fois des signaux caractéristiques de la m-THPC (bande d'absorption à 650 nm et du signal à m/z = 681). De plus celle-ci semble initier la complexation du zinc présent sous forme de traces au sein même de la m-THPC (5µg/L).

- Cette réaction de complexation, qui se poursuit en absence de lumière, est caractérisée par un massif centré autour de m/z = 742 attribué à l'espèce [Zn-m-THPC]^{•+}.
- Si l'irradiation est renouvelée à 650 nm, un massif centré autour de m/z = 712 apparaît, il correspondrait à un N-oxydes ou à un composé dihydroxylé.

Lors de l'étude du comportement de la m-THPC et de la m-THPBC en solution dans un éthanol/eau (1:99 v/v), dans un tampon physiologique (Phosphate Buffer Saline, PBS) avec ou sans protéines (sérum de veau fœtal, SVF), nous avons mis en évidence un mécanisme photochimique différent. En effet, les spectres MALDI/FTICRMS ont montré la présence de m-THPP suite au traitement de la m-THPC à 650 nm et la présence de m-THPC suite au traitement de la m-THPC à 650 nm et la présence de m-THPC suite au traitement de la m-THPC à 650 nm et la présence de m-THPC suite au traitement de la m-THPP de la présence notable des photoproduits majoritairement formés sont issus d'un processus de déshydrogénation. De plus, la présence notable des photoproduits monohydroxylés relatifs à la m-THPP et à la m-THPC a également été mise en évidence.

Les travaux préliminaires effectués sur les thrombocytes ont montré que ces cellules peuvent être directement analysées, et sans traitement préalable, par MALDI/FTICRMS. Ainsi, il a été démontré que cette technique permettait la mise en évidence sans ambiguïté de la présence intracellulaire de la molécule m-THPC. Les analyses après illumination laser du mélange plaquettes sanguines/m-THPC ont également montré une transformation de la m-THPC en m-THPP, ce qui indique à nouveau un processus de déshydrogénation semblable à celui mis en évidence lors des analyses sur les solutions de m-THPC dans le mélange éthanol/eau (1:99, v/v).

Enfin, les premières études permettant de prouver que les processus photochimiques en présence des agents photosensibles impliquant également la participation de l'oxygène moléculaire singulet ont été menées à la fois par MALDI/FTICRMS et par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse à piégeage d'ions (GC/ITMS). Les résultats préliminaires confirment nettement la formation de l'oxygène moléculaire singulet suite à l'irradiation laser d'une solution éthanolique de 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) et de m-THPC. Ainsi, la présence d'un photosensibilisant tel que la m-THPC accélère considérablement la réaction photochimique conduisant à la formation de la molécule d'orthodibenzoylbenzène (o-BB) après réaction du DPBF avec l'oxygène singulet. Ceci confirme la formation d'oxygène singulet lors de l'irradiation laser à 650 nm de la m-THPC en solution dans l'éthanol.

Conclusion générale

Au vu de ces résultats, il convient de poursuivre ces recherches, notamment en identifiant le rôle de la m-THPC (ou de la m-THPBC) au niveau cellulaire. En effet, le potentiel de la technique MALDI couplée à la spectrométrie de masse pour identifier les espèces moléculaires au sein de matrices complexes est considérable. Une étude précise de la localisation dans les différents compartiments cellulaires permettrait d'aboutir à de plus amples connaissances sur les sites d'action de la m-THPC. En continuité, des recherches sur l'impact de l'activité photodynamique du photosensibilisant sur des cellules saines ou cancéreuses devront être menées par MALDI/MS notamment pour mettre en évidence la distribution des protéines spécifiques présentes et ainsi apporter des informations précieuses sur l'action cellulaire des agents photosensibles.

En outre, les études préalables sur le rôle de l'oxygène moléculaire singulet ${}^{1}O_{2}$ devront être poursuivies à la fois en milieu éthanol et aqueux, avec ou en absence totale d'oxygène. Ces recherches devront déboucher sur l'action du photosensibilisant sur les protéines préalablement choisies en présence de sondes moléculaires spécifiques (1,3-diphénylisobenzofurane) ou inhibitrices (1,4 diazobicyclo[2,2,2]octane). L'aspect cinétique de formation de l'oxygène moléculaire singulet en différents milieux après illumination laser devra également être traité avec précision.



ANNEXES

LISTE DES FIGURES

LISTE DES FIGURES

Chapitre I : Bibliographie

igure I.1 – Schéma résumant les réactions photochimiques de type I et de type II	10
Figure I.2 – Nomenclature des porphyrines (numérotation suivant le système IUPAC) ²⁴	15
Figure 1.3 – Structures moléculaires de (a) m-THPP, (b) m-THPC, (c) m-THPBC.	16
Figure I.4 – Synthèse de la m-THPC et de la m-THPBC par la réduction de la m-THPP ¹⁶ .	17

Chapitre II : Matériels et méthodes

Figure II.1 – Schéma descriptif de la microsonde FTICRMS.	26
Figure II.2 – Schéma de la cellule de la microsonde FTICRMS.	27
Figure II.3 – Principe de détection des ions (en mode positif).	30
Figure II.4 – Séquence expérimentale standard d'une analyse FTICRMS.	31
Figure II.5 - Le principe du MALDI	36
Figure II.6 – Chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse à piégeage d'ions.	40
Figure II.7 – Parcours du gaz vecteur en mode split	41
Figure II.8 – Rampe de température	42
Figure II.9 – Représentation schématique du piège à ions.	43
Figure II.10 – Séquence MS/EI	44
Figure II.11 – Spectre de masse de l'acétonitrile en Mode CI (gaz ionisant acétonitrile).	47
Figure II.12 – Paramètres de l'ionisation chimique.	47
Figure II.13 – Système à double faisceau.	49
Figure II.14 – Montage expérimental.	53
Figure II.15 – Photooxydation du DBPF	55

Chapitre III: Comportement des photosensibilisants en solution dans l'éthanol

Figure III.1 – Spectre MALDI/FTICRMS ($\lambda = 355 \text{ nm}$; Irr. = 10^7 W/cm^2) de la m-THPC en solution dans
l'éthanol (10 ⁻⁵ mol/L) utilisant comme matrice (a) l'acide 3,5-dihydrobenzoïque, (b) l'acide 4-hydroxy-3-
methoxy cinnamique et (c) la 3-nitroaniline59
Figure III.2 – (a) Spectre d'absorption UV/Visible de la 2,5-DHB en solution dans l'éthanol (10 ⁻⁵ mol/L);
(b) Spectre MALDI/FTICRMS ($\lambda = 355$ nm; Irr. = 10^7 W/cm ²) de la m-THPC en solution
dans l'éthanol (10 ⁻⁵ mol/L) utilisant comme matrice la 2,5 DHB60
Figure III.3 – Structure chimique de la m-THPP. 61
Figure III.4 - (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible et (b) spectre (i) d'absorption et (ii) de fluorescence de
la m-THPP en solution dans l'éthanol (1,04 10 ⁻⁵ mol/L)61
Figure III.5 – Spectre MALDI/FTICRMS de la m-THPP en solution dans l'éthanol (1,04 10 ⁻⁵ mol/L)62
Figure III.6 – Structure chimique de la m-THPC62
Figure III.7 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible et (b) spectre (i) d'absorption et (ii) de fluorescence de
la m-THPC en solution dans l'éthanol (1,02 10 ⁻⁵ mol/L)63
Figure III.8 – Spectre MALDI/FTICRMS de la m-THPC en solution dans l'éthanol (1,02 10 ⁻⁵ mol/L)64
Figure III.9 – Structure chimique de la m-THPBC. 64
Figure III.10 - (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible et (b) spectre (i) d'absorption et (ii) de fluorescence
de la m-THPBC en solution dans l'éthanol (10 ⁻⁵ mol/L)65
Figure III.11 – Spectre MALDI/FTICRMS de la m-THPBC en solution dans l'éthanol (1,02 10 ⁻⁵ mol/L)66
Figure III.12 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC (10^{-5} mol/L) en solution dans
l'éthanol; (i) avant illumination laser; (ii) immédiatement après la première illumination laser (650 nm, 300
mW); (iii) après 540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité; (iv) immédiatement après la seconde
illumination laser (650 nm, 300 mW), (b) zoom de l'intervalle 350-450 nm67
Figure III.13 – Spectre d'absorption différentielle de la m-THPC (10 ⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol ; (i)
avant illumination laser; (ii) immédiatement après la première illumination laser (650 nm, 300 mW); (iii) après
540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité; (iv) immédiatement après la seconde illumination
laser (650 nm, 300 mW)68
Figure III.14 – Evolution des bandes spécifiques (460, 620, 650 et 775 nm) d'absorption de la m-THPC en
solution dans l'éthanol durant le protocole d'illumination laser69
Figure III.15 – Spectre de fluorescence de la m-THPC (10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol; (i) avant
illumination laser; (ii) immédiatement après la première illumination laser (650 nm, 300 mW); (iii) après
540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité; (iv) immédiatement après la seconde illumination
laser (650 nm, 300 mW)70
Figure III.16 – Spectres MALDI/FTICRMS ($\lambda = 355 \text{ nm}$; Irr. = 10 ⁷ W/cm ²) de la m-THPC (10 ⁻⁵ mol/L) en
solution dans l'éthanol; (i) avant illumination laser; (ii) immédiatement après la première illumination laser
(650 nm, 300 mW); (iii) après 540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité ; (iv) immédiatement

après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW)._____71

Liste des figures

Figure III.17 – Hypothèses primitives pour expliquer les différents massifs détectés⁵. 72 Figure III.18 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible du ZnTPP en solution dans l'éthanol (10⁻⁵mol/L); (b) Spectres MALDI/FTICRMS du ZnTPP en solution dans l'éthanol (10^{-5} mol/L) (λ = 355 nm : $Irr_{.} = 10^7 \text{ W/cm}^2$). 74 Figure III.19 - Spectres d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC en solution dans l'éthanol en présence de (a) $ZnSO_4$, 7 H_2O ; (b) $CuSO_4$, 5 H_2O et (c) $FeSO_4$, 7 H_2O . 76 Figure III.20 - Spectres de masse (a) simulé, (b) MALDI/FTICRMS de la molécule de Zn-m-THPC 77 et (c) distribution isotopique du zinc. Figure III.21 - (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible du mélange m-THPC/ZnCl₂ en solution dans l'éthanol; (i) avant illumination laser; (ii) après la première illumination laser (650 nm); (iii) après 540 min au repos à température ambiante dans l'obscurité; (iv) après la seconde illumination laser (650 nm) ; Spectres MALDI/FTICRMS du mélange m-THPC/ZnCl₂ en solution dans l'éthanol ($\lambda = 355 \text{ nm}$; Irr. = 10⁷ W/cm²); (b) après la première illumination laser et la période de repos au noir et à température ambiante ; (c) après la seconde 78 illumination laser (650 nm). Figure III.22 – (a) Spectre MALDI/FTICRMS (2,5 DHB, 355 nm, 10⁷ W/cm²)de la m-THPC en solution dans l'éthanol (10⁻⁵ mol/L mol/L) après la deuxième irradiation laser (650 mn, 300 mW); (b) Spectre de masse simulé de l'ion moléculaire protoné pour la molécule de dihydroxy-m-THPC obtenu par substitution de deux groupements 'OH; (c) Spectre de masse simulé de l'ion moléculaire protoné pour la molécule de dihydroxy-m-THPC obtenu par addition de deux groupements 'OH._____ 83 Figure III.23 – Photooxydation du DBPF. 85 Figure III.24 - Chromatogramme et spectres de masse par ionisation (a) en impact électronique et (b) en ionisation chimique du DPBF en solution dans l'éthanol à 10⁻³ mol/L. 87 Figure III.25 - Spectre MALDI/FTICRMS du DPBF en solution dans l'éthanol (10⁻³ mol/L) (a) avant 88 irradiation laser et (b) après irradiation laser (650 nm, 300 mW). Figure III.26 – Mécanismes de fragmentations de l'o-BB observés par EI en GC/ITMS. 89 Figure III.27 - Chromatogramme et spectres de masse par ionisation (a) en impact électronique et (b) en ionisation chimique de l'o-BB en solution dans l'éthanol à 10⁻³ mol/L. 90 Figure III.28 - Spectre MALDI/FTICRMS de l'o-BB en solution dans l'éthanol (10-3 mol/L) (a) avant irradiation laser et (b) après irradiation laser (650 nm, 300 mW). 90 Figure III.29 – Chromatogrammes du mélange DPBF (10⁻³ mol/L) / m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans 91 l'éthanol avant et après irradiation laser à 650 nm. Figure III.30 - Spectres cumulés (10 impacts à 10 endroits différents) MALDI/FTICRMS du mélange DPBF (10⁻³ mol/L) / m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol (a) avant irradiation laser et (b) après irradiation laser (650 nm, 300 mW). 92 Figure III.31 - Evolution de l'apparition d'o-BB par GC/ITMS après illumination laser (650 nm, 300 mW) du mélange DPBF $(10^{-3} \text{ mol/L}) / \text{m-THPC} (10^{-5} \text{ mol/L}) \text{ dans l'éthanol.}$ 94 Figure III.32 - Spectres MALDI/FTICRMS du mélange DPBF (10⁻³ mol/L) / m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en milieu 95 sous (a) argon et (b) standard au bout de 60 s d'illumination laser à 650 nm.

3

Liste des figures

Chapitre IV : Déshydrogénation des photosensibilisants en milieu aqueux et physiologique

Figure IV.1 - Variation du spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau (de 100:0 à 10:90, v/v). 100 Figure IV.2 - (a) Variation du spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau (de 30:70 à 20:80, v/v); (b) Variation du coefficient d'extinction molaire à $\lambda = 416$ nm de la m-THPC en fonction du gradient éthanol/eau (de 30:70 à 20:80, v/v). _____ 102 Figure IV.3 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC (1,02 10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (24:76, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min); Spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPC (1,02 10^{.5} mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (24:76, v/v) (λ = 355 nm; Irr. = 10^7 W/cm²); (b) avant illumination laser; (c) après l'illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min). 103 Figure IV.4 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC (10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol/ eau (1:99, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min) ; spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) ($\lambda = 355$ nm ; Irr. = 10⁷ W/cm²) ; (b) avant illumination laser; (c) immédiatement après l'illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min). Figure IV.5 – Etude en MALDI/FTICRMS : évolution du rapport I_{679}/I_{681} en fonction du temps d'illumination laser de la m-THPC (10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v). 106 Figure IV.6 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPBC (0,95 10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol (i) avant et (ii) après illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min) ; spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPBC (0.95 10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol ($\lambda = 355$ nm; Irr. = 10^7 W/cm²); (b) avant illumination laser; (c) immédiatement après l'illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min). 109 Figure IV.7 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPBC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (i) avant illumination laser, (ii) après la première illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min), (ii) après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min). 110 Figure IV.8 – Gauche : Spectre MALDI/FTICRMS (3,04 T) de la m-THPBC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (355 nm; 10^7 W/cm^2): (i) avant illumination laser, (ii) après la première illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min), (ii) après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min). Droite : Spectre HiRes MALDI/FTICRMS (4,7 T) de la m-THPBC (1,02 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (337 nm): (i) avant illumination laser, (ii) après la première illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min), (ii) après la seconde illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min). 112 Figure IV.9 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPP (1,03 10⁻⁵ mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min); Spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPP (1.03 10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol/eau (1:99, v/v) (λ = 355 nm; Irr. = 10^7 W/cm²); (b) avant illumination laser; (c) immédiatement après l'illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min). 113

Liste des figures

Figure IV.10 – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPC (10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS (1:99, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min); spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPC (10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS (1:99, v/v) (355 nm; Irr. = 10^7 W/cm²); (b) avant illumination laser; (c) après l'illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min). _____115 **Figure IV.11** – (a) Spectre d'absorption ultraviolet/visible de la m-THPBC (10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS (1:99, v/v) (i) avant et (ii) après illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min); spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPBC (10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS (1:99, v/v) (355 nm; Irr. = 10^7 W/cm²); (b) avant illumination laser; (c) après l'illumination laser (532 nm, 300 mW, 60 min). _____116 **Figure IV.12** – Spectres MALDI/FTICRMS de la m-THPC (10^{-5} mol/L) en solution dans l'éthanol/PBS/SVF (1:98, 6:0, 4 v/v/v) (355 nm; Irr. = 10^7 W/cm²); (a) avant illumination laser; (b) après l'illumination laser (650 nm, 300 mW, 60 min). ______117

Chapitre V : Comportement de la Temoporfin (m-THPC) en milieu biologique

Figure V.1 – Photographie de plusieurs formes de plaquettes sanguines. 121 Figure V.2 – Spectre de fluorescence (λ_{exc} =415 nm) (i) du mélange m-THPC/plaquettes sanguines en solution dans le PBS, (ii) du culot issu de la centrifugation remis en suspension dans 1,5 mL de PBS, (iii) du surnageant après une centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min). 123 Figure V.3 - Spectre d'absorption ultraviolet/visible (i) du mélange m-THPC/plaquettes sanguines en solution dans le PBS, (ii) du surnageant après la première centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min), (iii) du surnageant après la seconde centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min). 124 Figure V.4 - Photos des dépôts MALDI (a) des plaquettes sanguines, (b) des plaquettes sanguines avec la matrice (2,5 DHB), (c) des plaquettes sanguines avec la m-THPC et (d) des plaquettes sanguines avec la m-THPC et la matrice (2,5 DHB). 125 Figure V.5 - Spectre MALDI/FTICRMS de plaquettes sanguines non exposées à la m-THPC en solution dans le PBS. 126 Figure V.6 – Protocole expérimental d'analyse des plaquettes sanguines après mise en contact avec la m-THPC par spectrophotométrie ultraviolet/visible et par MALDI/FTICRMS. 127 Figure V.7 - Spectre d'absorption ultraviolet/visible (i) du mélange m-THPC/plaquettes sanguines en solution dans le PBS, (ii) du surnageant après une centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min), du culot remis en solution dans 1,5 mL de PBS (iii) avant illumination laser et (iv) après illumination laser (650 nm, 100 mW). 128 Figure V.8 – Spectre MALDI/FTICRMS (i) du mélange m-THPC/plaquettes sanguines en solution dans le PBS. (ii) du surnageant après une centrifugation (15 minutes à 5000 tours/min), du culot remis en solution dans 1,5 mL de PBS (iii) avant illumination laser et (iv) après illumination laser (650 nm, 100 mW). 129

LISTE DES TABLEAUX

LISTE DES TABLEAUX

Chapitre II : Matériels et méthodes

Tableau II.1 – Paramètres de mesure du spectrophotomètre ultraviolet/visible.	49
Tableau II.2 – Conditions expérimentales lors des analyses par fluorescence.	50

Chapitre III : Comportement des photosensibilisants en solution dans l'éthanol

Tableau III.1 – Caractéristiques spectrales de la m-THPP en solution dans l'éthanol (1,04 10 ⁻⁵ mol/L).	61
Tableau III.2 – Caractéristiques spectrales de la m-THPC en solution dans l'éthanol (1,05 10 ⁻⁵ mol/L).	63
Tableau III.3 – Caractéristiques spectrales de la m-THPBC en solution dans l'éthanol (1,02 10 ⁻⁵ mol/L)	65
Tableau III.4 – Simulation de l'espèce du massif autour de $m/z = 713$.	_82

Chapitre IV : Déshydrogénation des photosensibilisants en milieu aqueux et physiologique

LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

LISTE DES REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Amat-Guerri F, Lempe E, Lissi EA, Rodriguez FJ, Trull FR.

Water-soluble 1,3-Diphenylisobenzofuran derivatives synthesis and evaluation as singlet molecular oxygen acceptors for biological systems.

J. Photochem. Photobiol., A: Chem., 93, 49, 1996.

Angotti M, Maunit B, Muller JF, Bezdetnaya L, Guillemin, F.

Characterization by matrix-assisted laser desorption/ ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of the major photoproducts of temoporfin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). J. Mass Spectrom., **36**, 825, 2001.

Angotti M, Maunit B, Muller JF, Bezdetnaya L, Guillemin, F.

Matrix-assisted laser desorption/ionization coupled to fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry : a method to characterize temoporpfin photoproducts. Rapid Commun. Mass Spectrom., 13, 597, 1999.

Auler H, Banzer G.

Unter suchungen uber die rolle der porphyrine BEI Geschwol Stranken und tiern. Z. Krebsforsch, 53, 65, 1942.

Bahr U, Stahl-Zeng J, Gleitsmann E, Karas M.

Delayed extraction time-of-flight MALDI mass spectrometry of proteins above 25 000 Da. J. Mass Spectrom., **32**, 1111, 1997.

Bartlett MG, Busch KL, Wells CA, Schey KL.

Use of 2-hydroxy-1-naphthoic acid as a matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of low molecular wheight porphyrins and petides.

J. Mass Spectrom. , 31, 275, 1996.

Beato BD, Yost RA, Quirke JME.

Org. Mass. Spectrom. , 24, 875, 1989.

Belintchenko I, Melnikova V, Bezdetnaya L, Rezzoug H, Merlin JL, Potapenko A, Guillemin F.

Characterization of photodegradation of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) in solution : Biological consequences in human tumor cells. *Photochem. Photobiol.*, **67**, 584, 1998.

Blais JC, Bolbach G, Riahi K, Spiro M, Brunot A, Breton F.

Matrix-assisted uv laser desorption of biopolymers : influence of the interactions in the target. J. Chim. Phys., **90**, 1399, 1993.

Bolbach G, Riahi K, Spiro M, Brunot A, Breton F, Blais JC.

Influence of target preparation and laser irradiance in matrix-assisted uvlaser desorption of proteins. *Analusis*, **21**, 383, 1993.

Bonnett R, Charlesworth P, Djebal BD,. Foley S, McGarvey MJ, Truscott TG.

Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)porphyrin (mTHPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (mTHPBC) : a comparative study.

J. Chem. Soc. , Perkin Trans. 2, 325, 1999.

Bonnett R.

Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. Chem. Soc. Rev., 24, 19, 1995.

Bonnett R.

Chemical Aspects of Photodynamic Therapy. Ed. Gordon and Breach Science Publishers, 2000.

Bonnett R, Djebal BD, Hamilton PA, Martinez G, Wierrani F.

Photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the corresponding chlorin (m-THPC) and bacteriochlorin (m-THPBC). A comparative Study. J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 53, 136, 1999.

Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC.

Hydroporphyrins of the meso-tetra (m-hydroxyphenyl) porphyrin series as tumour photosensitizers. Biochem. J., 261, 277, 1989.

Cai H, Wang Q, Luo J, Lim CK.

Study of temoporfin metabolism by HPLC and electrospray mass spectrometry. *Biomed. Chromatogr.*, **13**, 354, 1999.

Liste des références bibliographiques

Castro JA, Koster C, Wilkins C.

Matrix-assisted laser desorption/ionization of high-mass molecules by fourier-transform mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom., 6, 239, 1992.

Chambers DM, Goeringer DE, McLuckey SA, Glish GL.

Matrix-assisted laser desorption of biological molecules in the quadrupoleion trap mass spectrometer. Anal. Chem., 65, 14, 1993.

Comisarow MB, Marshall AG.

Chem. Phys. Lett. , 25, 282, 1974.

Comisarow MB, Marshall AG.

The early development of fourier transform ion cyclotron resonance (ft-icr) spectroscopy. J. Mass Spectrom., **31**, 581, 1996.

Comisarow MB, Melka JD.

Anal. Chem., 51, 2198, 1979.

Dale MJ, Costello KF, Jones AC, Langridge-Smith PRR.

Investigation of porphyrins and metalloporphyrins using two-step laser mass spectrometry. J. Mass Spectrom., **31**, 590, 1996.

Demirev P, Westmann A, Reimann CT, Hakansson P, Barofsky D, Sundqvist BUR, Cheng YD, Seibt W, Siegbahn K.

Matrix-assisted laser desorption with ultra-short laser pulses. Rapid Commun. Mass Spectrom., 6, 187, 1992.

Dienes T, Pastor SJ, Schürch S, Scott JR, Yao J, Cui S, Wilkins CL.

Fourier transform mass spectrometry : advancing years (1992-mid. 1996). Mass Spectrom. Rev., 15, 163, 1996.

Dougherty TJ, Grinder GB, Weishaupt KR, Boyle D.

Photoradiation therapy II. J. Natl. Cancer Inst., **55**, 115, 1975.

Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A, Weishaupt KR, Boyle D, Mittleman A.

Cancer Res., 38, 2628, 1978.

Dulbecco R, Vogt M. J. Exp. Med. , **98**, 167, 1954.

Liste des références bibliographiques

Ens W, Mao Y, Mayer F, Standing K.

Properties of matrix-assisted laser desorption. measurements with a time-to-digital converter. Rapid Commun. Mass Spectrom. , 5, 117, 1991.

Epe B.

Genotoxicity of singlet oxygen. Chem. Bio. Interaction, 80, 239, 1991.

Figge FHJ, Weiland GS, Manganiello LOJ.

Cancer detection and therapy : Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins. *Proc. Soc. Exp. Viol. Med.*, **68**, 640, 1948.

Fischer AMR, Murphree AL, Gomer CJ.

Clinical and preclinical photodynamic therapy. Lasers in surgery & medicine, 17, 2, 1995.

Foote CS.

Definition or type I and type II photosensitized oxidation. Photochem. Photobiol., 54, 659, 1991.

Forrer M, Glanzmann T, Braichotte D, Wagnières G, Van den Bergh H, Savary JF, Monnier Ph.

In vivo measurement of fluorescence bleaching of meso-tetrahydroxy phenyl chlorin (m-THPC) in the Esophagus and the oral cavity.

Proc. SPIE, 2627, 33, 1995.

Forrer M, Mizeret J, Braichotte D, Wagnières G, Savary JF, Monnier P, Jichlinski P, Leisinger HJ, Van den Bergh H.

Fluorescence imaging photodetection of early cancer in the bronchi with mTHPC and in the bladder with ALAinduced protoporphyrin IX : preliminary clinical results. *Proc. SPIE*, **2371**, 109, 1995.

Fukuzawa K, Matsuura K, Tokumura A, Suzuki A, Terao J.

Kinetics and dynamics of singlet oxygen scavenging by alpha -tocopherol inphospholipid model membranes. Free Radical Biology and Medecine, 22, 923, 1997.

Grahn MF, McGuinness A, Benzie R, Boyle R, De Jode ML, Dilkes MG, Abbas B, Williams NS.

Intracellular uptake, absorption spectrum and stability of the bacteriochlorin photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin (m-THPBC). Comparison with 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl) chlorin (m-THPC).

J. Photochem. Photobiol., B : Biol., 37, 261, 1997.

Green MK, Medforth CJ, Muzzi CM, Nurco DJ, Shea KM, Smith KM, Lebrilla CB, Shelnutt JA.

Application of matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry to the analysis of planar porphyrins and highly substituted nonplanar prophyrins. *Eur. Mass Spectrom.*, **3**, 439, 1997.

Guan S, Marshall AG.

Ion traps for fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry : principles and design of geometric and electric configurations.

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 146/147, 261, 1995.

Guillemin F, Meunier A, Lignon D, Kosminski P, Diller ML, Falcoz-Vigne V.

Thérapie photodynamique protocoles cliniques en cours. Med. Chir. Dig., 21, 197, 1992.

Guillemin F, Patrice T, Brault D, D'Hallewin MA, Lajat Y, Leroy M, Meunier A, Lignon D.

La Thérapie Photodynamique. Path. Biol., 41, 110, 1993.

Gupta G, Morton CA, Whitehurst C, Moore JV, Mackie RM.

Application of matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry to the analysis of planar porphyrins and highly substituted nonplanar prophyrins. Brit. J. Dermato., 141, 385, 1999.

Ha G, Hogan JD, Laude DA.

Competitive ionization of tetraphenylporphyrin in a laser-generated metal ion plasma. J. Am. Soc. Mass Spectrom., 4, 159, 1993.

Hadjur C, Lange N, Rebstein J, Monnier P, Van den Bergh H, Wagnières G.

Application of matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry to the analysis of planar porphyrins and highly substituted nonplanar prophyrins. J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 45, 170, 1998.

Hahn JH, Zenobi R, Zare RN.

Application of matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform mass spectrometry to the analysis of planar porphyrins and highly substituted nonplanar prophyrins. J. Am. Chem. Soc., 109, 2842, 1987.

Jones RM, Wang Q, Lamb JH, Djebal BD, Bonnett R, Lim K.

Identification of photochemical oxidation products of 5, 10, 15, 20 tetra(m-hydroxyphenyl) chlorin by on line high performance liquide chromatography-electrospray inoization tandem mass spectrometry. J. Chromatogr. A, 722, 257, 1996.

Jonsson GP, Hedin AB, Hakansson PL, Sundqvist BUR, Save BG, Nielsen PF, Roepstroff P, Kamensky I, Lindberg MSL.

Anal. Chem., 58, 1084, 1986.

Kampmeier J, Dreisewerd K, Schürenberg M, Strupat K.

Investigations of 2,5-dhb and succinic acid as matrices for ir and uv maldi. part : i uv and ir laser ablation in the maldi process.

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 169-170, 31, 1997.

Karas M, Bachmann D, Bahr U, Hillemkamp F.

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 8 A, 935, 1988.

Karty JA, Lato S, Reilly JP.

Detection of the bacteriological sex factor in e. coli by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry.

Rapid Commun. Mass Spectrom., 12, 625, 1998.

Kasselouri A, Bourdon O, Demore D, Blais JC, Prognon P, Bourg-Heckly G, Blais J.

Fluorescence and Mass Spectrometry Studies of Meta-tetra(hydroxyphenyl) Chlorin Photoproducts. *Photochem. Photobiol.*, **70**, 275, 1999.

Kato H.

Photodynamic therapy for lung cancer. A review of 19 years experience. J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 42, 96, 1998.

Kelly JF, Snell ME.

Hematoporphyrin derivative, A possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. J. Urol., 155, 150, 1976.

Kennedy JC, Pottier RH.

Endogenous protoporphyrin ix, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 14, 275, 1992.

Liste des références bibliographiques

Kessel D, Dougherty TJ.

Agents Used in Photodynamic Therapy. Rev. Contemp. Pharmacother., 10, 19-24, 1999.

Kessel D.

Transport and Localisation of m-THPC in Vitro. Int. J. Clin.Pract., 53, 263, 1999.

Kessel D, Woodburn K. Biodistribution of photosensitizing agents. Int. J. Biochem. , 25, 1377, 1993.

Laustriat G. Biochimie, 68, 771, 1996.

Leung J. Semin. Oncol. , 21, 4, 1994.

Levy JG, Waterfield E, Richter A.

Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng., 2078, 99, 1994.

Lindsey JS, Chaudary T, Chait BT.

²⁵²Cf plasma desorption mass spectrometry in the synthesis of porphyrin model systems. Anal. Chem., **64**, 2804, 1992.

Lipson LR, Balds EJ, Olsen EM.

The use of derivative of hematoporphyrin in tumor detection. J. Natl. Cancer Inst., 26, 1, 1961.

Lipson LR, Gray MJ, Baldes EJ.

Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. Proc. 9th Inter. *Cancer Congr. Tokyo*, (abstract) 393, 1966.

Ma LW, Moan J, Berg K.

Evaluation of new photosensitizer, meso-tetra(hydroxyphenyl) chlorin, for use in photodynamic therapy : a comparison of its photobiological porperties with those of two other photosensitizers. *Lasers Med. Sci.*, **9**, 127, 1994.

Liste des références bibliographiques

Mac Robert AJ, Bown SG, Pillps D.

What are the ideal protoproperties for a sensitizer ? Photosensitizing compounds : their chemistry, biologie and clinical use. Ciba Foundation Symposium, 146, 4, 1989.

Marshall AG, Grosshans PB.

Anal. Chem., 63, 215A, 1991.

Marshall AG, Verdun FR.

Fourier transforms in NMR, optical, and mass spectrometry. Elsevier Scientific, Amsterdam, 1990.

Meunier-Reynes A, Dieblod S, Lignon D, Granjon Y, Guillemin F.

Light dosimetry *in vivo* in interstitial photodynamic therapy of human tumors. Proc. SPIE, **1525**, 177, 1991.

Miller JM.

Mass. Spectrom. Rev., 9, 319, 1990.

Monetti G.

Rapid Commun. Mass Spectrom., 10, 167, 1996.

Monnier Ph, Savary M, Fontolliet Ch, Wagnières G, Chatelain A, Cornaz P, Depeursinge Ch, Van den Bergh H.

Photodetection and photodynamic therapy of 41 "early" squamous cell carcinomas of the pharynx, oesophagus and tracheo-bronchial tree.

Laser Tumour Therapy, Eds Telles MA, Espagne, Madrid, 1990.

Morgan AR, Garbo GM, Keck RW, Selman SH.

Cancer Res., 48, 194, 1988.

Morgan AR, Garbo GM, Keck RW, Selman SH.

Proc. Soc. Photo-Opt. Instrum. Eng., 847, 172, 1987.

Mowry CD, Johnston MV.

Simultaneous detection of ions and neutrals produced by matrix-assisted laser desorption. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 7, 569, 1993.

Muller JF, Tolitte F, Krier G, Pelletier M.

Brevet Français n°8809438, 1989.

Oelckers S, Ziegler T, Michler I, Röder B.

Time-resolved detection of singlet oxygen luminescence in red-cell ghost suspensions : concerning a signal component that can be attributed to1o2 luminescence from the inside of a native membrane. J. Photochem. Photobiol., B : Biol., 53, 121, 1999.

Overberg A, Karas M, Bahr U, Kaufmann R, Hillenkamp F.

Rapid Commun. Mass Spectrom., 4, 293, 1990.

Pelletier M, Krier G, Muller JF, Weil D, Johnston M.

Rapid Commun. Mass Spectrom., 2, 146, 1988.

Peng Q, Moan J, Ma LW, Nesland SM.

Uptake, localization and photodynamic effect of meso-tetra(hydroxyphenyl) porphyrin and its corresponding chlorin in normal and tumor tissues of mice bearing mamary carcinoma. *Cancer Res.*, **55**, 2620, 1995.

Policard A.

Etude sur les apsects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. C. R. Hebdomadaires Soc. Biol., 91, 1422, 1924.

Reddi E, Valduga G, Rodgers MAJ, Jori G.

Photochem. Photobiol., 54, 63, 1991.

Rezzoug H, Barberi-Heyol M, Merlin JL, Bolotine L, Lgnon D, Guillemin F.

Evaluation de la profondeur de pénétration de la lumière utilisée en thérapie photodynamique, *in vivo* dans des xénogreffes tumorales.

Bull. Cancer, 83, 816, 1996.

Rezzoug H.

Thèse de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 1997.

Ris HB, Altermatt HJ, Nachbur B, Stewart JCM, Wang Q, Lim CK, Bonnet R, Althaus U.

Effects of drug-light interval on photodynamic therapy with m-tetrahydroxyphenylchlorin in malignant mesothelioma.

Int. J. Cancer, 53, 141, 1993.

Rosell-Mele A, Carter JF, Maxwell JR.

High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of porphyrins by using an atmospheric pressure interface.

J. Am. Soc. Mass Spectrom., 7, 965, 1996.

Rotomskis R, Streckyte G, Didziapetriene J.

High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of porphyrins by using an atmospheric pressure interface.

Proc. SPIE, 2370, 73, 1995.

Rovers JP, De Jode ML, Grahn MF.

Significantly increased lesion size by using the near-infrared photosensitizer 5,10,15,20-tetrakis (m-hydroxyphenyl)bacteriochlorin in interstitial photodynamic therapy of normal rat liver tissue. Lasers in Surgery and Medicine, 27, 235, 2000.

Rovers PR, de Jode ML, Rezzoug H, Grahn MF.

High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of porphyrins by using an atmospheric pressure interface.

Photochem. Photobiol., 72: 358, 2000.

Selman SH, Keck RW, Hamptom JA.

Transperineal photodynamic ablation of the canine prostate. J. Urol., **156**, 258, 1996.

Shaw GJ, Elington G, Quirke JME.

High-Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of porphyrins by using an atmospheric pressure interface.

Anal. Chem. , 53, 2014, 1981.

Strafford GC, Kelley PE, Syka JEP, Reynolds WE, Todd JFJ, Tradli P.

Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 60, 85, 1984.

Strauss WSL, Sailer R, Schneckenburger H, Akgün N, Gottfried V, Chetwer L, Kimel S.

Photodynamic efficacy of naturally occuring porphyrins in endothelial cells in vitro and microvasculature in vivo.

J. Photochem. Photobiol., B: Biol., 39, 176, 1997.

Streckyte G, Rotomskis R.

Biology, 3, 26, 1993.

Streckyte G, Rotomskis R.

Phototransformations of porphyrins in aqueous and micellar media.

J. Photochem. Photobiol., B : Biol., 18, 259, 1993.

Liste des références bibliographiques

Strupat K, Kampmeier J, Horneffer V.

Investigations of 2,5-dhb and succinic acid as matrices for uv and ir maldi. part ii : crystallographic and mass spectrometric analysis. Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes, 169-170, 43, 1997.

Svanberg K, Svanberg S.

Le Laser en Médecine. La Recherche, 24, 686, 1993.

Taber SW, Fingar VH, Coots CT, Wieman TJ.

Photodynamic therapy using mono-l-aspartyl chlorin e_6 (np e_6) for the treatment of cutaneous disease : a phase i clinical study.

Clin. Cancer Res., 4, 2741, 1998.

Van Berkel GJ, McLuckey SA, Glish GL.

Electrospray Ionization of Phorphyrins Using a Quadrupole Ion Trap for Mass Analysis. Anal. Chem., 63, 1098, 1991.

Van Vaeck L, Struyf H, Van Roy W, Adams F.

Organic and inorganic analysis with laser microprobe mass spectrometry. ii: applications. Mass Spectrom. Rev., 13, 209, 1994.

Vandell VE, Limbach PA.

Electrospray Ionization mass spectrometry of metalloporphyrins. J. Mass Spectrom., 33, 212, 1998.

Von Tappeiner H, Jesionek A.

Therapeutische versuche mit fluoresczierenden stoffen. Muench Med Worchschr, 1, 2042, 1903.

Wasserman HH, Scheller JR, Cooper JL.

J. Am. Chem. Soc., 94, 173, 1972.

Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ.

Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photodestruction of a murine tumor. *Cancer Res.*, **36**, 2326, 1976.

Weldon D, Ogilby PR.

Time-resolved absorption spectrum of singlet oxygen in solution. J. Am. Chem. Soc., 120, 12978, 1998.

Wessels JM, Sroka R, Heil P, Seidlitz HK.

Photodegradation of protoporphyrin-dimethylester in solution and in organized environments. Int. J. Radiat. Biol., 64, 475, 1993.

Woodburn KM, Qing F, Miles DR, Kessel D, Luo Y, Young SW.

Photochem. Photobiol., 65, 420, 1997.

Zhan Q, Voumard R, Zenobi R.

Chemical analysis of cancer therapy photosentizers by two-step laser mass spectrometry. *Anal. Chem.*, **66**, 3259, 1994.

PUBLICATIONS

Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization Coupled to Fourier Transform Ion Cyclotron **Resonance Mass Spectrometry: A Method to Characterize Temoporpfin Photoproducts**

Marc Angotti¹, Benoît Maunit¹, Jean-François Muller^{1*}, Lina Bezdetnaya² and François **Guillemin²**

¹Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, 1 Bd Arago, 57078 Metz Cedex 3, France

²Unité de recherche en Thérapie Photodynamique CRAN-CNRS UPRES-A 7039, Centre Alexis Vautrin, Av. de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre, Cedex, France

Temoporpfin (m-THPC) has been developed as a new photodynamic therapeutic agent and is currently under clinical trials for the treatment of malignant tumors. In the present study matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) coupled with Fourier transform mass spectrometry has been applied for the analysis of the products of photochemical m-THPC oxidation in an ethanolic solution upon red laser-light irradiation (λ 650 nm). MALDI mass spectrometric studies together with spectroscopic analysis have demonstrated the formation of an intermediate compound with a signal cluster at m/z 744, with main absorption bands at 418 and 620 nm. The evolution of the m/z 744 product, during dark storage, supports the free radical chain auto-oxidation reaction, yielding the addition of four oxygen atoms to the m-THPC molecule. Copyright © 1999 John Wiley & Sons, Ltd.

Received 18 January 1999; Revised 25 January 1999; Accepted 29 January 1999

Photodynamic therapy (PDT) is a new rapidly developing method for cancer treatment, which is based on the systemic administration of a tumor-localizing photosensitizer (PS), followed by irradiation of the tumor with visible spectrally adapted light.¹⁻³ The photochemical interaction of the PS, light and molecular oxygen results in the formation of singlet oxygen (1O2) and other reactive oxygen species (ROS), which are believed to be toxic species responsible for induction of tumor necrosis.^{2,3} 5,10,15,20-m-(Tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC), one of the second generation photosensitizers,⁴ has recently been proposed as a new sensitizer for future use in the PDT of cancer.^{5,6} m-THPC is a single compound, derived from 5,10,15,20-meso-(tetra-hydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP),⁴ with a maximum absorption in the red region of visible light (λ_{max} 652 nm). The latter property favors deeper light penetration into tissue and allows the method to achieve 6-10 mm depth of necrosis in tumor-bearing mice.⁶

As is the case for the majority of photosensitive drugs, m-THPC is degraded upon light illumination. This process, usually called 'photobleaching', involves a decrease in absorbance for certain spectral bands, variations of the fluorescence intensity or the formation of new absorption and emission bands.⁷ The m-THPC photodegradation has been observed in aqueous⁸ and organic solutions,⁹ in vitro,¹⁰ in vivo in tumor-bearing mice¹¹ and in clinical practice.¹² Studyies of the photobleaching reaction are particularly important for two reasons: (1) Identification of photobleaching products, which can be photodynamically active, thus opening the possibility for 'extended' photodynamic

*Correspondence to: J.-F. Muller, Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, 1 Bd Arago, 57078 Metz Cedex 3, France. Contract/grant sponsor: French Ligue Nationale Contre le Cancer.

therapy; (2) Measurement of the photochemical reactions that reflect the potential therapeutic effect and thus help to match the light dose.

This paper describes the first results concerning the application of matrix-assisted laser desorption/ionization coupled to Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (MALDI-FTICRMS) for the analysis of the parent m-THPC molecule and the products of photochemical m-THPC oxidation. We have studied the formation of photoproducts in organic solvents as a result of two consecutive irradiations separated by a dark storage period. The kinetics of photoproduct formation, assessed by MALDI, have been compared with that obtained by spectroscopic measurements.

EXPERIMENTAL

Reagents and standard solutions

m-THPC (Fig. 1) was kindly provided by Scotia Pharmaceuticals Ltd. (Guildford, UK) as crystalline powder (specification: content of m-THPC: 98.4% w/w; water content: 0.20% w/w; residual solvents: ethanol 0.18% w/w; content of impurities: m-THPP 0.7% w/w). Unless otherwise indicated, the photosensitizer was dissolved in methanol or in ethanol (Prolabo SA, Fontenay sous bois, France), which had been distilled beforehand twice under an inert atmosphere.

Illumination

Illumination was performed by exposing 3.5 mL of 7 µg/mL (10^{-5} mol/L) of m-THPC in ethanol or methanol in a quartz cuvette (pathlength 1 cm) to light from a dye laser (model TDL 50, Quantel SA, Les Ulis, France) pumped with the



Figure 1. Structural formula of 5,10,15,20-m-(tetrahydroxyphenyl) chlorin (m-THPC).

second harmonic of a Nd-YAG laser (λ 532 nm, pulse duration: t_p 12 ns, output energy 400 mJ). The dye laser emission was tuned to 650 nm (the dye used was DCM (Exciton, Inc, Ohio, USA), output power 300 mW, frequency f 10 Hz (the incident fluence rate to 10⁷ W/cm²). With these laser parameters, each illumination period has to last 45 minutes (t_{ill}), corresponding to a total effective illumination time of 0.3 ms (total time = $t_{ill} \cdot f \cdot t_p$; $t_{ill} = 45 \times 60 = 2700$ s for f = 10 Hz and $t_p = 12$ ns). Laser parameters were systematically controlled during the experimentation.

UV/visible absorption and fluorescence spectra

Absorption was registered using a UV/visible Lambda 14 spectrophotometer (Perkin Elmer, France) which operates in the spectral range between 190 and 1100 nm. Other parameters were as follows: scan speed 240 nm/min, slit width 2 nm and smooth bandwidth 4 nm, quartz cuvette (pathlength 1 cm). Steady-state emission spectra in solution were carried out using a 1-cm pathlength quartz cuvette in a computer-controlled Perkin Elmer LS50B luminescence spectrometer equipped with a xenon discharge lamp and a red-sensitive photomultiplier (Type R928, Hamamatsu, Tokyo, Japan). Spectra were collected between 600 and 750 nm using an excitation wavelength of 415 nm. All fluorescence spectra were corrected for any nonlinear instrument response.

Fourier transform ion cyclotron resonance (FTICR) laser microprobe

Analyses were performed using a modified laser microprobe Fourier transform mass spectrometer.^{13,14} This instrument is differentially pumped and is fitted with a dual-cell (Nicolet Instrument FTMS 2000, Thermoquest Ins, Madison, WI, USA), operated with a 3.04 T magnetic field and coupled to a reflection laser interface and special sample manipulation hardware.

The viewing system (inverted Cassegrain optics design) allows viewing of the sample at a $\times 300$ magnification.^{13,19}



Figure 2. MALDI-FTICRMS analysis sequence.

A new sample probe fitted with motorised micromanipulators in three directions permits a spatial accuracy to $2.5 \,\mu m$.

The MALDI ionization step was performed using a Nd-YAG (Brillant B, Quantel, Les Ulis, France, λ 355 nm. pulse duration 4.3 ns, output energy 50 mJ). The laser beam diameter can be adjusted from 15 to about 500 µm upon the sample, which is placed inside the source cell, by means of several internal lenses and an external adjustable telescope. This configuration corresponds to a power density ranging easily from about 10^5 to 10^{10} W/cm². Moreover, an excimer laser (Lamba Physik, Göttinger, Germany) or a dye laser (model TDL 90, Quantel SA, Les Ulis, France) can be coupled to the FTICR mass spectrometer microprobe. These different laser options allow the use of several wavelengths for the ionization step: 193 nm (ArF mixture, pulse duration 23 ns, output energy 250 mJ); 248 nm (KrF mixture, pulse duration 34 ns, output energy 250 mJ) or wide wavelength range (between 220 to 850 nm by using the whole range of dyes and the appropriate doubling and mixing crystals).

The experimental sequence (refer to Fig. 2) used for these analyses is as follows: ions are formed by laser-induced ionization in the source cell (residual pressure 10^{-6} Pa). During the ionization event, the conductance limit plate between the two cells (source and analyzer) is kept at the trap potential (typically + 2 V) to confine positive ions to the source side. A variable delay period follows, during time ion/molecule reactions can occur. Ions are then excited by a frequency excitation chirp and the resulting image current is detected, amplified, digitized, apodized (Blackman-Harris, three terms) and Fourier transformed to produce a mass spectrum.¹⁸

MALDI sample preparation

2,5-Dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) was purchased from Aldrich (St Quentin Fallavier, France). Samples for MALDI-MS were prepared from a 7 µg/mL solution of m-THPC in methanol or ethanol. Small aliquots of matrix (50μ L of 2,5-DHB [0.1 mol/L]) and analyte solution (450μ L of m-THPC [7 µg/mL-10⁻⁵ mol/L]) were mixed (matrix/analyte ratio equals to 10³). This mixture was deposed on a metallic support of titanium and the solvent was evaporated very rapidly into a warm air stream to form a layer of analyte and matrix co-crystallized on the sample holder surface. The mixture was then transferred to the mass spectrometer.

RESULTS AND DISCUSSION

UV/visible absorption and fluorescence measurements

Figure 3(a) shows the visible absorption spectra of 10^{-5} mol/L m-THPC in ethanol measured before irradiation (i), immediately after the first irradiation (Step 1) (ii), at the end

of nine hours dark storage (Step 2) (iii) and immediately after the second irradiation (Step 3) (iv).

Before irradiation the spectrum exhibits split Soret bands at 405 and 416 nm and four Q-bands at 517, 542, 597 and 650 nm. After light exposure, the absorbance in the short wavelength shoulder of a Soret band (405 nm) was reduced by approximately 12%, while no changes were observed at 416 nm. Significant reduction in absorbance (by 30%) was observed at 650 nm (\bigcirc) with a concomitant formation of a new absorption band at 620 nm (\square). The slight spectral modification in the Soret band can be explained by the increase in absorbance at 418 nm as a result of irradiation. Obviously, two processes take place simultaneously in the Soret region: photodegradation which is manifested by a decrease in absorbance and formation of photoproducts whose absorption band overlaps the parent compounds. Therefore, spectral changes in the Soret region cannot be taken as a clear indication of photodegradation. At the same time, the decrease in absorbance at 650 nm after illumination should be interpreted as m-THPC photobleaching.

Nine hours storage of pre-irradiated m-THPC solution in the dark at room temperature (Step 2) resulted in an increase in photoproduct absorbance at 620 and 418 nm. In a parallel set of experiments non-irradiated m-THPC solution was kept in the dark in air for nine hours and the absorption spectrum was no different from that of the initial solution. Therefore, an increase in photoproduct absorbance was related to the dark reaction induced by photochemical



Figure 3. (a) Absorption spectra of m-THPC (7 μ g/mL) in ethanol; (i) non-illuminated m-THPC solution; (ii) immediately after first irradiation (λ 650 nm, output power 300 mW) (Step 1); (iii) after 540 min in dark storage at room temperature (Step 2); (iv) immediately after second irradiation (λ 650 nm, output power 300 mW) (Step 3). (b) Absorption difference spectra (irradiated minus non-irradiated) of m-THPC solution (7 μ g/mL); (i) non-illuminated m-THPC (base line); (ii) illuminated m-THPC (Step 1); (iii) after 540 min in the dark (Step 2); (iv) illuminated m-THPC (Step 3).



Figure 4. Evolution of the specific absorption bands at Step 1, Step 2 and Step 3.

reaction. Further evidence on photoproduct formation can be obtained if the initial spectrum is subtracted from the spectrum after illumination. Absorption difference spectra of m-THPC solution registered at Step 1 and Step 2 are presented in Fig. 3(b). A significant increase in absorbance at 620 and 418 nm can be seen after dark storage of preirradiated m-THPC solution. The second illumination of the ethanolic m-THPC solution (Step 3) resulted in a reduction of absorbance of a photoproduct at 620 nm and simultaneous appearance of the two new absorption bands at 460 (Δ) and 775 nm (+) (Figs 3(a) and 3(b)).

The monitoring of photoproduct formation observed as a result of two irradiations separated by dark storage of preirradiated m-THPC solution is presented in Fig. 4. Steadystate fluorescence measurements showed an emission peak at 653 nm in the non-irradiated solution (excitation wavelength 415 nm). Immediately after the first irradiation (Step 1) a slight increase in emission at 624 nm was observed, which became prominent after dark storage.

Presently, it is difficult to draw a final conclusion based only on the results of this spectroscopic study. However, we hypothesize that the increase in absorbance after Step 1 and Step 2 might belong to a single photoproduct (Soret band at 418 nm, and a prominent Q-band at 620 nm; fluorescence maximum at 624 nm). The nature of the photoproducts which appeared as a result of Step 3 will be elucidated later. In further experiments MALDI was employed to characterize and identify initial non-irradiated m-THPC molecules and photoproducts formed as a result of Step 1 and Step 2 treatments. Finally, this technique was applied for the identification of the nature of products with absorption bands at 460 and 775 nm.

Matrix-assisted laser desorption/ionization

MALDI allows the direct high sensitivity analysis of mixtures, with greatly reduced analyte dissociation, accurate mass determination and is a reproducible and reliable analytical tool.^{16,17} Although the high-mass capability of MALDI is widely recognized, a major advantage of MALDI is that molecular weight information can be obtained on both low and high molecular weight compounds with an instrument such as the MALDI-FTICR mass spectrometer used in our laboratory. Ionization techniques such as fastatom bombardment (FAB), desorption chemical ionization (DCF), laser desorption ionization^{16,17} or plasma desorption (PD) are the most frequently used methods for the study of synthetic porphyrins. MALDI was introduced by Hillen-kamp and Karas¹⁵ and provides a soft method of ionization. In MALDI, the high ratio of support matrix-to-sample statistically implies that the laser photons encounter the matrix more often than the sample under analysis. Previous mass spectrometric investigations of m-THPC by MALDI have demonstrated that 2,5-DHB is the best matrix at 355 nm. Another advantage is that the absorption of the m-THPC ethanolic solution is very low at 355 nm. Best MALDI conditions for detecting the [M+H]⁺ ion are when the irradiance value is ca. 10^7 W/cm².

MALDI experiments at 355 nm

At this wavelength, the absorption of m-THPC as well as that of other photosensitizers (m-THPP and p-THPC) is very low and the desorption process thus involves absorption of laser energy (irradiance 1.6×10^7 W/cm²) by the

Rapid Commun. Mass Spectrom. 13, 597-603 (1999)



Figure 5. MALDI-FTICR mass spectra of m-THPC in ethanol (λ 355 nm, laser power density 10⁷ W/cm²) (i) non-illuminated m-THPC; (ii) illuminated m-THPC (Step 1); (iii) after 540 min in the dark (Step 2); (iv) illuminated m-THPC (Step 3).

MALDI matrix only. The FTICR trapping potential was typically + 2V, the ionization time was 1 ms and the excitation mass range 30-2000 u. No excitation attenuation and ejection are employed. Detection started at a mass of 186.8 u. Each mass spectrum corresponds to one laser shot.

Under these experimental conditions, m-THPC was detected in a non-illuminated ethanolic solution with a predominant peak $[M+H]^+$ at m/z 681 and with a weak molecular peak m/z 680 (Fig. 5(i)). In addition, the ion signals of the m/z 682 and 683 peaks appear to be $[M+H]^+$ with a ¹³C contribution. It should be noted that the signals corresponding to M^+ and $[M+H]^+$ were observed for the solutions of p-THPC and m-THPP.

The analysis of m-THPC ethanolic solution after the first irradiation Step 1 shows the presence of two low intensity peaks at m/z 713 and 714 (Fig. 5(ii)) and a barely detectable signal cluster at m/z 742 and 743. After overnight storage of pre-irradiated m-THPC ethanolic solution (Step 2), a significant increase in intensity for the signal clusters at m/z 742 and 744 was observed. The same tendency was noticed for the signal clusters at m/z 713 and 714; however, their intensities were still lower than that at m/z 742 and 744 (Fig. 5(iii)). If we compare the data assessed by MALDI-FTICRMS with the spectroscopic study (Figs 3 and 4), the signal cluster at m/z 744 can be referred to the photoproduct formed as a result of Step 1 and Step 2 treatments with the



Scheme 1. Photodegradation mechanism deduced from the results of MALDI-FTICRMS.

Soret band located at 418 nm and the O-band at 620 nm. We tentatively propose that the mass distribution at m/z 744 was present in the MALDI spectrum immediately after the first irradiation (Fig. 5(ii)), but because of the high reactivity of this product to laser light, the mass spectrum in this region was hardly detectable. After the second laser illumination (Step 3), MALDI-FTICR mass spectra demonstrated the presence of the same mass distributions around m/z 714 and 744. However, a 'redistribution' in the signal intensity was observed, namely, a significant decrease in a signal cluster at m/z 744 and an increase in signal cluster intensity at m/z713 (Fig. 5(iv)). At the same time, new ion signals at m/z679 and 678 were registered (Fig. 5(iv)), and could result from the dehydrogenation of m-THPC.⁹ The decrease in signal cluster intensity at m/z 744 confirmed our hypothesis that this signal cluster belongs to the photoproduct with a Qband at 620 nm.

Analysis by MALDI-FTICRMS permits us to put forward a hypothesis on the nature of the mass distributions around m/z 744 and 714 (Scheme 1). In addition, it should be noted that analysis by MALDI-TOFMS gave the same results.

The choice of FTICRMS was based on two main reasons. The first was the possibility to measure the energy of the laser beam at all wavelengths and at various places in the optic pathway by different systems (pyroelectric cell). The energy level of the laser beam could be adjusted with great flexibility. So, with the externally adjustable telescope, employing the reflection irradiation mode at 90°, it was possible to adjust with great precision the energy deposited in the sample.¹⁴ The coupling of a frequency tunable laser or excimer laser to a FTICR mass spectrometer microprobe allows studies using other matrices. In fact use of longer wavelengths would avoid the problem of strong resonant absorption of the biomolecules such as photosensitizing agents. Finally, the use of shorter wavelengths may induce more fragmentation and thus give access to more structural information.

The compound with the signal cluster around m/z 744 is attributed to the photoproduct formed as a result of Step 1 and Step 2 treatments with the main absorption bands at 418

and 620 nm. This compound could be the result of the addition of four oxygen atoms to the m-THPC molecule or could be attributed to the participation of °CH₂OH in the formation process (Scheme 1). An extra oxygen atom can be envisaged as being either at a nitrogen to give chlorin Noxide and/or being inserted in a C-H bond to give hydroxyl compounds. Chlorin N-oxide and hydroxychlorin type photoproducts arise from the addition of one oxygen atom to the m-THPC molecule. This was proposed in a study by Jones et al.9 to explain the nature of photoproducts formed under mild photooxidation conditions and assessed by HPLC electrospray ionization tandem mass spectrometry (HPLC/ESI-MS). Of two possible types of photoproducts. namely, m-THPC N-oxide and hydroxy-m-THPC, only the latter is plausible, since chlorin N-oxide products are unusual and not known in the tetraphenylchlorin series. Taking this fact into account, we propose that the phototransformation of the m-THPC molecule, under our experimental conditions, yields the photoproduct formation with the hydroxyl group attached to the pyrrole ring (either in the unsaturated or reduced position) or to the hydroxyphenyl ring. Also, photoproducts as the monohydroxylated chlorin N-oxide and/or monohydroxylated epoxide are feasible.

The mechanism of photosensitizer photodegradation and consequently of photoproduct formation was shown to be oxygen dependent for the majority of photosensitizers, proceeding either through the singlet oxygen mediated pathway, or though type I photochemistry.²⁰ Basically, singlet oxygen arises from the reaction of a triplet photosensitizer with molecular oxygen yielding different oxidation products:²¹

 $PS(S_0) \xrightarrow{h\nu} PS^*(S_1) \xrightarrow{Intersystem crossing} PS^*(T_1)$ $PS^*(T_1) \xrightarrow{O_2} {}^{1}O_2 \xrightarrow{Substrate} Oxygenated Products$

The type I reaction between the excited m-THPC molecule and the solvent is as follows:

$$PS(S_0) \xrightarrow{h\nu} PS^*(S_1) \xrightarrow{Intersystem crossing} PS^*(T_1)$$

$$PS^{\bullet}(T_1) + \xrightarrow[\text{ethanol or methanol}]{ethanol or methanol} PS^{\bullet-}$$

$$PS^{\bullet-} \xrightarrow[O_2 \longrightarrow O_2^{\bullet-}]{PS}$$

superoxide anios

$$O_2^{\bullet-} \xrightarrow{H^+} H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow O_2 + {}^{\bullet}OH + OH^-$$

(Haber-Weiss Reaction)

In a recently published study Hadjur et al.²² found that m-THPC photobleaching in an aqueous serum enriched solution was significantly inhibited in the presence of specific singlet oxygen scavengers, indicating that singlet oxygen can play a significant role both in the m-THPC photodegradation and the m-THPC photoproduct formation. However, the type I reaction in m-THPC photodegradation cannot be ruled out. Indeed, evidence was obtained for the formation of hydroxychlorin photoproducts as a result of m-THPC irradiation in methanol through free radical chain auto-oxidation at the reactive pseudobenzylic position.⁹ Our data on the significant increase in photoproduct formation during dark storage (Step 2) also supports the free radical mechanism.

CONCLUSIONS

In the present study, MALDI has been shown to be an effective method for characterizing m-THPC photobleaching products after laser irradiation of ethanolic m-THPC solution. The first laser irradiation leads to intermediate photoproduct formation. UV/visible absorption analysis together with MALDI mass spectrometric studies have demonstrated the formation of this intermediate compound (m/z 744) with absorption bands at 418 and 620 nm. This photoproduct appeared to be sensitive to subsequent laser light irradiation. In addition, the evolution of that product during dark storage supports the free radical chain autooxidation reaction yielding addition of four oxygen atoms to the m-THPC molecule.

In the future, the use of other MALDI matrices, heterodyne mode detection and detection by HPLC/ESI-MS will be necessary for the identification of the intermediate and the final photoproduct structure, as well as for the characterization of singlet oxygen production.²³ Preliminary HPLC/ESI-MS studies confirm the present results, but need further study and will be submitted for publication in the future.

Acknowledgements

This work was supported by the French Ligue Nationale contre le Cancer, Region Lorraine. The gift of m-THPC from Scotia QuantaNova (Guilford, UK) is greatly appreciated. We would like to thank Krier Gabriel and Vernex-Loset Lionel for their appreciated help with analyses by FTICRMS. We are grateful to Leize Emmanuelle (LSMBO, University of Strasbourg) for analyses by HPLC/ESI-MS and MALDI-TOFMS.

REFERENCES

- 1. D. Dolphin, The Porphyrins, Academic Press, New York (1978).
- 2. B. W. Henderson and T. J. Dougherty, Photodynamic Therapy, Marcel Dekker, New York (1992).
- 3. D. Kessel, Advances in Experimental Medicine and Biology, Plenum Press, New York (1992). 4. R. Bonnett, R. D. White, U.-J. Winfield and M. Berenhaum,
- Biochem. J. 261, 277 (1989).
- 5. H.-B. Ris, H. J. Altermatt, R. Inderbitzi, R. Hess, B. Nachbur, J. C. M. Stewart, Q. Wang, C. K. Lim, R. Bonnet, M. C. Berenhaum and U. Althaus, Br. J. Cancer 64, 1116 (1991)
- 6. H.-B. Ris, H. J. Alternatt, B. Nachbur, J. C. M. Stewart, Q. Wang, C. K. Lim, R. Bonnet and U. Althaus, Int. J. Cancer 53, 141 (1993).
- 7. J. M. Wessels, R. Spoka, P. Heil and H. K. Seidlitz, Int. J. Radiat. Biol. 64, 475 (1993).
- 8. I. Belintchenko, V. Melnikova, L. Bezdetnaya, H. Rezzoug, J. L. Merlin, A. Potapenko and F. Guillemin, Photochem. Photobiol. 67, 584 (1998).
- 9. R. M. Jones, Q. Wang, J. H. Lamb, B. D. Djebal, R. Bonnet and C. K. Lim, J. Chromatogr. A 722, 257 (1996).
- 10. L. W. Ma, J. Moan and K. Berg, Lasers Med. Sci. 9, 127 (1994).
- 11. H. Rezzoug, L. Bezdetnaya, O. A'Amar J. L. Merlin and F. Guillemin, Lasers Med. Sci. 9, 127 (1994).
- 12. M. Forrer, T. Glanzman, D. Braichotte, G. Wagnières, H. van den Bergh, J. F. Savary and Ph. Monnier, SPIE Conf. Proc. 2627, 33 (1995)
- 13. M. Pelletier, G. Krier, J.-F. Muller, D. Weil and M. Johnston, Rapid Commun. Mass Spectrom. 2, 146 (1988).
- 14. J.-F. Muller, M. Pelletier, G. Krier, D. Weil and J. Campana, Microbeam Analysis P. E. Russel, (Ed.) San Francisco Press, p. 311 (1989).
- 15. F. Hillenkamp, M. Karas, R. C. Beavis and B. T. Chait, Anal. Chem. 63, 1193A (1991).
- 16. E. Forest, J. Ulrich, J. C. Marchon and H. Virelizier, Org. Mass Spectrom. 22, 45 (1987).
- 17. R. S. Brown and C. L. Wilkins, Anal. Chem. 58, 3196 (1986).
- 18. A. G. Marshall and F. R. Verdun, Fourier Transform in NMR Optical and Mass Spectrometry. A User's Handbook, Elsevier, Amsterdam (1990).
- 19. J.-F. Muller, F. Tolitte, M. Pelletier and G. Krier, Brevet Français N° 8809438.
- 20. J. D. Spikes, Photochem. Photobiol. 55, 797 (1992).
- 21. C. S. Foote, Photochem. Photobiol. 54, 659 (1991).
- 22. C. Hadjur, N. Lange, J. Rebstein, Ph. Monnier, H. van den Bergh, G. Wagnières, J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 45, 170 (1998).
- 23. B. Maunit, A. Hachimi, P. Manuelli, P. J. Calba and J. F. Muller, Int. J. Mass Spectrom. Ion Processes 156, 173 (1996).



Characterization by matrix-assisted laser desorption/ ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of the major photoproducts of temoporfin (*m*-THPC) and bacteriochlorin (*m*-THPBC)

Marc Angotti,¹ Benoît Maunit,¹ Jean-François Muller,^{1*} Lina Bezdetnaya² and François Guillemin²

¹Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, 1 Bd Arago, 57078 Metz Cedex 3, France ²Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique CRAN-CNRS UPRES-A 7039, Centre Alexis Vautrin, Av. de Bourgogne, 54511 Vandoeuvre Cedex, France

Received 6 February 2001; Revised 15 March 2001; Accepted 23 April 2001

The photobleaching of 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)chlorin (temoporfin, *m*-THPC) and 5,10,15,20tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (bacteriochlorin, *m*-THPBC) was studied in ethanol-water (1:99, v/v) and in physiological medium (phosphate-buffered saline, PBS) with or without fetal calf serum (FCS). *m*-THPC solution was irradiated with the laser radiation of 650 nm, whereas *m*-THPBC solution underwent two consecutive irradiations at 532 and 650 nm. The photoproducts were characterized by UV-visible absorption spectrophotometry and by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) coupled with Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (FTICRMS). Independent of the solvent used, the phototransformation of either photosensitizer yielded the formation of 5,10,15,20tetrakis (*m*-hydroxyphenyl)porphyrin (*m*-THPP) through a major dehydrogenation process. Copyright © 2001 John Wiley & Sons, Ltd.

KEYWORDS: temoporfin; bacteriochlorin; matrix-assisted laser desorption/ionization; mass spectrometry; UV-visible; absorption

INTRODUCTION

5,10,15,20-Tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)chlorin (temoporfin, *m*-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis (*m*-hydroxyphenyl)bacteriochlorin (bacteriochlorin, *m*-THPBC) are new-generation photosensitizers (PS), which present an absorption peak in the spectral regions of 652 nm¹ and 739 nm,² respectively. These absorption bands in the red and near-infrared regions allow better tissue light penetration, thus making these photosensitizers interesting candidates for photodynamic therapy (PDT) of cancer. PDT is a new modality for cancer treatment based on the combined action of a photosensitizing drug, light and molecular oxygen. The treatment results in a cascade of oxidative events leading to cell death and eventually tumor ablation.³⁻⁵

In common with the majority of photosensitive drugs, *m*-THPC and *m*-THPBC are degraded upon light illumination. This process, usually called 'photobleaching,' involves a decrease in absorbance in certain spectral bands, variations of

*Correspondence to: J.-F. Muller, Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, 1 Bd Arago, 57078 Metz Cedex 3, France.

E-mail: jfmuller@lsmcl.sciences.univ-metz.fr

Contract/grant sponsor: Ligue Nationale contre le Cancer.

Contract/grant sponsor: Region Lorraine.

Contract/grant sponsor: Pole Européen de Santé.

the fluorescence intensity or the formation of new absorption and emission bands.⁶ The kinetics of *m*-THPC photodegradation have been reported in different experimental⁷⁻¹⁰ systems and in clinical practice.¹¹ In contrast, information on *m*-THPBC photobleaching is sparse.^{2,12-14} A study of the photobleaching reaction is particularly important for two reasons: (1) identification of photobleaching products, which can be photodynamically active, thus opening up the possibility of 'extended' photodynamic therapy; and (2) measurement of the photochemical reactions that reflect the potential therapeutic effect and thus help in optimizing the light dose.

In a recent paper,¹⁵ we showed the efficiency of the matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (MALDI-FTICRMS) technique for studying *m*-THPC photobleaching in ethanol solution after laser illumination at 650 nm. MALDI-MS studies together with spectroscopic analysis clearly demonstrated a phototransformation with the hydroxyl group attached to the pyrrole ring or the hydroxyphenyl ring. The present paper addresses the photo-induced transformation of *m*-THPC in ethanol-water (1:99, v/v) and in physiological media [phosphate-buffered saline (PBS) with or without fetal calf serum (FCS)]. The same
experimental conditions were applied to *m*-THPBC with the difference that the irradiation wavelength was 532 nm.

EXPERIMENTAL

Reagents and standard solutions

m-THPC and *m*-THPBC (Fig. 1), kindly provided by the Scotia Pharmaceuticals (Stirling, UK) as crystalline powders, were dissolved in ethanol (Prolabo, Fontenay sous Bois, France) to a concentration of 10^{-3} mol 1^{-1} . The stock standard solutions of *m*-THPC and *m*-THPBC were diluted to obtain a final concentration of 10^{-5} mol 1^{-1} in ethanol–water (1:99, v/v) solvent and in PBS (Life Technologies, Gibco BRL, Paisley, UK) with or without 0.4% (v/v) FCS (Dominique Dutscher, Brumath, France).

Illumination

A 3 ml volume of a solution of either m-THPC or m-THPBC was exposed to the light from a dye laser (Model TDL 50, Quantel, Les Ulis, France), pumped with the second harmonic of an Nd:YAG laser (wavelength 532 nm, pulse duration 12 ns, output energy 400 mJ). The laser illumination was carried out on solutions in a quartz cuvette (pathlength = 1 cm) under magnetic agitation. For *m*-THPC irradiation, the dye laser emission was tuned to 650 nm [the dye used was DCM (Exciton)], output power 300 mW, frequency (f) 10 Hz (incident fluence rate 10^7 W cm⁻²). With these laser parameters controlled systematically during the experiments, each illumination set represents to 60 min (till), corresponding to a total time of 0.4 ms (calculated by total time = $t_{iii} \cdot f \cdot t_p$; $t_{iii} = 60 \times 60 = 3600$ s; f = 10 Hz; $t_p = 12$ ns). Irradiation of *m*-THPBC solution was performed with at 532 and 650 nm, these wavelengths corresponding to absorption bands of *m*-THPBC.

UV-visible absorption spectra

Absorption was registered using Lambda 14 UV-visible spectrophotometer (Perkin Elmer) which operates in the spectral range between 190 and 1100 nm. Other parameters were as follows: scan speed 240 nm min⁻¹, slit width 2 nm and smooth bandwidth 4 nm. A quartz cuvette with a pathlength of 1 cm was used for absorption measurements.



Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometer

Analyses were performed using a modified laser microprobe Fourier transform mass spectrometer.^{16.17} This instrument is differentially pumped with a dual-cell Nicolet Instrument FTMS 2000 (Thermoquest, Madison, WI, USA), operated at a 3.04 T magnetic field and coupled to a reflection laser interface and special sample manipulation hardware.

The viewing system (inverted Cassegrain optics design) allows the visualization of the sample at $\times 300$ magnification.^{16.18} A new sample probe fitted with motorized micromanipulators in three directions permits a spatial accuracy of exactly 2.5 μ m.

The MALDI ionization step was performed using an Nd:YAG laser (Brillant B, Quantel; wavelength 355 nm, pulse duration 4.3 ns, output energy 50 mJ). The laser beam diameter can be adjusted from 15 to about $500 \,\mu\text{m}$ on the sample, which is placed inside the source cell, by means of several internal lenses and an external adjustable telescope. This configuration corresponds to a power density ranging from about 10^5 to 10^{10} W cm⁻². Moreover, an excimer laser (Lamba Physik, Göttinger, Germany) or a dye laser (TDL 90, Quantel) can be coupled to the FTICRMS microprobe.

The experimental sequence used for these analyses is the following: ions are formed by laser-induced ionization on the MALDI sample target located at the entrance of the source cell (residual pressure 10^{-6} Pa). During the ionization event, the conductance limit plate between the two cells (source and analyzer) is kept at the trap potential (typically +2 V) to confine positive ions to the source side. Ions are then excited by a frequency excitation chirp and the resulting image current is detected, amplified, digitized, apodized (Blackman–Harris, three terms) and Fourier transformed to produce a mass spectrum.¹⁹

We also carried out experiments with a high resolution MALDI-FTICR mass spectrometer (HiRes MALDI mass spectrometer, IonSpec, Irvine, CA, USA) to improve the mass resolution. The heart of this mass spectrometer is a 4.7 T superconducting magnet. Ions formed by a pulse from a nitrogen laser (337 nm) are accelerated out of the source region. The ions are trapped in the analyzer cell by gating the trapping voltages and then cooled with a 0.5 s pulse of







argon gas. One of the advantages of the external ion source method is that the operating parameters for generating ions in the MALDI source can be optimized independently of the parameters for detecting the ions in the FTMS analyzer cell.

MALDI sample preparation

The MALDI technique uses the dilution of the sample (*m*-THPC or *m*-THPBC) in a low molecular mass organic compound, 2,5-dihydroxybenzoic acid (2,5-DHB) (Aldrich, St Quentin Fallavier, France), which serves as a matrix. In order to achieve a matrix-to-sample ratio of 1000, 180 μ l of sample solution before and after laser illumination (10⁻⁵ mol l⁻¹) were mixed with 20 μ l of matrix solution (10⁻² mol l⁻¹). This mixture was deposited on a metallic support (titanium), and the solvent was evaporated very rapidly into a stream of warm air to form a layer of sample and matrix co-crystallized on the sample holder surface. The mixture was further transferred into the mass spectrometer.

RESULTS AND DISCUSSION

m-THPC phototransformations in ethanol-water solution

The visible absorption spectrum of 10^{-5} mol l⁻¹ *m*-THPC in ethanol-water (1:99, v/v) exhibits a split Soret band at 408 and 432 nm and four Q-bands at 525, 553, 600 and 653 nm. Laser illumination (650 nm) resulted in the complete disappearance of the Soret band shoulder at 408 nm, while the peak at 432 nm was reduced by ca 11%. A significant



Figure 2. MALDI-FTICR mass spectrum of *m*-THPC $(10^{-5} \text{ mol } I^{-1})$ in ethanol–water (1 : 99, v/v) (λ = 355 nm, laser power density 10^7 W cm^{-2}) before laser illumination.

decrease in absorbance was observed in the first Q-band (653 nm). The spectral changes are similar to those in ethanol solution¹⁵ reported previously and indicate a photoinduced degradation of m-THPC [Fig. 3(a)]. Parallel MALDI studies showed that *m*-THPC solution is characterized by a predominant peak $[M + H]^+$ at m/z 681 (intensity 1120), a weak molecular peak at m/z 680 and a group of lowintensity peaks at m/z 697 (intensity 50), attributed to monohydroxy-m-THPC $[M + OH]^+$ (Fig. 2). The changes in the MALDI-FTICR mass spectrum immediately after irradiation are reported in the Fig. 3(b) and are characterized by a two fold signal decrease of the $[M + H]^+$ ion. Moreover, this mass spectrum shows an evolution of peak intensities around m/z 697 (intensity 100), a significant increase in intensity for the signal at m/z 679 and a new group of ions around m/z 712, identified as a dihydroxy-m-THPC¹⁵ $[(M - 2H) + (OH)_2]^+$. Taken as a whole, the spectroscopic results and those obtained by MALDI-FTICRMS indicate the process of *m*-THPC photodegradation, evidenced by the decrease in the signal at m/z 681 and the appearance of m-THPC photoproducts. The kinetics of *m*-THPC photoproduct formation during irradiation were followed by the ratio of two signal intensities, at m/z 681 and 679. This ratio increased throughout the whole 1 h irradiation period in a linear manner (Fig. 4). The linear character of the given plot indicates that photodegradation of the *m*-THPC molecule yields a main product with a signal at m/z 679. This product is formed as a result of *m*-THPC dehydrogenation and is identified as the corresponding m-THPP molecule.8.20



Figure 4. MALDI-FTICRMS study: evolution of I_{679}/I_{681} according to laser illumination time.



Figure 3. (a) Absorption spectra: (i) non-illuminated solution; (ii) immediately after laser illumination ($\lambda = 650$ nm, output energy 300 mW) of *m*-THPC (10^{-5} mol l⁻¹) in ethanol–water (1 :99, v/v). (b) MALDI-FTICR mass spectrum of *m*-THPC (10^{-5} mol l⁻¹) in ethanol–water (1 :99, v/v). ($\lambda = 355$ nm, laser power density 10^7 W cm⁻²) after laser illumination.



Figure 5. Absorption spectrum of *m*-THPBC (10^{-5} mol l^{-1}) in ethanol-water (1:99, v/v): (i) non-illuminated solution; (ii) immediately after laser illumination at 532 nm (output energy 300 mW, illumination time 60 min, f = 10 Hz); (iii) immediately after second laser illumination at 650 nm (output energy 300 mW, illumination time 60 min, f = 10 Hz).

m-THPBC phototransformations in ethanol-water solution

Figure 5 shows the visible absorption spectra of 10⁻⁵ mol 1⁻¹ m-THPBC in ethanol-water (1:99, v/v), (i) before irradiation, (ii) immediately after first irradiation at 532 nm, and (iii) immediately after the second irradiation at 650 nm. Before irradiation, the spectrum exhibits a split Soret band at 357 and 380 nm and two Q-bands at 525 and 739 nm. After laser light exposure at 532 nm (output power 300 mW, f = 10 Hz, time of illumination 60 min), the absorbance of the Soret band was reduced by ~48 % and a significant reduction was observed for both Q-bands. This decrease in absorbance throughout the *m*-THPBC spectrum was paralleled by the formation of new absorption bands at 432 and 655 nm. Considering the results of the first illumination, m-THPBC pre-irradiated solution was subjected to second irradiation at 650 nm. The final spectrum is characterized by the disappearance of the bands at 357 and 380 nm and a decrease in the bands at 525, 655 and 739 nm. Thus, the UV-visible spectra indicate that the *m*-THPBC molecule undergoes phototransformation in ethanol-water solution after irradiation either at 532 nm (a wavelength that corresponds to m-THPBC absorption) and at 650 nm (a wavelength that corresponds to *m*-THPC absorption).

MALDI experiments were performed at 355 nm, the wavelength that corresponds to a notable absorption of *m*-THPBC. Under these conditions, non-illuminated *m*-THPBC was characterized as a predominant molecular peak [m-THPBC]^{+•} at m/z 682 (•) and a weak peak at m/z 681 (•) [Fig. 6(i)]. The analysis of the *m*-THPBC ethanol-water solution, undertaken after the first irradiation at 532 nm, shows the presence of a main peak at m/z 681 whose intensity is significantly greater than that of the signal at m/z 682. Compared with the absorption spectrum of *m*-THPBC after the first irradiation [Fig. 5(ii)], we hypothesize that the main photo-induced process is the formation of *m*-THPC molecules through *m*-THPBC dehydrogenation.



In order to validate this hypothesis, we analyzed the same solution (*m*-THPBC in ethanol-water medium before and after laser illumination at 532 nm) by HiRes MALDI-FTICRMS [Fig. $6(\alpha)$ and (β)]. The results are similar with a best resolution (Table 1) giving an unambiguous identification of the mass peak of each ion. Thus, the *m*-THPBC molecule ([*m*-THPBC]^{+•}, *m*/*z* 682.257) subjected to 532 nm illumination undergoes transformation to *m*-THPC ([*m*-THPC + H]⁺, *m*/*z* 681.253). Also, we observed a signal at *m*/*z* 679.237 which was identified as the [*m*-THPP + H]⁺ ion (**m**).

The subsequent *m*-THPBC irradiation at 650 nm shows a substantial signal at m/z 679 ([*m*-THPP + H]⁺), which corresponds to the dehydrogenation of the *m*-THPC molecule formed after first laser illumination [Fig. 6(iii)]. This result was confirmed by HiRes MALDI-FTICRMS analysis, which showed the presence of a *m*-THPP ion protonated signal at m/z 679.237 [Fig. 6(γ) \blacksquare].

In a parallel set of experiments, the *m*-THPP ethanolwater (1:99, v/v) solution was subjected to 532 and 650 nm irradiation and analyzed by UV-visible spectrophotometry and FTICRMS. The resulting spectra exhibited a significant decrease in the specific absorption bands without the formation of new distinct absorption bands or mass peaks (data not shown). We conclude that the subsequent dehydrogenation of the *m*-THPP molecule does not take place and that this molecule is an end-point in the *m*-THPBC photo-oxidation reaction. Such a step in the *m*-THPBC photo-oxidation reaction was shown by the identification of the characteristics ions by MALDI-FTICRMS of each major compound generated after the two laser illuminations.

Other signals that correspond to the mass peaks at m/z 695 and 697 could be attributed to the hydroxy-*m*-THPP and the hydroxy-*m*-THPC structures, respectively [Fig. 6(iii)]. The results of illumination of *m*-THPBC ethanol-water solution show the combination of two predominant processes, namely the dehydrogenation mechanism discussed by Jones *et al.*⁸ in their study of *m*-THPC photo-oxidation by HPLC/ESI tandem mass spectrometry and the hydroxylation processes of *m*-THPC discussed in several other papers.^{8,15,20}

Further, studies are in progress to determine the assignment of the signal cluster around m/z 742 (Fig. 6, X), and the results will be reported elsewhere.

Studies of *m*-THPC and *m*-THPBC

phototransformation in physiological solution

With the aim of mimicking a biological environment, *m*-THPC and *m*-THPBC solutions were irradiated in a physiological solution (PBS) supplemented or not with FCS. The non-irradiated *m*-THPC mass spectra show four groups of peaks, which we associated with the following ions: [M + $H]^+$ at m/z 681; $\varepsilon[M + OH]^+$ at m/z 697; $\varepsilon[M + Na]^+$ at m/z703; and $\varepsilon[M + K]^+$ at m/z 719 [Fig. 7(a)]. It should be noted



Figure 6. Left: MALDI-FTICR (3.04 T) mass spectra of m-THPBC (10^{-5} mol I^{-1}) in ethanol-water (1:99, v/v) ($\lambda = 355$ nm, laser power density 10^7 W cm^{-2}): (i) non-illuminated *m*-THPBC, (ii) *m*-THPBC illuminated at $\lambda = 532 \text{ nm}$ (output power 300 mW); (iii) *m*-THPBC illuminated at $\lambda \approx 650$ nm (output power 300 mW). Right: HiRes MALDI-FTICR (4.7 T) mass spectra of *m*-THPBC $(10^{-5} \text{ mol } l^{-1})$ in ethanol-water (1:99, v/v) ($\lambda = 337 \text{ nm}$): (α) non illuminated *m*-THPBC; (β) *m*-THPBC illuminated at $\lambda = 532 \text{ nm}$ (output power 300 mW), (γ) *m*-THPBC illuminated at $\lambda = 650$ nm (output power 300 mW).

Table 1.	Comparison between theoretical and experiment	al masses	obtained by	HiRes
MALDI-F	TICRMS		·	

Ion	Symbol in Fig. 6	Theoretical mass (m _t)	Experimental mass (m _e)	Relative error $(m_t - m_e)/m_t \times 10^6$ (ppm)
[<i>m</i> -THPP + H] ⁺		679.234	679.237	4.59
$[m-THPC + H]^+$	•	681.250	681.253	4.36
[m-THPBC] ^{+•}	•	682.257	682.257	0
Satellite ¹³ C peaks		683.261	683.262	2.18
		684.264	684.268	5.89
		685.268	685.273	8.14

that the *m*-THPBC mass spectrum shows the same family of ions with an increase of one or two mass units [Fig. 7(b)]. The presence of ion clusters could arise from the hydroxylation process due to the presence of water in the solvent mixture, or from the formation of potassium and sodium adducts due to the presence of salts in the PBS solution.

The follow-up of the behavior of the photosensitizers after the laser irradiation (650 and 532 nm for m-THPC and *m*-THPBC, respectively) using MALDI-FTICRMS shows that the major changes were characterized by the signals at m/z 679 and 681, corresponding to the dehydrogenation of m-THPC and m-THPBC, respectively [Fig. 7(c) and (d)].





Figure 7. MALDI-FTICR mass spectrum ($\lambda = 355$ nm, laser power density 10⁷ W cm⁻²) of *m*-THPC (10⁻⁵ mol l⁻¹) in ethanol-PBS (1:99, v/v) (a) before and (c) after laser illumination at $\lambda = 650$ nm (output power 300 mW) and of *m*-THPBC (10⁻⁵ mol l⁻¹) in ethanol-PBS (1:99, v/v) (b) before and (d) after laser illumination at $\lambda = 532$ nm (output power 300 mW).

Also, only traces of the $[M + OH]^+$ and cationized molecule mass peak intensities were detected. We also noted the absence of dihydroxy-*m*-THPC, was detected in an organic solvent.¹⁵

CONCLUSION

MALDI-FTICRMS has been shown to be an effective method for characterizing *m*-THPC and *m*-THPBC photomodification products after laser irradiation in ethanol-water (1:99, v/v) solution and physiological media. The first part of this study indicated the dehydrogenation of *m*-THPC that yields *m*-THPP.

The experiments in *m*-THPBC ethanol-water solution confirmed the photo-induced dehydrogenation of *m*-THPBC with its transformation to *m*-THPC. In physiological media (PBS with or without 0.4% FCS), we observed the same process of photosensitizer dehydrogenation. Finally, the FTICRMS technique with MALDI sampling demonstrated the dehydrogenation of *m*-THPBC and *m*-THPC due to the accurate identification of the characteristic ions. The MALDI-FTICRMS technique is a high-performance complementary tool which supplies us with major information on the identification of *m*-THPC and *m*-THPBC photoproducts. These results suggest that the mechanism(s) of photobleaching of chlorin photosensitizers in cells and tissue during photodynamic therapy may be complex.

Acknowledgements

This work was supported by French Ligue Nationale contre le Cancer, the Region Lorraine and the Pole Européen de Santé. The gift of *m*-THPC and *m*-THPBC from Scotia Pharmaceuticals

(Stirling, UK) is greatly appreciated. We thank Krier Gabriel and Vernex-Loset Lionel for their help with the FTICRMS analyses. We are grateful to Dr W. Amrein (Laboratorium für Organische Chemie, ETH-Zentrum, University of Zurich, Switzerland) for HiRes MALDI-FTICRMS analyses.

REFERENCES

- Bonnett R, White RD, Winfield U-J, Berenhaum M. Biochem. J. 1989; 261: 277.
- Bonnett R, Djelal BD, Hamilton PA, Martinez G, Wierrani F. J. Photochem. Photobiol. B 1999; 53: 136.
- Dolphin D. The Porphyrins. Academic Press: New York, 1978.
- Henderson BW, Dougherty TJ. Photodynamic Therapy. Marcel Dekker: New York, 1992.
- Kessel D. Advances in Experimental Medicine and Biology. Plenum Press: New York, 1992.
- Wessels JM, Spoka R, Heil P, Seidlitz HK. Int. J. Radiat. Biol. 1993; 64: 475.
- Belintchenko I, Melnikova V, Bezdetnaya L, Rezzoug H, Merlin JL, Potapenko A, Guillemin F. Photochem. Photobiol. 1998; 67: 584.
- Jones RM, Wang Q, Lamb JH, Djebal BD, Bonnet R, Lim CK. J. Chromatogr. A 1996; 722: 257.
- 9. Ma LW, Moan J, Berg K. Lasers Med. Sci. 1994; 9: 127.
- Rezzoug H, Bezdetnaya L, A'Amar O, Merlin JL, Guillemin F. Lasers Med. Sci. 1998; 13: 119.
- Forrer M, Glanzman T, Braichotte D, Wagnières G, van den Bergh H, Savary JF, Monnier Ph. SPIE Conf. Proc. 1995; 2627: 33.
- Bonnett R, Charlesworth P, Djebal BD, Foley S, McGarvey MJ, Truscott TG. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2 1999; 325.
- Grahn MF, McGuinness A, Benzie R, Boyle R, de Jode ML, Dilkes MG, Abbas B, Williams NS. J. Photochem. Photobiol. B 1997; 37: 261.
- 14. Rovers PR, de Jode ML, Rezzoug H, Grahn MF. Photochem. Photobiol. 2000; 72: 358.



- Angotti M, Maunit B, Muller JF, Bezdetnaya L, Guillemin F. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1999; 13: 597.
- Pelletier M, Krier G, Muller JF, Weil D, Johnston M. Rapid Commun. Mass Spectrom. 1988; 2: 146.
- Muller JF, Pelletier M, Krier G, Weil D, Campana J. In Microbeam Analysis, Russel PE (ed.). San Francisco Press: San Francisco, 1989, 339.
- Muller JF, Tolitte F, Pelletier M, Krier G. Brevet Français No. 8809438, 1989.
- 19. Marshall AG, Verdun FR. Fourier Transform in NMR Optical and Mass Spectrometry. A User's Handbook. Amsterdam: Elsevier, 1990.
- Cai H, Wang Q, Luo J, Lim CK. Biomed. Chromatogr. 1999; 13: 354.

Résumé

La thérapie photodynamique est basée sur l'activation par la lumière de photosensibilisants retenus par les tissus néoplasiques. Suite à l'irradiation lumineuse, ces colorants non toxiques à l'obscurité génèrent des espèces chimiques qui vont entraîner la destruction des tumeurs.

La 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine (m-THPC) est un des photosensibilisants qui a montré une activité photodynamique élevée. Malgré les études entreprises dans différents domaines, aussi bien in vitro, in vivo que clinique, les paramètres influençant la photoactivité de la m-THPC et son mode d'action ne sont pas encore totalement élucidés. C'est dans ce contexte que nous nous sommes plus particulièrement intéressés à cet agent photosensible.

L'objectif principal de notre étude est la compréhension des processus photodynamiques de la m-THPC en exploitant parallèlement les données obtenues par spectrophotométrie optique (UV/visible, fluorescence) et par spectrométrie de masse (MALDI/FTICRMS). Deux autres photosensibilisants ont également fait l'objet d'un suivi analytique à savoir la 5,10,15,20méso(tetrahydroxyphenyl) porphyrine (m-THPP) et la 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) bactériochlorine (m-THPBC).

Après analyses des empreintes spectrales des trois photosensibilisants, nous avons montré une forte dégradation de la m-THPC en milieu éthanol suite à son illumination laser, associée à la formation d'un composé dihydroxylé.

Lors de l'étude du comportement de la m-THPC et de la m-THPBC en solutions éthanol/eau et en tampon physiologique avec/sans protéines, nous avons mis en évidence un mécanisme majeur de déshydrogénation, dont le photoproduit final est la m-THPP.

Enfin, des travaux préliminaires sur les plaquettes sanguines visant à valider la méthode de caractérisation directe par MALDI/FTICRMS des photosensibilisants en milieu cellulaire ont permis de montrer la phototransformation de la m-THPC en m-THPP après illumination laser via le même processus de déshydrogénation.

Mots Clés : Photosensibilisant, Thérapie Photodynamique, Spectrométrie de masse, MALDI/FTICRMS, m-THPC, m-THPP, m-THPBC, Photooxydation, Oxygène Singulet, Déshydrogénation.

Summary

Photodynamic therapy is based on the light activation of photosensitizers localized in tumors. Such phototherapeutic compounds have no toxicity when they are not under light. However, under laser photosensitizers produce irradiation, specific chemical species that lead to tumor elimination. 5,10,15,20-meso(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) is the compound that shows the greatest photodynamic activity. Many studies dealing with this compound under various media or in clinical conditions have been carried out. However the photodynamic mechanisms are not yet explained. During this thesis, we investigated the m-THPC photodynamic processes different by physicochemistry methods : spectrophotometry (UV/Visible and fluorescence) and mass spectrometry (MALDI/FTICRMS). Moreover, we also studied the 5,10,15,20-meso (tetrahydroxyphenyl)porphyrin (m-THPP) and the 5,10,15,20-meso(tetrahydroxyphenyl)

bactériochlorine (m-THPBC) behaviors.

We determined firstly the mass fingerprints of the three considered photosensitizers. Then secondly, we considered the m-THPC photodegradation behavior in ethanol, which lead to the formation of dihydroxy-m-THPC compounds.

The study of m-THPC and m-THPBC behavior in ethanol/water or in physiological media with or without proteins, allowed us to highlight the m-THPP formation through a dehydrogenation process.

Finally, a preliminary study of m-THPC cellular medium (blood platelets), validated our direct characterization of this photosensitizer by MALDI/FTICRMS. In biological media, the dehydrogenation process of the m-THPC that gives m-THPP was also observed.

Key Words : Photosensitizer, Photodynamic Therapy, Mass Spectrometry, MALDI/FTICRMS, m-THPC, m-THPP, m-THPBC, Photooxidation, Singlet Oxygen, Dehydrogenation.