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
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

EXCLU DU PRÊT

BIBLIOTHÈQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv 2007 154 S
Cote S/M3 07/53
Loc Mag 1er étage

THESE

Ecole doctorale SESAMES

Présentée

A L'UNIVERSITE DE METZ

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PAUL VERLAINE DE METZ

Spécialité : Chimie

Par

Marc DODELLER

Analyse par Spectrométrie de Masse de l'oxygène moléculaire singulet et de protéines potentiellement ciblées au sein de cellules tumorales lors de la Thérapie Photodynamique

Le 29 Juin 2007

Rapporteurs :

Jacques Einhorn, Directeur de Recherche au Département Santé des Plantes et Environnement, INRA section protéomique, Plateforme de Spectrométrie de Masse et Chimie Analytique, Versailles.

Patricia Vicendo, Chargée de Recherche au Laboratoires des Interactions Moléculaires et Réactivité Chimiques et Photochimique (IMRCP), université Paul Sabatier, Toulouse.

Examinateurs :

Alain Van Dorsselaer, Professeur et directeur du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Département des Sciences analytiques, Institut pluridisciplinaire Hubert Curien, Université de Strasbourg.

Lina Bezdetnaya-Bolotine, Professeur Associé, au Centre Alexis Vautrin, Université Nancy I.

Benoît Maunit, Maître de Conférences au Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Université Paul Verlaine, Metz.

Directeur de thèse :

Jean-François Muller, Professeur Emérite du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Université Paul Verlaine, Metz.

BU METZ : Saulcy

0400093446

REMERCIEMENTS

Cette étude a été réalisée sous la direction de Professeur Jean-François Muller au Laboratoire de Spectrométrie de Masse et Chimie Laser de l'Université Paul Verlaine-Metz.

Monsieur le Professeur Emérite Jean-François Muller
Je vous exprime ici ma profonde et sincère gratitude pour m'avoir accueilli chaleureusement au sein de votre laboratoire, pour la confiance que vous m'avez accordé. De plus, Je vous suis profondément reconnaissant de m'avoir offert l'opportunité de présenter mes résultats au cours de congrès nationaux et internationaux, d'effectuer des formations, d'avoir mis à ma disposition les moyens matériels, financiers ainsi que vos relations pour réaliser ce travail.
Merci encore pour les encouragements et les échanges scientifiques que vous m'avez apporté.

J'adresse mon profond respect à Monsieur le Professeur Jacques Einhorn (INRA section protéomique, Versailles) et **Madame le Docteur Patricia Vicendo** (IMRCP-UMR 5623, Université Paul Sabatier, Toulouse) qui me font l'honneur d'être membre de jury de cette Thèse et d'accepter d'en être les rapporteurs.

Mes remerciements les plus sincères s'adrassent également à Monsieur le Professeur Alain Van Dorsselaer (LSMBO – UMR 7178, Strasbourg) **et à Madame Lina Bezdetnaya-Bolotine** (Professeur associée au CRAN-CAV-UMR 7039, Vandoeuvre les Nancy) pour l'honneur qu'ils me témoignent en acceptant de juger ce travail. Je tiens tout particulièrement à te remercier Lina pour l'attention toute particulière que tu as porté à ce travail. Tes remarques ont toujours été positives et constructives.

Monsieur Benoît Maunit (Maître de Conférence à l'Université Paul Verlaine-Metz)
Je souhaite te remercier tout particulièrement car tu as fait preuve tout au long de ma thèse d'enthousiasme, de disponibilité et de courage. Tu as su trouver les mots justes pour me motiver et me pousser vers l'avant lorsque c'était nécessaire. A ton contact, il m'a été possible d'apprendre énormément tant d'un point de vue scientifique, que sur le plan pédagogique. Je te remercie donc sincèrement d'avoir contribué très activement à mon encadrement.

Monsieur le Professeur François Guillemin, responsable de l'unité de recherche en thérapie photodynamique du Centre Alexis Vautrin (CRAN-CAV, Vandoeuvre les Nancy)
Je tiens à vous adresser ma reconnaissance pour l'intérêt et l'appui que vous avez apportés à la réalisation de ces travaux.

La Ligue Contre le Cancer, Région Lorraine
Je vous suis profondément reconnaissant pour le précieux soutien financier que vous m'avez accordé durant ces trois ans.

Les membres de l'équipe du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser (LSMCL)
Je remercie chaleureusement Messieurs Gabriel Krier (Ingénieur de Recherches) et Lionel Vernex-Loset (Ingénieur d'étude) pour leur assistance (les jours fériés) et leurs compétences techniques.
Je tiens également à exprimer ma gratitude à Monsieur le Directeur Jean-Jacques Gaumet (Maître de Conférences – HDR) [nihon no restoranto de tabemono wo takenai], à Messieurs Eric Millon (professeur « expatrié » à Orléans) et Frédéric Aubriet (chasseur ayant dompté la bête FT) et à madame Rachelle Chety (bientôt tu nous présentera le petit).
J'exprime toute ma reconnaissance à mes collègues et amis du LSMCL pour tous les bons moments passés ensemble ; les anciens doctorants qui m'ont accueillie au sein de la grande famille du LSMCL : Natacha "la louve" Lourette (mon mentor, elle qui m'a tout appris et qui a présent roule en gros 4x4 au States) Marc Angotti (Sponsor Bruker), Eric Erel (nihonjin iie desu, so desu ne), Jérôme Bour (le P'tit Djé) et David Ruch (l'homme du Luxembourg); notre secrétaire de choc et de charme Fidélia Boninségnia (fournisseuse officielle de café et de thé) ; les actuels qui ont partagé mon mes heures de travail et de counter-strike notamment : Jérémie Castello dit T-man (« j'ai téléchargé bleach en 1 minute 5 secondes ») que j'ai croisé très souvent les dimanches au labo, Audrey Hecka (« Alors vieux Marc tu te promènes avec ta tasse ? ») dont les "tisanes" conduiront à des grands travaux , Sébastien Killburger (notre kiki préféré), Gregory Ham dit Greg la bosse membre de l'Olympique Moléculaire, Nicolas "Exposito" dit Nico le Bo membre actif des Ennemy down, Junien "Barthen" dit Mc Adam dont les corrections interminables lui ont coûté quelques heures de sommeil, David Da Silva dit Mikeu Fickeu (mon poulain), Cyrill Guérandel (l'homme du (de) béton), Paul Hannewald (c'est pas sérieux, arrête de jouer à CS), Gilles Fraches (je prends 3 journées sur le MALDI) et les futurs...(Cyrielle ?)

Les membres de l'équipe du Laboratoire de Recherche du Centre Alexis Vautrin (CRAN-CAV, Vandoeuvre les Nancy) **et du Département de Chimie Physique des Réactions, ENSIC-INPL (Nancy),** au Pr. Jean-Louis Merlin qui m'a chaleureusement ouvert les portes de son laboratoire. Les "filles" qui m'ont toujours accueillis avec sympathie et bienveillance ; tout particulièrement Muriel Barberi-Heyob, Loraine Tirand, Noémie Thomas et Céline Frochot dont les premiers échantillons étaient parfois solubilisés dans du DMSO mais qui donnèrent néanmoins d'excellents résultats.
De moult remerciements vont également à l'encontre d'Aurélie François qui m'a maintes fois fourni en cellules afin que je puisse remplir mon devoir de doctorant.

Le Laboratoire IMAC "Mesures photophysiques et instrumentation" du Centre Alexis Vautrin (CRAN-CAV, Vandoeuvre les Nancy)
Je suis profondément reconnaissant au Dr. Jacques DIDELON qui m'a autorisé de me servir de sa plateforme d'illumination, sans laquelle je n'aurais pu mener à bien mes irradiations.

Le Laboratoire de Spectrométrie de Masse et Bio-Organique (LSMBO, Strasbourg)
Je remercie l'équipe du LSMBO qui m'a permis d'entre apercevoir le monde de la protéomique, Dr Jean-Marc Strub et plus particulièrement Madame Danièle Thierse pour m'avoir "initié" à la réalisation d'électrophorèse bidimensionnelle SDS-PAGE.

L'Ecole Doctorale SESAMES
L'aide financière que l'école doctorale SESAMES, dirigée par le Professeur Daniel Canet (Méthodologie RMN (UMR 7565 CNRS-UHP), Vandoeuvre les Nancy) m'a accordée, m'ayant permis de participer à mon premier congrès international (PDT & PDD 2006, Brixen, Italie). Je vous en suis profondément reconnaissant car j'ai pu pour la première fois présenter mes travaux à une communauté scientifique internationale.

Le GraduiertenKolleg (GRK 532)
Comment ne pas évoquer le Graduiertenkolleg, (GRK) réseau franco-allemand permettant de nombreux échanges aussi bien sur le plan scientifique que sur le plan humain.

Enfin, merci à mes amis et ma famille de m'avoir soutenu pendant ces trois ans, particulièrement ma mère pour son affection et ses nombreuses provisions, mon père dont le dévouement sans limites m'a permis de poursuivre mes études, ma soeur qui me soutenait malgré la distance et ma Sophie qui veillait sur moi tout en supportant mes absences notamment le soir, le week-end et les jours fériés.

Merci à Hewlett Packard et à Canon pour avoir construis des imprimantes et des photocopieurs de qualité.

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GENERALE 1

Chapitre I - La Thérapie Photodynamique

1. Origine et applications du traitement PDT 8

1.1. Historique 8

1.2. La thérapie photodynamique – son intérêt 11

2. Les mécanismes de la PDT 12

2.1. Les mécanismes photochimiques de la PDT 12

2.2. Le rôle de l'oxygène moléculaire 14

2.2.1. Génération d'espèces oxygénées réactives (ROS) 14

2.2.2. Action de l'oxygène singulet au niveau cellulaire 16

2.2.2.1. Dommages cellulaires directs 18

2.2.2.2. Dommages cellulaires indirects 20

2.3. Les sources lumineuses destinées à la PDT 22

2.3.1. Les différentes sources lumineuses 22

2.3.2. Dosimétrie lumineuse 28

2.4. Sources lumineuses utilisées lors de nos études en PDT 30

3. La nature des agents thérapeutiques utilisés en PDT **36**

3.1. Critères du photosensibilisateur idéal 36

3.2. Nomenclature de porphyrines 37

3.3. Photosensibilisateurs naturels ou partiellement synthétiques. 39

3.4. Photosensibilisateurs synthétiques. 44

3.5. Agents thérapeutiques commercialisés. 45

3.5.1. Photofrin® 45

3.5.2. L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) 46

3.5.3. La Visudyne® 47

3.5.4. La méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC, Foscan®) 48

3.6. Les photosensibilisateurs de 3ème génération. 52

4. De la PDT vers la spectrométrie de masse **58**

Chapitre II - Spectrométrie de masse et spectroscopie - Partie instrumentale

1. Les différentes sources d'ionisation **64**

1.1. L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (matrix assisted laser desorption/ionization : MALDI) 65

1.1.1. Historique 65

1.1.2. Principe de la technique MALDI 66

1.1.3. La formation des ions 67

1.1.3.1. Désorption et formation des ions 67

1.1.4. Réactions secondaires dans le nuage gazeux 69

1.1.5. Conditionnement du support d'analyse – échantillonnage MALDI 72

1.1.5.1. Le conditionnement de l'échantillon 72

1.1.5.2. Les différents types de dépôts usuels 73

1.1.5.3. La matrice 74

1.1.5.4. Sélection de la matrice dans le cadre de notre étude 75

1.1.5.5. Etalonnage des spectres de masse 78

1.1.5.6. Conclusion 81

1.2. La source d'ionisation par électronébulisation (électrospray, ESI) 81

1.2.1. Le principe 81

1.2.2. La formation des ions dans le nuage gazeux 83

1.2.2.1. Formation du Spray 83

1.2.2.2. La fission des gouttelettes 83

1.2.2.3. La formation des ions en phase gazeuse 83

1.2.2.4. Le calcul de la masse 86

1.2.3. Spécificité de notre source électrospray 89

2. Les spectromètres de masse utilisés lors de nos études. 91

2.1. Le spectromètre de masse à temps de vol (Time of Flight : TOF) 91

2.1.1. Principe de l'analyseur à temps de vol (TOF) 92

2.1.2. Evolution de la technique TOF/MS 95

2.1.2.1. Le retard à l'extraction "Delay extraction" 96

2.1.2.2. Le miroir électrostatique (le réflectron) 98

2.1.3. Technique d'analyse à partir d'un ion présélectionné 100

2.1.4. Spécificités et limitations du spectromètre de masse à temps de vol utilisé lors de nos recherches 103

2.1.4.1. Avantages et inconvénients du MALDI-TOF/MS 104

2.2. Le spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions (FT-ICR) 105

2.2.1. Historique 105

2.2.2. Principe du spectromètre à résonance cyclotronique des ions 106

2.2.3. Le piège de Penning et technique ICR (Ion Cyclotron Resonance) 108

2.2.3.1. Le piège de Penning 108

2.2.3.2. La cellule d'analyse FT-ICR 111

2.2.4. Mesure de la fréquence cyclotronique 112

2.2.5. Performances et limitations de l'instrument ICR 116

2.2.5.1. Précision en masse et résolution 116

2.2.5.2. Les modes de fragmentations 118

2.2.6. Transfert des ions de la source vers la cellule 123

3. Les techniques de spectrophotométrie et de microscopie 127

3.1. La spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible 127

3.1.1. Le principe 127

3.2. Le microscope à épifluorescence 129

4. Echantillonnage et protocole d'irradiation laser 133

4.1. Echantillonnage 133

4.1.1. Les composés étudiés 133

4.1.2. Mise en solution des échantillons 133

4.1.3. Le milieu cellulaire 134

4.2. Protocole d'illumination 134

4.2.1. Protocole d'illumination de solution aqueuse 135

4.2.2. Protocole d'illumination laser des monocouches cellulaires 136

Chapitre III - L'oxygène moléculaire singulet - Etude par MALDI-TOF/MS de la production *in situ* d'oxygène moléculaire singulet en milieu aqueux et en milieu cellulaire

1. Oxygène moléculaire singulet – historique 141

2. Etats électronique de l'oxygène 142

3. Production et durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet 146

3.1. Formation de l'oxygène moléculaire singulet 146

3.1.1. La production d'oxygène moléculaire singulet par voie chimique 146

3.1.2. Production d'oxygène moléculaire singulet par décomposition de l'ozone 148

3.1.3. Production d'oxygène moléculaire singulet par décharge électrique 149

3.1.4. Production d'oxygène moléculaire singulet par excitation directe 149

3.2. Durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet. 150

4. Réactions caractéristiques de l'oxygène moléculaire singulet 153

4.1. Cycloaddition [2+4] : formation d'endoperoxyde 153

5. Techniques de mise en évidence de l'oxygène moléculaire singulet 156

6. Etude de la sonde 1,3-DiphénylisoBenzoFurane (DPBF) par MALDI-TOF/MS 161

7. Etude par microscopie à épifluorescence 176

8. Etude par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS de l'internalisation de la sonde DPBF au sein de cellules HT29 **181**

9. Mise en évidence de l'oxygène moléculaire singulet au sein de cellules intactes HT29 par spectrométrie de masse. **186**

Conclusion **193**

Chapitre IV - Etude par spectrométrie de masse de l'empreinte protéique dans le cadre de la thérapie photodynamique, Approche protéomique

1. Etude par MALDI-TOF/MS de la distribution des protéines directement sur cellules intactes **197**

1.1.Etudes de monocouches cellulaires. 197

2. Etude par MALDI-FT-ICR/MS de la distribution de protéines - approche protéomique **209**

2.1. la protéomique – définition 209

2.2. Les stratégies d'identification 209

2.2.1. Utilisation du mode de fragmentation ECD dans le cadre de l'étude protéomique Top-Down de la mélittine 212

2.2.2. Utilisation du mode de fragmentation IRMPD dans le cadre de l'étude protéomique Top-Down de la mélittine 214

2.3. La stratégie Bottom-Up 217

2.3.1. Les principes de la protéomique 217

2.3.1.1. Historique 217

2.3.1.2. Le gel d'électrophorèse bidimensionnel 218

2.3.1.3. Principe du gel 2D 219

2.3.1.4. Coloration des protéines 227

2.3.1.5. Analyse des gels 229

2.4. Stratégie d'identification des protéines 231

2.4.1. Les banques de données 231

2.4.2. Le moteur de recherche Mascot 232

2.4.3. Identification 237

2.4.4. Calibration des spectres de masses liées aux analyses en protéomiques 240

2.5. Analyses protéomiques appliquées à la thérapie photodynamique 245

2.6. Analyses protéomiques par spectrométrie de masse 251

2.6.1. Résultats de l'analyse 251

CONCLUSION GENERALE 256

PERSPECTIVES 260

ANNEXES

Listes des Figures

Liste des Tableaux

Articles

RESUMES

INTRODUCTION GENERALE

La thérapie photodynamique (PDT, *photodynamic therapy*) associe une lumière laser, de longueur d'onde spécifique, à un médicament sensible à cette longueur d'onde, le photosensibilisateur tel que le Photofrin® ou le Foscan® , qui ont obtenu l'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) en 1997 pour le premier, dans le traitement des rechutes des cancers bronchiques et des cancers de l'œsophage ; en 2002 pour le second, dans le traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou. L'agent photosensible est injecté dans la circulation sanguine ou appliqué localement pour un traitement cutané. Une fois dans le sang, il se lie à des lipoprotéines qui le convoient vers les différents tissus ; dans l'idéal, il pénètre préférentiellement dans les tissus cancéreux pour des raisons diverses liées en partie à la texture histopathologique du tissu cancéreux (richesse vasculaire, anarchie du drainage lymphatique, large secteur interstitiel, abondance de macrophages) et à l'hydro et liposolubilité du photosensibilisateur facilitant sa pénétration dans les cellules néoplasiques.
Dans un deuxième temps, l'illumination en lumière visible (600 à 900 nm) de la tumeur, par un rayon laser dirigé par l'intermédiaire d'une fibre optique et d'un diffuseur de lumière, active le médicament ; lequel produit une forme excitée de l'oxygène, l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$, et/ou de processus radicalaires, source d'effets toxiques pour les cellules tumorales. La durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet est comprise entre 1 et 3 ms dans l'eau et diminue fortement dans les systèmes cellulaires où elle est d'environ 100 ns dans les milieux lipidiques et de 250 ns dans le cytoplasme. Par ailleurs, la distance de pénétration dans les cellules de l'oxygène singulet ne semble pas dépasser 45 nm alors que la taille de celles-ci est d'approximativement 10 à 100 mm. Par conséquent, l'endroit où est générée cette forme particulièrement réactive de l'oxygène détermine la nature des structures subcellulaires qui vont pouvoir être atteintes et dégradées. La cytotoxicité induite par la PDT est principalement le fait de phénomènes d'oxydation entraînant la dégradation des acides aminés, de certaines bases nucléiques et des lipides composant les membranes cellulaires (mort cellulaire par nécrose) et les mitochondries, ces dernières jouant un rôle majeur dans la mort cellulaire par apoptose. Intérêt capital par rapport aux traitements classiques, cette toxicité n'est pas mutagène et reste limitée aux tissus qui sont illuminés ; elle n'induit donc pas les effets secondaires que l'on connaît avec la chimiothérapie (modifications de la formule sanguine, troubles digestifs, chute des cheveux, fatigue). Ainsi, administrée lors des stades précoces de la tumeur, la PDT est susceptible d'éliminer totalement une tumeur de quelques millimètres de diamètre, accessible directement ou par voie endoscopique.

Le photosensibilisateur 5,10,15,20-*meso*(*tetra*hydroxyphenyl) chlorine (*m*-THPC) ou Foscan®, dit de seconde génération, présente plusieurs avantages : une grande pureté, un fort coefficient d'absorption dans le rouge, une photocytotoxicité élevée et un rendement quantique important. Enfin, elle est vite assimilée par le corps ce qui limite les problèmes de photosensibilité cutanée post-traitement. Toutefois, même si ce composé a prouvé son efficacité, les paramètres influençant l'activité photodynamique de la *m*-THPC et son mode d'action ne sont pas vraiment élucidés et ceci malgré les études entreprises dans différents domaines, aussi bien *in vitro*, *in vivo* qu'en clinique. C'est pour ces raisons que nous nous sommes plus particulièrement intéressés à cet agent photosensible.

L'objectif principal de notre étude s'oriente selon deux axes : en premier lieu, la mise au point d'un protocole permettant la détection in situ, par spectrométrie de masse, de l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ au sein de cellules tumorales intactes ; en second lieu, la mise en place d'une approche protéomique afin de caractériser des protéines potentiellement impliquées dans les mécanismes de mort cellulaire suite à l'application de la thérapie photodynamique. Les atouts et les capacités de la technique de désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) couplée d'une part à un spectromètre de masse à temps de vol (TOFMS) et d'autre part à un spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ion à transformée de Fourier (FTICRMS) associée à la spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible et de fluorescence, sont mises à profit dans le but d'étudier la molécule *m*-THPC avant et après traitement laser.

Le mémoire s'articulera ainsi autour de quatre chapitres structurés de la façon suivante pour amener des réponses aux deux objectifs cités ci-dessus :

Le **chapitre I** sera consacré à une présentation de la thérapie photodynamique (PDT) et de ses applications cliniques. Il sera également question 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 sources lumineuses utilisées dans le cadre de la thérapie photodynamique et sur la nature des différents photosensibilisateurs existants. De même, seront présentés les travaux antérieurs relatifs au photosensibilisateur utilisé lors de nos recherches, le Foscan®. Etudes, qui ont permis d'initier l'étude des interactions médicaments/protéines dans le cadre de la PDT.

Le **chapitre II** fera l'objet de la description des méthodes d'analyses par spectrométrie de masse à temps de vol et à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier couplée à la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI) d'une part et par spectrophotométrie UV-visible et microscopie à épifluorescence d'autre part utilisées lors de notre recherche. Une description du protocole d'illumination laser des solutions et des cellules sera également abordée.

Le **chapitre III** sera consacrée au protocole mis en œuvre afin d'aboutir à la caractérisation par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS de la formation d'oxygène singulet $^1O_2$, via l'emploi de la sonde moléculaire 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF), en solution éthanol/eau (1/99, v/v) et au sein de cellules intactes d'adénocarcinome humain HT29 après illumination laser. Ces études ont demandé des optimisations qui concernent notamment le choix de solvatation de la matrice MALDI (2,5 DHB) ainsi que la confirmation comme quoi nos composés d'intérêt, à savoir le Foscan et la sonde moléculaire DPBF étaient bien internalisées au sein de nos cellules.

Enfin, la mise en place d'une démarche protéomique offrant la possibilité de caractériser par MALDI-FT-ICR/MS des protéines susceptibles d'être impliquées dans le processus de la thérapie photodynamique seront rapportés dans le **chapitre IV**. Nous y discuterons du choix des calibrants en masse, de l'optimisation de la lecture des gels électrophorétiques bidimensionnels notamment grâce au logiciel ImageMaster 2D Platinum (GE healthcare, Suisse) qui nous permet d'accéder à des données tant qualitatives que quantitatives et enfin sur l'apport de la spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier couplée à la désorption/ionisation laser assistée par matrice (MALDI-FT-ICR/MS).

✧✧✧

Chapitre I

La Thérapie Photodynamique

TABLE DES MATIERES

1. Origine et applications du traitement PDT 8

1.1. Historique 8

1.2. La thérapie photodynamique – son intérêt 11

2. Les mécanismes de la PDT 12

2.1. Les mécanismes photochimiques de la PDT ..... **Erreur ! Signet non défini.**

2.2. Le rôle de l'oxygène moléculaire 14

2.2.1. Génération d'espèces oxygénées réactives (ROS) 14

2.2.2. Action de l'oxygène singulet au niveau cellulaire 16

2.2.2.1. Dommages cellulaires directs 18

2.2.2.2. Dommages cellulaires indirects 20

2.3. Les sources lumineuses destinées à la PDT 22

2.3.1. Les différentes sources lumineuses 22

2.3.2. Dosimétrie lumineuse 28

2.4. Sources lumineuses utilisées lors de nos études en PDT 30

3. La nature des agents thérapeutiques utilisés en PDT 36

3.1. Critères du photosensibilisateur idéal 36

3.2. Nomenclature de porphyrines 37

3.3. Photosensibilisateurs naturels ou partiellement synthétiques. 39

3.4. Photosensibilisateurs synthétiques. 44

3.5. Agents thérapeutiques commercialisés. 45

3.5.1. Photofrin® 45

3.5.2. L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) 46

3.5.3. La Visudyne® 47

3.5.4. La méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC, Foscan®) 48

3.6. Les photosensibilisateurs de 3ème génération. 52

4. De la PDT vers la spectrométrie de masse 58

Chapitre I

La Thérapie Photodynamique

La thérapie photodynamique ou thérapie photochimique est un traitement qui repose sur l'activation d'un agent photosensible préférentiellement retenu par des cellules et tissus tumoraux. L'activation de ce médicament va conduire à la formation d'espèces hautement réactives de l'oxygène tel que l'oxygène dit singulet ($^1O_2$).

Les nombreux travaux de recherches relatifs à ce traitement permettent la mise au point de nouveaux composés et de nouveaux protocoles conduisant à l'éradication de plus en plus poussée des tissus malins traités.

Dans ce chapitre nous allons présenter les paramètres liés au traitement photochimique à savoir l'oxygène, l'illumination et l'agent photosensible ou encore appelé photosensibilisateur. Les deux derniers paramètres seront particulièrement détaillés car ils sont les seuls sur lesquels on peut agir afin d'optimiser et améliorer les soins.

1. Origine et applications du traitement PDT

1.1. Historique

Le concept de photothérapie est connu depuis l'antiquité. Hippocrate (460-375 avant J.-C.) évoque l'utilisation de l'héliothérapie (thérapie par la lumière solaire) dans le traitement de plusieurs maladies humaines. Mais le terme photothérapie est seulement apparu en 1903 avec les travaux de Niels Rydberg Finsen (Prix Nobel de médecine et de physiologie). Sa principale contribution au domaine de la photothérapie est l'utilisation d'une lampe à arc électrique filtrée par de l'eau afin de limiter le rayonnement infra-rouge (thermique) pour traiter et guérir la tuberculose cutanée "Lupus vulgaris", maladie de la peau courante dans les pays nordiques.

Mais c'est en 1900 que naît réellement le concept de photothérapie antitumorale. Raab rapporte que lors d'une étude sur la paramécie la combinaison de l'acridine orange et de la lumière peut détruire l'organisme[1]. Puis en 1903, Joseionek et Van Tappeiner proposent plusieurs applications dermatologiques. Ils décrivent des expériences dans lesquelles des tumeurs épithéliales et des lésions de tuberculose cutanée ont été traitées par l'action combinée de la lumière et de l'éosine (tetrabromofluoresceïne) appliquées localement.

Par la suite, les divers travaux s'appuient sur les propriétés de fluorescence de composés afin de visualiser les zones cancéreuses. Entre 1940 et 1960, Figge et coll.[2] et Rasmussen-Taxdal et coll.[3] administrent une porphyrine naturelle (l'hématoporphyrine, Hp, Figure I.1.) à des patients et des animaux afin de détecter plus facilement les tissus tumoraux par fluorescence. Ils prouvent ainsi l'affinité spécifique des composés pyrroliques pour les petites tumeurs de la trachée.

De même en 1960, Lipson[4] à la clinique de Mayo, observe que l'injection d'une préparation d'hématoporphyrine entraîne la fluorescence de lésions néoplasiques, faisant par la même de l'hématoporphyrine un outil diagnostique indispensable pour la localisation des cancers. Cependant, un inconvénient majeur était la dose importante nécessaire lors des injections qui conduisaient à une forte photosensibilité cutanée. Auparavant des études menées par Schwartz[5] avaient déjà mis en évidence en 1955 que la solution d'hématoporphyrine était en fait un mélange de plusieurs porphyrines.

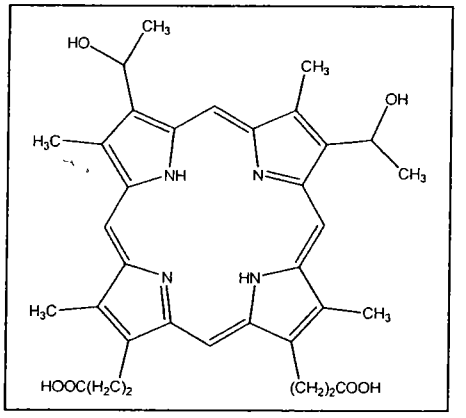


Figure I. 1 Hématoporphyrine (Hp)

1 (1) Raab, O. *Z. Biol.* **1900**, *39*, 524-546.
2 (2) Figge, F.; Weiland, G.; Manganiello, L. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1948**, *68*, 143-146.
3 (3) Rasmussen-Taxdal, D.; Ward; D. Figge *F. Cancer* **1955**, *8*, 78-81.
4 (4) Lipson, R. L.; Baldes, E. J. *Arch. Dermatol.* **1960**, *82*, 508–516.
5 (5) K.Schwartz, S.; Absolon, K.; Vermund, H. *Univ. Minn. Med. Bull* **1955**, *1955*.

Pour résoudre les problèmes liés à ce photosensibilisateur, Schwartz, mit au point un mélange à base d'hématoporphyrine obtenus dans un premier temps par l'action d'acide sulfurique et d'acide acétique sur la préparation brute d'hématoporphyrine puis en second temps par l'action d'hydroxyde de sodium. Cette préparation fut appelée "dérivé de l'hématoporphyrine (HpD)".

De ce fait, en 1961, Lipson[6] reconnaît que l'HpD est plus efficace que son produit d'origine dans la détection par endoscopique de tumeurs malignes de la trachée. C'est en 1966 que le premier traitement photodynamique d'un cancer du sein voit le jour par l'utilisation de HpD associé à d'autres porphyrines telles que la protoporphyrine (PpIX) et l'uroporphyrin[7]. Quelques jours après l'injection des agents photosensibles par voie intraveineuse, la zone tumorale est éclairée par une lampe au mercure délivrant une longueur d'onde d'environ 400nm, correspondant à la longueur d'onde d'absorption de l'agent photosensible. Ceci marque véritablement le début de la thérapie par l'action de la lumière.

Finalement, au début des années 70, suite à des travaux sur des tumeurs animales, Dougherty[8,9] propose d'utiliser l'HpD comme photosensibilisateur et réalise les premiers essais in vivo en 1975 sur des tumeurs implantées chez des souris et des rats. Puis en 1976, un premier cancer de la vessie est traité par l'HpD irradié par une lumière blanche[10].
L'HpD contient plusieurs porphyrines, sous forme monomère, dimère et oligomère[11]. Sa purification donne lieu aujourd'hui à des variantes commerciales comme le Photofrin®[12], un photosensibilisateur considéré comme le produit phare de la PDT. Existent à coté de celui-ci, des photosensibilisateurs tels que le Photosan®, le Photocarcinorin® et le Photogem® destinés respectivement aux traitement des carcinomes de l'œsophage[13,14] et des cancers au niveau de la nuque[15].
Actuellement en France et ce depuis juin 2002, seuls deux photosensibilisateurs anticancéreux ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) : le Photofrin II®, en 1996, racheté en

---

6 (6) Lipson, R.; Baldes, E.; Olsen, A. J. *Natl. Cancer Inst.* **1961**, *26*, 1-11.
7 (7) R.Lipson; Gray, M.; Baldes, E. **1966**, Cancer Congr. Tokyo.
8 (8) Dougherty, T. J. *Clin. Laser Med. Surg.* **1974**, *52*, 1333-1336.
9 (9) Dougherty, T.; Grinder, G.; Weishaupt, K.; J.Boyle, D. *Natl. Cancer Inst.* **1975**, *55*, 115.
10 (10) Kelly, J.; Snell, M. *J. Urology* **1976**, *53*, 1942.
11 (11) Moan, J. *Photochem. Photobiol* **1986**, *43*, 681-690.
12 (12) Pandey R.K.; Sumlin A.B.; Constantine S.; Aoudia M.; Potter W.R.; Bellnier D.A.; Henderson B.W.; Rodgers M.A.; Smith K.M.; Dougherty T.J. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 194-204.
13 (13) Miller, K. *Urological Research* **1991**, *19*.
14 (14) Zhang, N. Z. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2007**, *4*, 60-64.
15 (15) Bae, S. M. *Cancer Research and Treatment* **2003**, *35*, 549-556.

2000 par Axcan-Pharma (Canada) pour le traitement des récidives des cancers bronchiques et des cancers de l'œsophage et le Foscan®, propriété de la firme Biolitec Pharma, en 2001, pour le traitement palliatif des tumeurs de la sphère ORL. D'autres molécules sont en cours de développement et font l'objet d'évaluations cliniques. Enfin, la Visudyne®, utilisée dans le traitement de la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge), développée par QLT et licenciée à Novartis Optalmics, a reçu l'AMM pour l'Union Européenne en août 2000.

1.2. La thérapie photodynamique – son intérêt

Le domaine d'application principal de la thérapie photodynamique est la cancérologie. Les photosensibilisateurs s'accumulent préférentiellement dans les tissus néoplasiques ce qui permet a priori une destruction sélective de la tumeur. Toutefois la différence de concentration entre tissus tumoraux et sains est souvent faible et on observe cependant une forte rétention dans un certain nombre d'organes sains comme le foie, la rate, les reins et, dans une moindre mesure, la peau. La lenteur d'élimination du photosensibilisateur du tissu cutané est à l'origine de l'effet secondaire majeur de la thérapie photodynamique, la photosensibilisation solaire du patient persiste plusieurs semaines après l'injection du produit. Les indications sont variées : traitement palliatif de cancers évolués et obstructifs trachéo-bronchiques ou œsophagiens, traitement à but curatif des petits cancers dans ces mêmes localisations et des cancers multifocaux comme ceux de la vessie. En dermatologie, la qualité du résultat cosmétique pourrait justifier cette technique pour des cancers cutanés[16]. Il existe également des indications potentielles en neurochirurgie[17], ophtalmologie[18], et la gynécologie[19]. La PDT peut également s'appliquer à des lésions précancéreuses comme les dysplasies du bas œsophage secondaires à une œsophagite par reflux gastro-œsophagien[20].

Depuis l'emploi de cette nouvelle technique en clinique, il y a maintenant dix ans, de nombreux travaux visant à améliorer l'efficacité de cette thérapie ont été mis en œuvre et sont encore en cours de développement. Ces travaux portent sur les trois éléments majeurs de la thérapie photodynamique à savoir la lumière, le photosensibilisateur et l'oxygène.

---

16 (16) Kormeili, T. *British Journal of Dermatology* **2004**.

17 (17) Kostron, H. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *36*.

18 (18) Brown, G. C.; M. M. Brown; Campanella, J.; Beauchamp, G. R. *American Journal of Ophthalmology* **2005**, *140*, 679.

19 (19) Hillemanns *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology* **2001**, *15*.

20 (20) Maunoury, V. *Hépato-Gastro* **2007**, *14*.

Concernant la lumière, nous aborderons les différentes sources lumineuses qui ont été développées afin de permettre une illumination optimale selon le traitement considéré. Quant aux travaux en rapport avec l'oxygène et le photosensibilisateur, ils reposent essentiellement sur études concernant l'activation du photosensibilisateur aux hautes longueurs d'onde, la synthèse d'édifices propices à générer une des espèces oxygénées réactives (tel que des radicaux hydroxylés et anions superoxydes, des peroxyde d'hydrogènes et de l'oxygène singulet) ou la vectorisation d'agents photosensibles permettant une meilleure solubilisation ou un meilleur ciblage des cellules cancéreuses.

2. Les mécanismes de la PDT

2.1. Les mécanismes photochimiques de la PDT

Une réaction photochimique est décrite comme une réaction ayant lieu par absorption d'un ou plusieurs photons[21]. L'observation d'une relation entre la lumière absorbée et l'effet chimique qui en résulte a été tout d'abord mise en évidence à partir de considérations théoriques, par T. von Grotthuss en 1817 puis redécouvert, en 1841, par J. W. Draper, à la suite de ses expériences sur la combinaison de l'hydrogène avec le chlore. La loi énoncée alors correspond à la loi fondamentale de la photochimie, connue sous le nom de loi de *Grotthus-Draper*. Elle spécifie que: "*seule la radiation absorbée par un système peut initier une réaction photochimique*".

Lors d'une absorption de photon par un photosensibilisateur, trois chemins sont examinés :
i) La première étape concerne l'excitation du photosensibilisateur (P) par émission lumineuse (figure I.2). L'absorption d'un photon d'énergie hν, par le photosensibilisateur, entraîne le passage du niveau d'énergie le plus bas ou fondamental (S_0) à un niveau d'énergie supérieur ; le photosensibilisateur est alors dans un état singulet excité (S_1 ou S_2) de plus hautes énergie. Un électron va être promu de l'orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie (HOMO) à l'orbitale moléculaire non-occupée de plus basse énergie (LUMO). Puis en un temps très court (10^{-4} s), la molécule photosensible va subir un processus non-radiatif appelé une conversion interne (CI) pour revenir à l'état singulet excité (S_1). L'état excité instable (état

[21] (21) Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 145-157.

singulet) a une durée de vie réelle évaluée en général entre 10^{-12} et 10^{-7}s, selon le type de molécules.

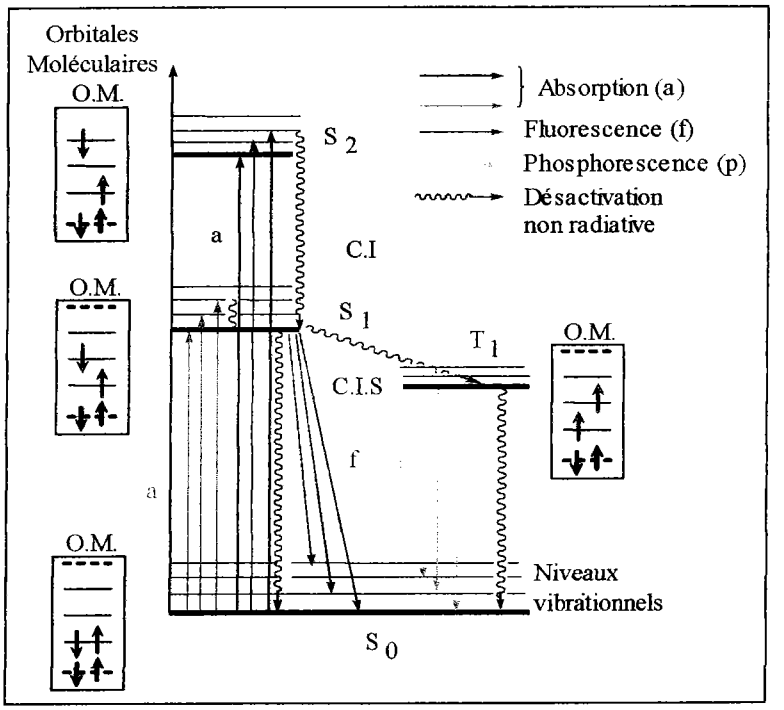


Figure I. 2 Diagramme de Jablonsky : absorption et évolution des états électroniques excités. Positions relatives des spectres d'absorption, de fluorescence (en bleu) et de phosphorescence

Deux voies sont alors possibles pour retrouver l'état fondamental :

ii) A partir du niveau d'énergie S_1, le photosensibilisateur va rejoindre directement son niveau énergétique le plus bas (S_0) selon différents processus : soit par émission de chaleur, soit par fluorescence. D'un point de vue clinique, l'émission de fluorescence permet de proposer un diagnostic sur la présence d'une zone tumorale. Notons que les émissions radiatives ont lieu à partir des niveaux vibrationnels zéro des états excités du à une relaxation vibrationnelle très rapide de l'ordre de10^{-13} à 10^{-12} s.

iii) Le photosensibilisateur peut aussi passer par un processus dit Croisement Inter Système (CIS). Toutefois, la durée de vie de l'état singulet doit être suffisamment longue pour le permettre. Il est basé sur une transition entre deux états électroniques de spin différents permettant le passage d'un état singulet à un état triplet. Ces processus de désactivation sont souvent appelés processus de *quenching* ou d'inhibition de fluorescence. Dans le cas de la phosphorescence, on passe d'un état singulet excité S_1 à un état triplet excité T_1 qui

correspond à l'état métastable dont la durée de vie est plus longue que celle de l'état singulet et peut être comprise entre 10^{-3} et quelques secondes.
Cette état "photoactif" confère ainsi au photosensibilisateur d'avantage de temps pour réagir chimiquement avec les molécules environnantes (réactions de type I et II). L'agent photosensible perd ainsi son excédent d'énergie et revient à son état fondamental.

Enfin, la dernière étape concerne le retour de l'état T_1 à l'état fondamental. Dans ce cas, le passage à l'état fondamental est très lent et est considéré comme une transition interdite (une transition entre deux états ayant une multiplicité de spin différente est théoriquement interdite). Le photosensibilisateur peut se désactiver par phosphorescence ou en réagissant avec son environnement.

2.2. Le rôle de l'oxygène moléculaire

2.2.1. Génération d'espèces oxygénées réactives (ROS)

Le mécanisme dit de **type I** implique la participation du photosensibilisateur à l'état excité singulet ($^1P^*$) ou triplet ($^3P^*$) dans un processus de transfert d'hydrogène ou d'électrons avec des substrats biologiques. Le transfert d'hydrogène vers le photosensibilisateur entraîne la formation de radicaux libres, chargés ou neutres alors que le transfert d'électron génère quant à lui une forme ionique chargée.

$$^3P^* + RH \xrightarrow[\text{Transfert d'hydrogène d'électron}]{} PH^\bullet + R^\bullet$$

$$^3P^* + R \xrightarrow[\text{Transfert d'électron}]{} \begin{cases} P^{\bullet -} + R^{\bullet +} \\ P^{\bullet +} + R^{\bullet -} \end{cases} \quad \text{ou}$$

Après interaction avec l'oxygène moléculaire, ces produits fournissent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme des ions superoxydes $O_2^{\bullet -}$ et/ou $ROO^\bullet$. Cette combinaison va aboutir à la formation de produits à fort potentiel d'oxydation.

$$R^{\bullet} + {}^3O_2 \longrightarrow ROO^{\bullet}$$

$$ROO^{\bullet} + PH^{\bullet} \longrightarrow {}^0P + ROOH$$

$$P^{\bullet -} + {}^3O_2 \longrightarrow {}^0P + O_2{}^{\bullet -}$$

Le mécanisme de **type II** implique, quant à lui, le transfert de l'énergie d'excitation du photosensibilisateur dans son état triplet vers l'oxygène moléculaire à l'état fondamental (état triplet) pour former une espèce d'oxygène excitée de courte durée de vie mais extrêmement réactive et cytotoxique[22], nommée oxygène moléculaire singulet ($^1O_2$). La compétition entre ces deux mécanismes est contrôlée par plusieurs paramètres tels que la nature du sensibilisateur et la concentration en oxygène.

$$^3P^* + {}^3O_2 \longrightarrow {}^0P + {}^1O_2 \qquad (94{,}2\ KJ.mol^{-1})$$

La phototoxicité des agents photosensibles est dépendante de la concentration en oxygène dans le milieu. En résultante, cette réaction est prédominante dans les milieux oxygénés.
L'oxygène moléculaire singulet se diffuse sur une très courte distance (45 nm)[23] et réagit ainsi qu'avec des substrats environnants (RH) comme, par exemple, certains acides aminés (cholestérol) pour former des substrats oxydés (ROOH) très actifs[24].

Ceci induit une altération de bon nombre de protéines notamment membranaires. L'oxygène moléculaire singulet peut également conduire à la peroxydation de lipides insaturés. L'ensemble de ces processus va provoquer l'inactivation d'un grand nombre de constituants cellulaires importants, d'un point de vue structural mais aussi métabolique, ce qui entraîne la mort de la cellule. Les mitochondries semblent être une cible majeure de la photothérapie dynamique, car la concentration d'oxygène au niveau de ces organelles est la plus grande[25] mais d'autres cibles comme les membranes, les lysosomes ou encore le noyau ont été identifiées. En effet, il a été montré que la PDT peut se traduire directement ou indirectement par de très sérieux dommages de l'ADN[26].

---

22 (22) Weishaupt, K.; Gomer, C.; Dougherty *T. Cancer Res.* **1976**, *36*, 2326-2349.
23 (23) Moan, J. *J. Photochem. Photobiol.A: Chem.* **1990**, *6*, 343-344.
24 (24) Korytowski, W.; Girotti, A. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, *70*, 484-489.
25 (25) Fuchs, J.; Thiele, J. *Free Radical Biol Med* **1998**, *24*, 35-47.
26 (26) Duez, P. *carcinogenesis* **2001**, *22*.

L'ensemble des voies d'action de la PDT est représenté figure I.3.

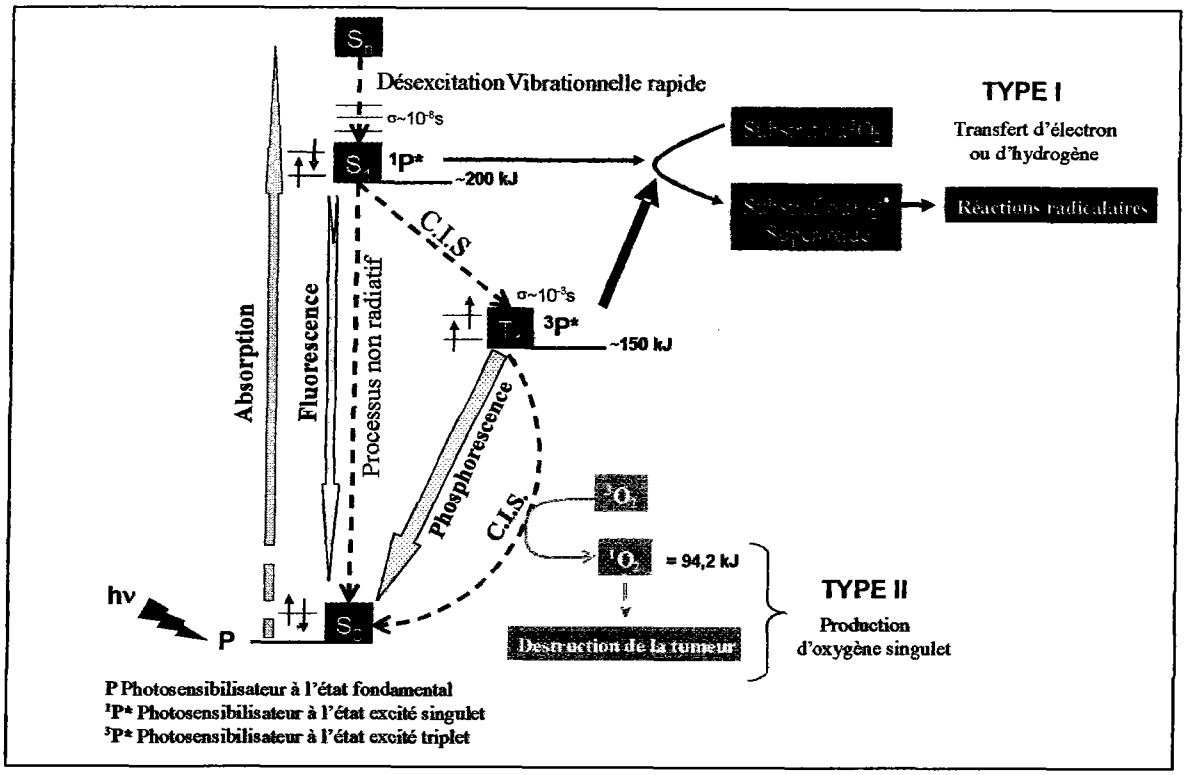


Figure I. 3 – Mécanisme photochimique de type I et II rencontrés lors des processus PDT

Finalement, la réaction photochimique est oxygéno-dépendante, l'oxygène est nécessaire à toute réaction photochimique, dans les procédés liés à la PDT. Il est maintenant couramment admis que l'oxygène moléculaire singulet est l'agent toxique principal en PDT bien que sa production soit extrêmement difficile à quantifier dans les milieux biologiques. Toutefois, il existe des sondes à oxygène moléculaire singulet (β-carotène, cholestérol) qui peuvent être utilisées pour le caractériser et en évaluer la proportion.

2.2.2. Action de l'oxygène singulet au niveau cellulaire

L'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$, formé par l'action combinée d'un photosensibilisateur, de lumière et d'oxygène, est un puissant oxydant qui réagit avec de nombreux constituants cellulaires tels le cholestérol des membranes[27], les phospholipides, les acides aminés (tryptophane, histidine, méthionine) et les acides nucléiques (Figure I.4.).

[27] (24) Korytowski, W.; Girotti, A. *Photochemistry and Photobiology* **1999**, *70*, 484-489.

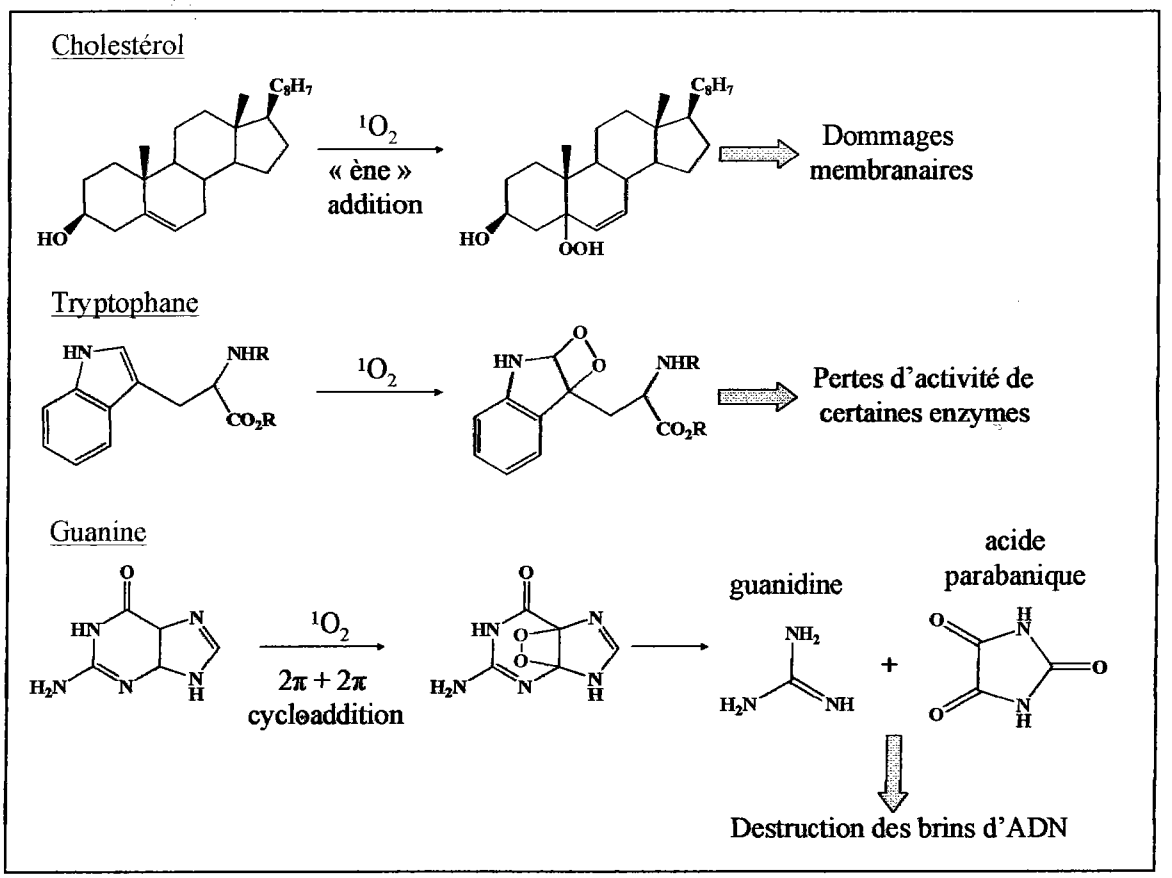


Figure I. 4 Exemples d'interaction de l'oxygène moléculaire singulet sur trois constituants cellulaires. Les réactions sont soit des oxydations (cas du cholestérol) soit des cycloadditions (cas du tryptophane et de la guanine).

Suite au traitement PDT, la mort des cellules tumorales se fait selon deux types de mécanismes :

- L'un direct provoquant des dommages cellulaires irréversibles : apoptose et/ou nécrose,
- Un mécanisme indirect provoquant des dommages vasculaires.

2.2.2.1. Dommages cellulaires directs

Concernant les dommages cellulaires directs, ceux-ci se regroupent en deux catégories : la nécrose et l'apoptose. La réponse cellulaire dépend essentiellement de la localisation du photosensibilisateur dans les cellules, de la concentration de celui-ci, du type de la lignée cellulaire et de la dosimétrie.

Dans le cas de la nécrose, il s'agit d'une mort cellulaire « accidentelle » entraînant des dommages tissulaires. Lors de la nécrose, la membrane de la cellule est touchée (Figure I.5.). La perméabilité de la membrane augmente, conduisant à l'éclatement de la cellule. Son contenu est déversé dans le tissu environnant, déclenchant une réaction inflammatoire, pouvant mener à des saignements, voir des perforations dans le cas de traitement d'organes creux.

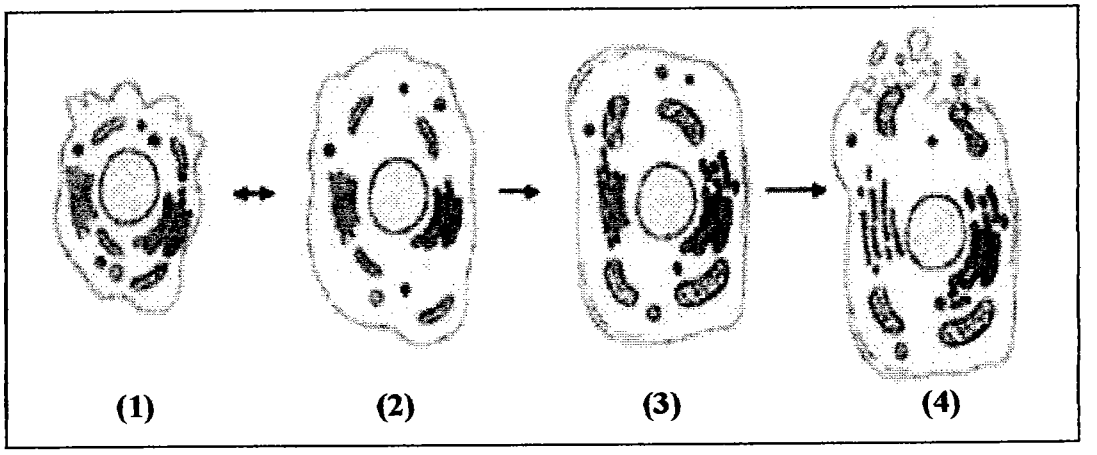


Figure I. 5. Mécanisme de la nécrose[28] : cellule normale (1), gonflement réversible de la cellule (2), gonflement irréversible de la cellule (3) éclatement de la cellule (4).

La seconde catégorie des dommages directs est l'apoptose. C'est un processus d'élimination cellulaire prédéterminé permettant le renouvellement cellulaire, il s'agit d'une mort programmée. Typiquement, les cellules d'un organisme s'autodétruisent lorsqu'elles ne sont plus utiles ou qu'elles ont un dysfonctionnement. Il s'agit d'un processus irréversible n'entraînant pas d'inflammation. L'élément clé déclenchant l'apoptose est la condensation de la chromatine (association de l'ADN à des protéines histones), suivie de la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques qui seront ensuite détruits par les globules blancs (Figure I.6.).

[28] (27) Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. *Br J Cancer* **1972**, *26*, 239-257.

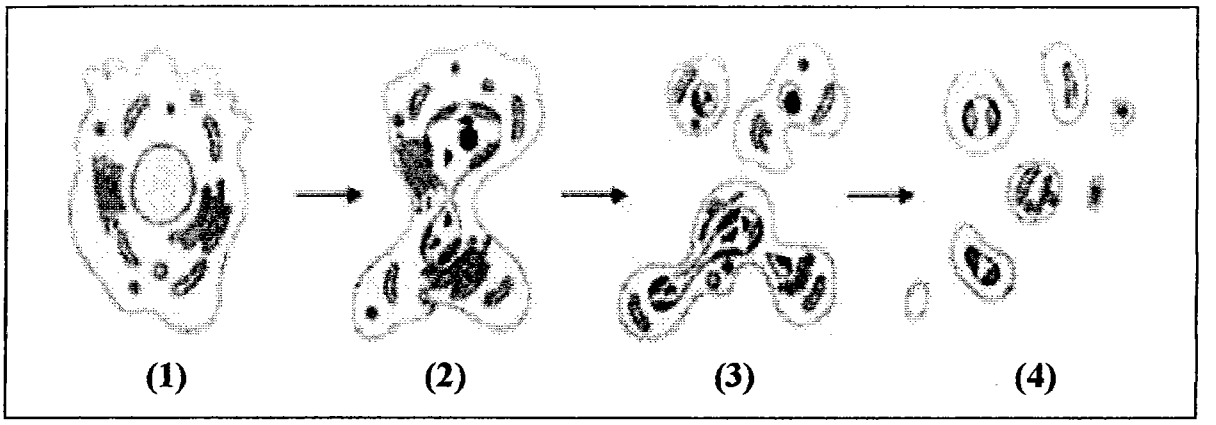


Figure I. 6. Mécanisme de l'apoptose[29] : cellule normale (1), condensation de la chromatine (2), fragmentation de cette dernière en corps apoptotiques (3). L'élimination de ces corps par phagocytose (4).

La PDT induit l'apoptose principalement par deux voies : i) la voie mitochondriale, ii) et/ou par fixation du photosensibilisateur à des récepteurs cellulaires spécifiques (Figure I.7.).

- Lorsque le photosensibilisateur est localisé au niveau des mitochondries (voie mitochondriale), celles-ci effectuent un relargage du cytochrome C qui active la protéine Apaf-1 qui entraîne l'apoptose via la caspase-3 (cysteinyl-aspartate-cleaving proteases).

- La fixation du photosensibilisateur à des récepteurs cellulaires spécifiques (désigné par voie externe) quant à elle stimule la production de ces derniers. La cellule devient plus sensible aux facteurs pro-apoptotiques induisant la mort cellulaire. Cette fixation conduit à l'activation de la caspase-8. Cette dernière clive et active la pro-caspase-3 en caspase-3 entraînant l'apoptose.

[29] (27) Kerr, J. F.; Wyllie, A. H.; Currie, A. R. *Br J Cancer* **1972**, *26*, 239-257.

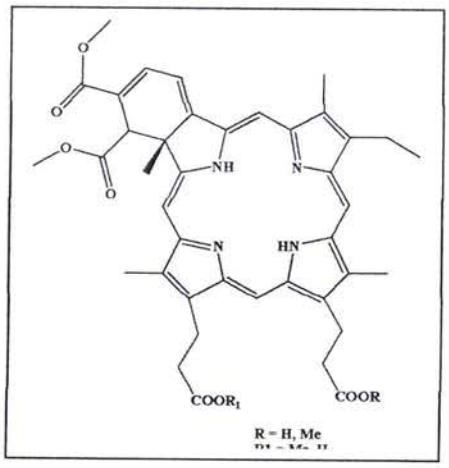


Figure I. 8. Représentation de la visudyne®

Cette pathologie est la première cause de cécité chez les personnes de plus de 65 ans dans les pays développés. La DMLA se caractérise par la formation de néovaisseaux choroïdiens non étanches qui croissent sous et à travers la macula provoquant sa destruction et à terme une perte de la vision (Figure I.9.). Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la DMLA. L'action vasculaire de la thérapie photodynamique permettant la fermeture de ces néovaisseaux par thrombose sans endommager les photorécepteurs et la vascularisation rétinienne normale.

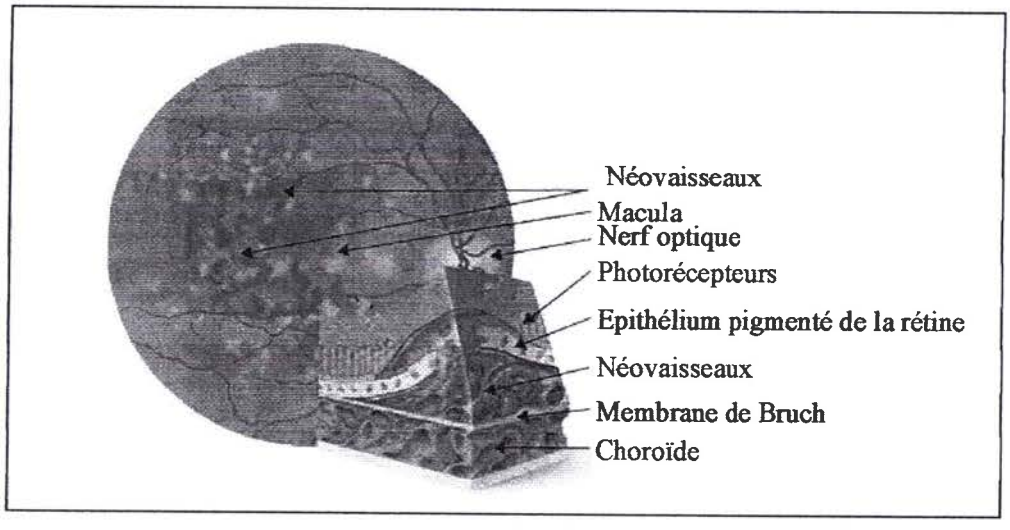


Figure I. 9. DMLA caractérisée par la formation de néovaisseaux choroïdiens non étanches localisés au niveau de la macula (source : http://www.amdcanada.com/)

Actuellement, un nouvel agent photosensible est en cours de développement il s'agit du Tookad® (palladium-bacteriopheophorbide), composé dont le mode d'action est vasculaire.

L'action du photosensibilisateur a été illustrée lors d'un traitement PDT appliqué au système vasculaire d'œufs fertilisés[32] (Figure I.10.).

Il est visible que seul le réseau vasculaire illuminé est sujet à des dégâts liés à l'action du photosensibilisateur, laissant présager que ce nouveau médicament est un bon candidat pour les approches de type indirecte

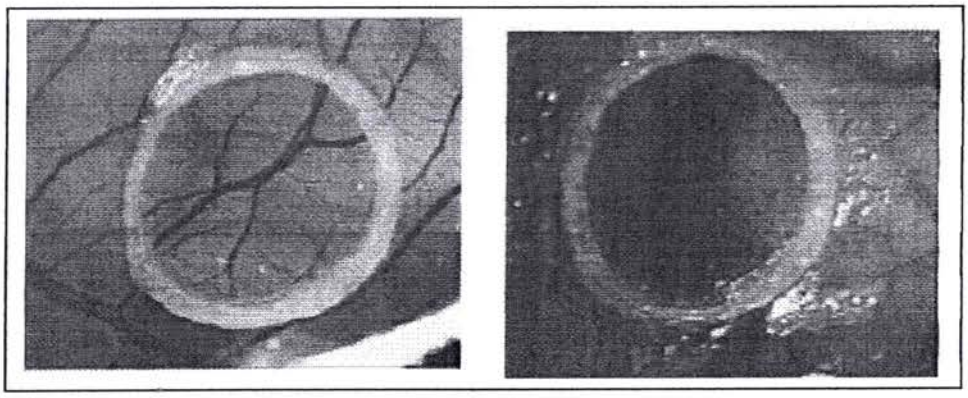


Figure I. 10. L'irradiation (763 nm, 10 J/cm²) consécutive à l'injection (T = 24 h) du Tookad® (33µg/embryon) met en évidence le mode d'action de ce dernier au niveau du système vasculaire d'œuf de poules fertilisées[33].

2.3. Les sources lumineuses destinées à la PDT

2.3.1. Les différentes sources lumineuses

Dans le cadre de la PDT, le tissu est irradié par une lumière de longueur d'onde et d'intensité appropriées selon la lésion et le photosensibilisateur considéré. Dans les applications pratiques de l'endoscopie, la lumière active doit être fournie par des fibres fines et les sources laser satisfont à cette exigence. Le principal inconvénient de ce matériel est son prix élevé. Pour cette raison, des sources de lumière incohérente (lampe, sources de lumière basée sur une diode) ont connu un développement et ont pris une importance croissante.

---

32 (29) A. Rück; Böhmler, A.; Steiner, R. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2*, 79-90.

33 (29) A. Rück; Böhmler, A.; Steiner, R. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2005**, *2*, 79-90.

DIFFUSEURS DE LUMIERE POUR PDT

L'efficacité du traitement photodynamique nécessite l'utilisation de système de propagation et d'illumination donnant une irradiation homogène du tissu cible. Pour l'irradiation de surface, plane (la peau), cylindrique (l'oesophage, les bronches, les voies biliaires), ou sphériques (la vessie), les structures géométriques doivent être prises en compte.

Pour les structures tissulaires tumorales volumineuses (cerveau, prostate, pancréas), l'application de lumière est effectuée de façon interstitielle par insertion de multiples fibres à l'intérieur même de la tumeur (Figure I.11.).

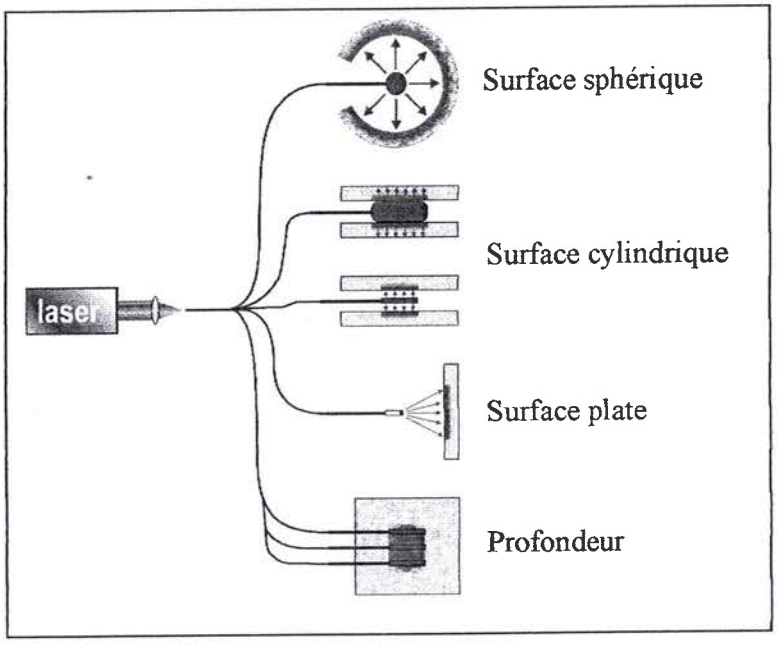


Figure I. 11. Représentation des différents diffuseurs de lumière par fibres. Habituellement, la fibre utilisée est une fibre flexible en quartz de diamètre central variant de 400 µm à 600 µm.

L'irradiation de surfaces planes est soit obtenue par émetteurs de large surface (systèmes lampe ou faisceau LED) ou par des systèmes de fibres portant à leur extrémité une microlentille, encore appelé diffuseur frontal qui émet un faisceau laser divergent.

L'irradiation de surfaces cylindriques est plus compliquée et nécessite donc un dispositif approprié. Ci-dessous nous pouvons voir la photographie ainsi que la coupe transversal d'un

Historiquement, les lasers argon et les lasers à vapeur en métal (tel que le cuivre) étaient le choix initial pour la PDT car ils combinaient plusieurs caractéristiques telles qu'un rendement élevé en puissance, la possibilité de pomper des lasers à colorants permettant d'accéder aux longueurs d'onde d'excitation des photosensibilisateurs (telles que les porphyrines, $\lambda > 600$ nm) (tableau I.1.) et la fixation de fibres optiques permettant des traitements par endoscopies.

Type de laser	Longueurs d'onde	Irradiance
- Laser Argon	488 et 514,5nm	0,5-1 W/cm²
- Laser à vapeur de métal	UV ou visible (selon le métal)	10 W/cm² (maximum)
- Laser solide	1064, 532, 355 et 266nm (Nd-YAG)	10 W/cm² (maximum)
- Laser à colorant	400-750nm (selon le colorant)	10-500 mW/cm²

Tableau I. 1. Tableau regroupant les différentes familles de lasers ainsi que leurs caractéristiques[34]*. Les colorants utilisés peuvent être de la rhodamine B, rhodamine 101 ou de la sulphorhodamine 640*

Les lasers Argon ainsi que les lasers à colorant pompés par ceux-ci sont destinés d'avantage à l'endoscopie car d'une part le diamètre du faisceau en sortie est inférieur au millimètre et d'autre part il est aisé de les coupler aux fibres optiques, d'où des applications dans le traitement du cancer de la bouche[35], de la trachée[36] et de l'œsophage[37].

Les lasers à vapeur de métal se destinent au même type d'intervention que les lasers Argon, mais de part leur diamètre de faisceau plus important[38], ils peuvent traiter des surfaces cutanées allant jusqu'à 3 cm².

Les lasers solides, quant à eux, offrent davantage de compacité que les lasers précédents. Ils travaillent à des fréquences de l'ordre du mégahertz et le temps de l'impulsion laser est plus courts (pico/nanoseconde) permettant d'obtenir un faisceau quasi continu.

---

34 (30) Brancaleon, L.; Moseley, H. *Lasers Med. Sci.* **2002**, *17*, 173-186.

35 (31) A. Kubler ; T. Haase; M. Rheinwald ; T. Barth ; Muhling, J. **1998**, *27*, 466.

36 (32) Marijnissen, J. P. A.; Baas, P.; Beck, J. F.; van-Moll, J. H.; van-Zandwijk, N.; Star, W. M. *Photochem Photobiol* **1993**, *58*, 92.

37 (33) Krishnadath, K. K.; Wang, K. K.; Taniguchi, K.; Sebo, T. J.; Buttar, N. S.; Anderson, M. A. *Gastroenterology* **2000**, *119*, 624.

38 (34) Y. Itoh; Ninomiya, Y.; S.Tajima; Ishibash, A. *Arch Dermatol* **2000**, *136*, 1093.

Pour des applications de PDT non-endoscopiques, des systèmes d'illumination de type lampe sont plus adaptés. En effet, contrairement aux lasers, les lampes sont en mesure de traiter une plus large surface tout en fournissant une illumination d'irradiance équivalente (par rapport aux lasers à colorant) (Tableau I.2.). En contre partie il n'est pas possible d'obtenir un faisceau monochromatique mais une bande d'émission de 10 à 100 nm selon le filtre employé.

Type de lampe	Longueurs d'onde	Irradiance
- filament de tungstène	400-1100 nm	250 mW/cm²
- arc xénon	400-1100 nm	300 mW/cm²
- halogénure métallique	250-730 nm (selon le métal)	250 mW/cm²
- Sodium	590-670 nm	100 mW/cm² (maximum)
- Fluorescente	400-450 nm	10 mW/cm² (maximum)

Tableau I. 2. Tableau regroupant les différents types de lampes utilisées en PDT[39].

En effet, des traitements PDT basés sur l'activation de PP IX ont été menés en ayant recours à une lampe à filament de tungstène et une lampe à fluorescence. Dans le premier cas, la "longueur d'onde" sélectionnée correspondait à la 1ère Q-bande de la PP IX absorbant à λ = 635 nm[40], dans le second cas la bande de Soret fut ciblée à 442 nm à l'aide d'un laser hélium-cadmium[41].

Le troisième mode d'illumination repose sur des diodes à émissions de lumière (LED). Ce sont des sources de lumière de type semi-conducteur émettant une bande lumineuse à haute efficacité. Les avancés techniques ont permis d'obtenir des faisceaux LED capables d'émettre aussi bien dans l'UV que dans le visible. Bien que les faisceaux ne soient pas monochromatiques, la largeur de bande d'émission n'excède pas 10 nm. Actuellement, la lumière continue provenant des LED peut atteindre 150 mW/cm² et elle peut être facilement combinée à des fibres optiques afin de délivrer une illumination à l'endroit souhaité.

39 (30) Brancaleon, L.; Moseley, H. *Lasers Med. Sci.* **2002**, *17*, 173-186.
40 (35) Kennedy JC; Marcus SL; Pottier RH *J Clin Laser Med Surg* **1996**, *14*, 289–304.
41 (36) Bissonnette R; Shapiro J; Zeng H; Mclean DI; Liu H *Br J Dermatol* **2000**, *143*, 1032.

diffuseur cylindrique bien adapté à une illumination intralaminale[42] (bronche ou oesophage) (Figure I.12.).

Il se compose d'une tige centrale remplie d'un matériel légèrement diffusant qui procure une émission primaire cylindrique au niveau de la surface interne du feuillet de rétrodiffusion. La fraction transmise correspond seulement à 10 % de l'irradiation. Le reste est distribué au hasard à l'intérieur du diffuseur ce qui augmente la lumière incidente initiale au niveau d'un nouveau feuillet. Le cylindre en question est d'une longueur de plusieurs centimètres tandis que son diamètre est de l'ordre du millimètre permettant ainsi de les placer directement dans un organe de faible diamètre, tel que la voie biliaire par exemple.

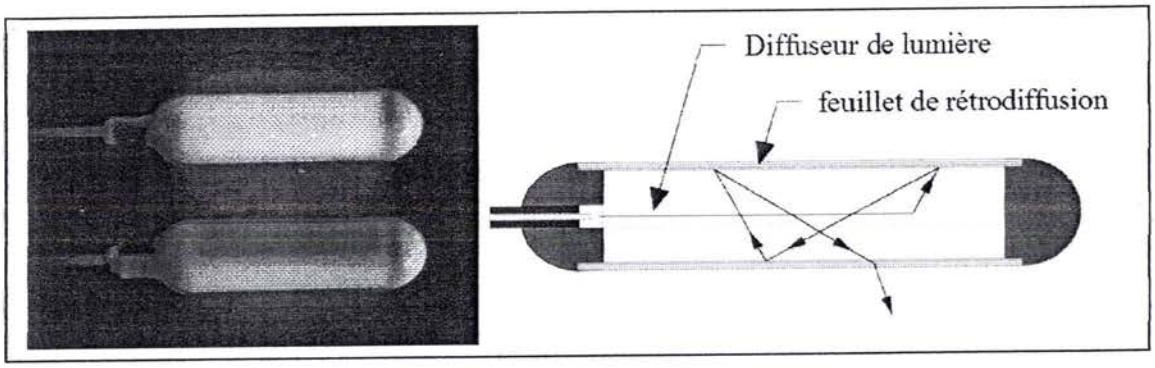


Figure I. 12. Photographie (gauche) et coupe transversale (droite) d'un diffuseur cylindrique (ou radial).

Les organes sphériques peuvent être irradiés par des applicateurs de fibres équipés d'une extrémité sphérique, délivrant la lumière de façon uniforme dans toutes les directions. Néanmoins, il n'est pas toujours possible d'assurer un positionnement central du diffuseur sphérique lors du traitement. Pour cette raison, différents types de systèmes sphériques d'application de lumière ont été développés qui pallient en partie à la rétrodiffusion multiple, ceci en vue de renforcer l'homogénéité de l'émission lumineuse[43].

Lorsqu'il s'agit d'irradier un tissu tumoral volumineux, la mise en place d'une ou de plusieurs fibres de façon interstitielle est indiquée. En général, l'emploi de diffuseur radial de petit diamètre est recommandé à l'opposé des fibres nues, ceci afin d'éviter un effet thermique à l'extrémité de la fibre. Lorsqu'il s'agit d'une dosimétrie précise de la lumière, les informations sur les paramètres optiques du tissu à savoir le coefficient d'absorption de ce

42 (37) Beyer, W. *J Photochem. Photobiol. B.* **1996**, *36*, 153-156.
43 (38) Van-den-Bergh, H. *Endoscopy* **1998**, *30*, 392-407.

dernier. Celui-ci dépendant de 3 chromophores principaux à savoir l'eau, hémoglobine et mélanine (Figure I.13.). La combinaison de ces trois éléments offrant notamment une absorption minimale pour λ de 600 à 1000 nm comme nous pouvons le voir ci-dessous.

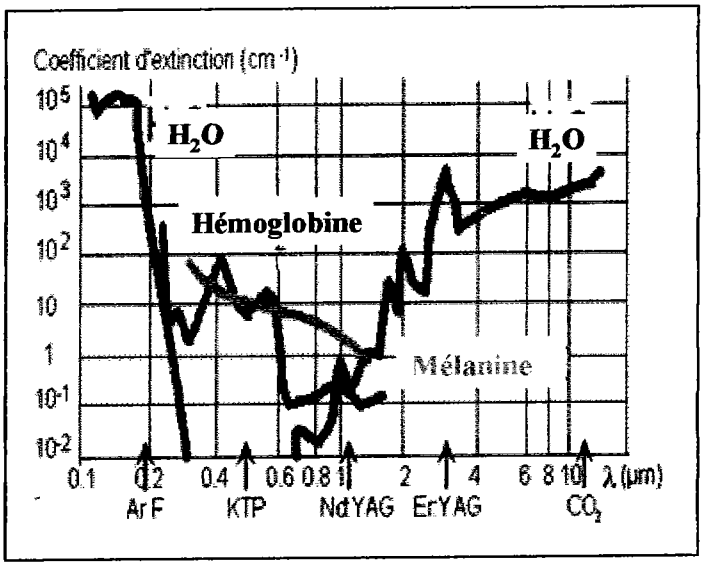


Figure I. 13. Spectre d'absorption des 3 principaux chromophores des tissus (eau, hémoglobine et mélanine) (www.univ-lille2.fr/lasers/infogeneral/courbes.gif).

Ces données sont nécessaires afin d'obtenir une estimation satisfaisante de la pénétration en profondeur de la lumière et par conséquent d'aboutir à une distance interfibre appropriée[44,45]. Les diffuseurs "intelligents" comportent des moyens pour mesurer l'irradiation appliquée ou un signal donnant des informations relatives aux propriétés optiques du tissu et à la sélection individuelle de la dosimétrie lumineuse [46,47,48]. Des mesures de blanchiment (diminution de la fluorescence) en cours de PDT peuvent être également utilisés afin de prévoir la dose précise de lumière nécessaire pour obtenir l'effet désiré.

---

44 (39) Johansson T.; Thompson M.S.; Stenberg M.; AF K.C.; Anderson-Engels S.; Svanberg S.; Svanberg K. *Appl. Opt.* **2002**, *41*, 1462-1468.

45 (40) T. C. Zhu; J.C. Finlay *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2006**, *3*, 234-246.

46 (37) Beyer, W. *J Photochem. Photobiol. B.* **1996**, *36*, 153-156.

47 (38) Van-den-Bergh, H. *Endoscopy* **1998**, *30*, 392-407.

48 (41) Van-Veen, P.; Schouwink, J. H.; Star, W. M.; Sterenborg, H. J.; Van-Der-Sijp, J. M. R.; Stewart, F. A. *Phys. Med. Biol.* **2001**, *46*, 1873-1883.

2.3.2. Dosimétrie lumineuse

La dosimétrie est un concept délicat et compliqué dans le cadre de la thérapie photodynamique. Il est essentiel de concevoir des schémas précis concernant le comportement de photosensibilisateurs vis-à-vis de l'illumination lumineuse afin d'aboutir à un résultat thérapeutique optimal et limiter les effets indésirables. Le nombre de ROS (*Reactive Oxygen Species*) par unité de volume de tissu constitue le seuil de la dose photodynamique nécessaire à la destruction tissulaire. La dose photodynamique dépend de la concentration du photosensibilisateur, de la concentration d'oxygène et du flux lumineux appliqué (dose lumineuse efficace) et bien sûr également de la localisation du photosensibilisateur. On parle donc souvent de cette approche en terme de dosimétrie explicite.

Dans le cas d'un modèle simplifié d'administration du photosensibilisateur, nous pouvons présumer une concentration constante d'oxygène (valable pour de faibles degrés de flux lumineux et sans compromettre le débit vasculaire) ainsi que l'association d'une localisation reproductible du photosensibilisateur. Selon ce modèle, la dose photodynamique (**D**) est proportionnelle au produit du taux d'oxygénation du milieu $k(^3O_2)$, de la concentration du photosensibilisateur (**c**) et à la dose lumineuse. Cette dose est elle même proportionnelle au degré d'irradiation incidente sur le photosensibilisateur (I_λ) et au temps d'irradiation (**T**). Ainsi la dose photodynamique se décline sous cette forme :

$$\mathbf{D = k(^3O_2) \cdot [PS] \cdot I_\lambda \cdot T}$$

Avec:

D : dose photodynamique,

$k(^3O_2)$: taux d'oxygénation du milieu,

[PS] : concentration du photosensibilisateur [$mol.L^{-1}$],

I_λ : degré de l'intensité lumineuse [$W.cm^{-2}$],

T : temps d'illumination [s].

Toutefois, la détermination de **I**, degré d'intensité lumineuse active au niveau intracellulaire, n'est pas insignifiante. La dispersion lumineuse et l'absorption au niveau du tissu doivent être prises en compte. Au niveau des couches tissulaires superficielles, de multiples dispersions lumineuses produisent une augmentation de l'irradiation par comparaison avec un faisceau de

lumière incidente. Toutefois, plus en profondeur dans les tissus, l'irradiation diminuent de façon exponentielle et à une certaine profondeur, pour une dose de lumière appliquée en un temps donné d'irradiation, tombent au dessous du seuil nécessaire à l'apoptose. Par conséquent, la profondeur de destruction tissulaire obtenue est toujours limitée par la pénétration de la lumière. Au cours d'une irradiation prolongée, la destruction en profondeur peut être accrue, mais malheureusement les temps d'irradiation applicables sont limités afin d'éviter des effets thermiques[49]. Ainsi, pour ajuster au mieux la dose en oxygène singulet, il est indispensable de connaître avec exactitude la concentration intracellulaire du photosensibilisateur, de l'oxygène et de la lumière reçue dans la zone considérée. On parle donc dans ce cas de dosimétrie explicite[50] (Figure I.1.).

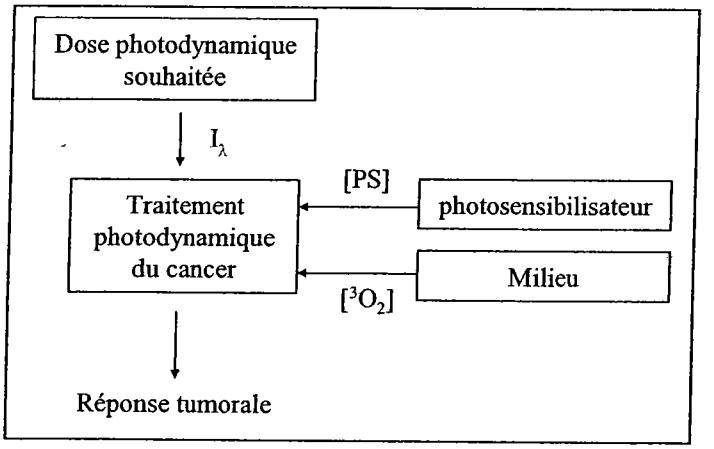


Figure I. 14. Dosimétrie explicite du traitement photodynamique[51]

Hélas, dans le cas du traitement explicite on ne tient pas compte de la variation dans l'espace et dans le temps de la concentration intracellulaire du photosensibilisateur [PS] et de l'oxygène $[^3O_2]$ lors du traitement PDT. De plus, selon le patient et la tumeur considérée une variabilité de la réponse tumorale peut apparaître. Un ajustement de l'irradiation n'étant pas possible car de part la cinétique lente du traitement PDT, la réponse tumorale ne peut être observé que post traitement.

Afin de contourner cet obstacle une autre approche a été mise en place, elle est qualifiée de dosimétrie implicite. Elle se base sur l'estimation d'oxygène singulet ($^1O_2$) générée dans le milieu cellulaire. Pour ce faire, deux approches sont possibles l'une repose sur la mesure de

---

49 (42) Potter W.R.; Mang T.S.; T.J., D. *Photochem. Photobiol.* **1987**, *46*, 97-101.

50 (43) T. Bastogne; L. Tirand; M. Barberi-Heyob; A. Richard *Conférence Internationale Francophone d'Automatique, CIFA'2006, Bordeaux, France* **2006**.

51 (43) T. Bastogne; L. Tirand; M. Barberi-Heyob; A. Richard *Conférence Internationale Francophone d'Automatique, CIFA'2006, Bordeaux, France* **2006**.

luminescence de l'oxygène singulet $^1O_2$ à λ = 1280 nm tandis que la seconde s'appuie sur la mesure du photoblanchiment par fluorescence du photosensibilisateur. L'estimation immédiate de $^1O_2$ générée permettant instantanément de moduler l'irradiation et ainsi d'optimiser la réponse tumorale[52] ;

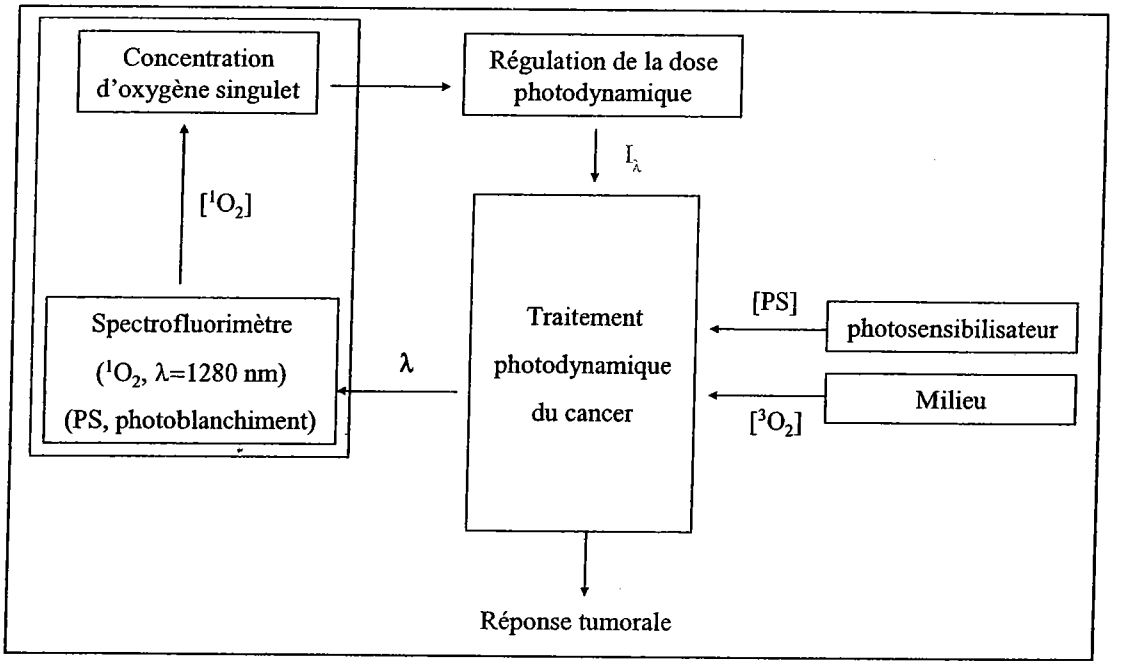


Figure I. 15. Dosimétrie implicite du traitement photodynamique[53].

2.4. Sources lumineuses utilisées lors de nos études en PDT

Historique :

Prenant pour base les travaux fondamentaux de Einstein qui a décrit l'émission spontanée dès 1917, Brossel et Kastler ont mis au point en 1949, le premier dispositif de pompage optique, nécessaire à l'obtention de l'inversion de population, condition *sine qua none* à l'émission d'un rayonnement laser. Ainsi, le laser, acronyme anglais de *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (« amplification de la lumière par émission stimulée de radiations ») est un dispositif qui amplifie la lumière en un étroit faisceau, cohérent dans l'espace et le temps, où ondes et photons associés se propagent en phase, au lieu d'être

[52] (40) T. C. Zhu; J.C. Finlay *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* **2006**, *3*, 234-246.
[53] (43) T. Bastogne; L. Tirand; M. Barberi-Heyob; A. Richard *Conférence Internationale Francophone d'Automatique, CIFA'2006, Bordeaux, France* **2006**.

"distribués" arbitrairement. Cette propriété rend la lumière laser extrêmement directionnelle et d'une grande pureté spectrale. Ainsi, ses nombreuses qualités, en particulier sa cohérence, sa directivité, sa monochromaticité, sa puissance et son accordabilité en fréquence ont rendu l'emploi du rayonnement laser de plus en plus fréquent en recherche, en médecine ou dans l'industrie.

Le principe du laser Nd-YAG

Le laser est une source de rayonnement qui repose sur l'émission stimulée d'un premier photon qui en rencontrant un électron excité, provoque sa désexcitation et le force à émettre un second photon, créant par là même d'autres photons et augmentant ainsi l'amplitude du champ électromagnétique originel. La lumière laser est dite cohérente parce que les deux photons sont de même fréquence et de même phase. Comme dans tout oscillateur, trois éléments sont donc simultanément nécessaires (Figure I.16.) :

- un milieu actif composé d'atomes, de molécules ou d'ions qui absorbent de l'énergie d'une source d'excitation externe pour ensuite la réémettre sous forme de lumière laser monochromatique et cohérente. Le milieu actif peut être un solide (notamment des cristaux de rubis et des verres dopés au néodyme), un gaz (pur, en mélange de gaz ou un métal chauffé à l'état de vapeur, contenu dans un tube en verre ou en quartz), ou un liquide (colorant organique contenu dans un récipient en verre). Il y a également les milieux actifs composés de matériaux semi-conducteurs que l'on retrouve dans les lasers à diodes. Le milieu actif détermine la longueur d'onde fondamentale émise par le laser.

- un pompage ou une source d'excitation externe électrique, optique ou chimique ; le pompage produit l'inversion de population car il amène une majorité de particules à un état excité ce qui entraîne l'accumulation d'électrons sur le niveau métastable.

- une cavité résonante qui complète l'amplification du faisceau laser. Celle-ci est constituée de deux miroirs parallèles (dont l'un d'eux est semi transparent) entre lesquels on place le milieu actif. Ce dispositif permet aux photons réfléchis de traverser plusieurs fois ce milieu. Ce processus d'émission stimulée, d'origine quantique, produit l'amplification de la lumière.

A chaque aller-retour, la lumière sort par fraction de la cavité à travers le miroir semi transparent.

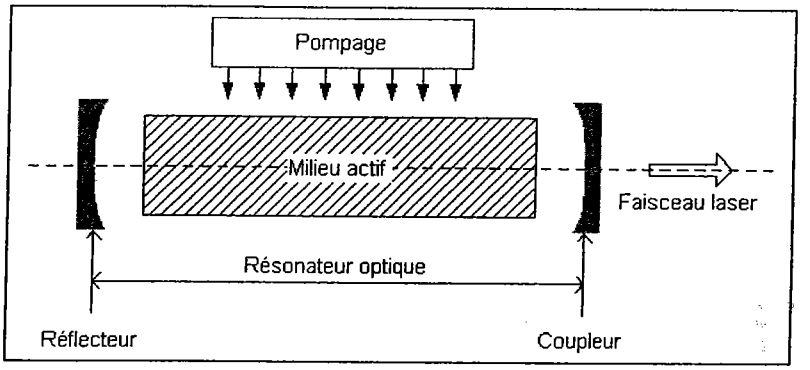


Figure I. 16. Schéma de la cavité d'un laser

Pour les lasers impulsionnels, il n'y a pas de miroir semi transparent : le laser est équipé d'un obturateur qui libère le faisceau lorsque l'on commande le tir. Entre deux impulsions, il faut un certain temps pour qu'il y est inversion de population. On dit d'un laser qu'il émet de façon continue si la durée d'émission dépasse 0,25 seconde.

Dans le contexte, le calcul de puissance déposée par unité de surface (Irradiance) ou de l'énergie déposée par unité de surface (Fluence) trouve tout son intérêt.

L'irradiance (Irr) ou densité de puissance, pour un laser impulsionnel, est reliée à l'énergie du laser. Elle est définie comme la puissance émise par unité de surface ramenée à une seconde :

$$Irr = \frac{E}{S.\tau}$$

E : Energie photonique déposée sur la cible [J].

S : Surface irradiée [cm²].

τ : Durée de l'impulsion laser [s].

Pour un laser continu, l'irradiance est directement proportionnelle au temps d'illumination et se calcule ainsi :

$$Irr = \frac{F}{T} = \frac{E}{S.T}$$

F : Fluence [J/cm²].

E : Energie [J].

S : Surface irradiée [cm²].

T : Temps d'illumination [s].

Il existe plusieurs grandes familles de laser différenciées par la nature du milieu excité dont les principales sont les lasers à solide, les lasers à gaz, et les lasers à liquide.

Le laser Nd-YAG est composé d'un milieu actif en ions trivalents Nd^{3+} présents à l'état de dopant dans un cristal de grenat d'oxyde d'Yttrium et d'aluminium (Yttrium Aluminium Garnet : $Y_3Al_5O_{12}$). Le pompage optique est assuré par des lampes flash qui entourent le milieu actif. Il émet suivant sa fréquence fondamentale à λ_0 = 1,064 µm (à température ambiante). Il est également possible de doubler, tripler et quadrupler la fréquence fondamentale afin d'atteindre des longueurs d'onde de 532, 355 et 266 nm respectivement, grâce à l'utilisation d'un jeu de cristaux possédant des propriétés non-linéaires (cristaux KDP ou BBO).

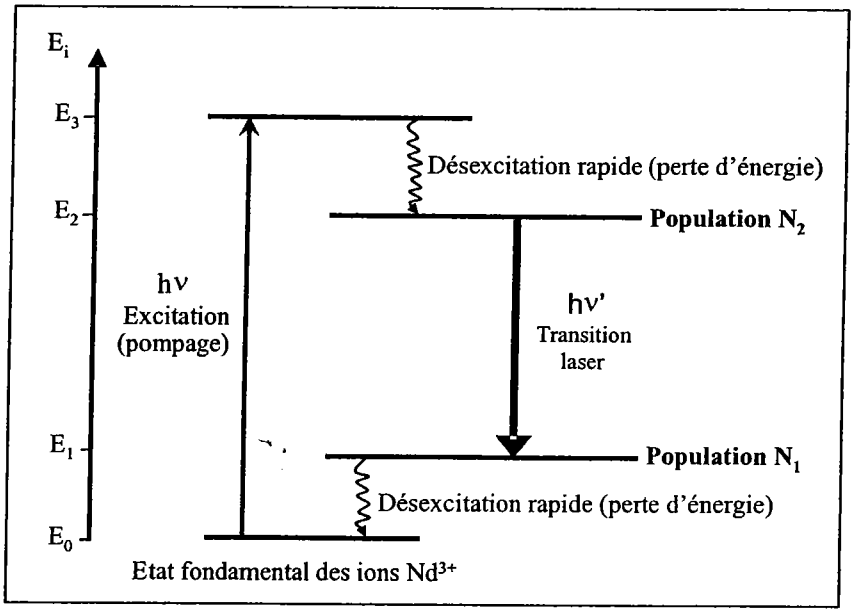


Figure I. 17. Laser à quatre niveaux – Nd^{3+}- YAG (Guesic 1964)

Le laser Nd-YAG est un laser à 4 niveaux. La population du niveau N_1, à l'équilibre thermodynamique, est négligeable, ainsi l'inversion de population entre les niveaux E_2 et E_1 s'en trouve plus aisée qu'entre les niveaux E_2 et E_0. L'effet laser est donc plus facile à obtenir

dans un système à quatre niveaux qu'à trois où l'inversion se produit entre les niveaux E_2 et E_0 (Figure I.17.). Le niveau émetteur E_1 n'est pas peuplé thermiquement (E>>kT)

La seconde harmonique du laser Nd-YAG, 532 nm, est également utilisée comme laser de pompe dans le cadre d'utilisation de laser à colorant. Ces derniers sont accordables en fréquence, ce qui permet d'accéder à un large spectre de longueur d'onde et ce grâce notamment à l'utilisation spécifique de tel ou tel colorant. Dans ce cas le milieu actif est un colorant organique dissout dans un solvant et qui circule dans des cuves. La première cuve est placée dans une cavité résonnante (oscillateur) et les deux suivantes (préamplificateur et amplificateur) sont placées sur le trajet optique du faisceau laser.

Pour réaliser les illuminations laser des différentes solutions, nous avons utilisé le laser à colorant, le TDL 50 (Quantel, Les Ulis, France), dont le pompage est effectué par la seconde harmonique d'un laser Nd-YAG (λ = 532 nm, durée d'impulsion τ = 12 ns (Q-switch), énergie de sortie 360 mJ). Ce laser fonctionne avec un colorant organique, le 4-dicyanométhylène-2-méthyl-6-(p-diméthylaminostyryl)-4H-pyrane (DCM), solubilisé dans le méthanol, pour obtenir les longueurs entre 645 nm et 655 nm (Exciton, Optilas, France) (Figure I.18.).

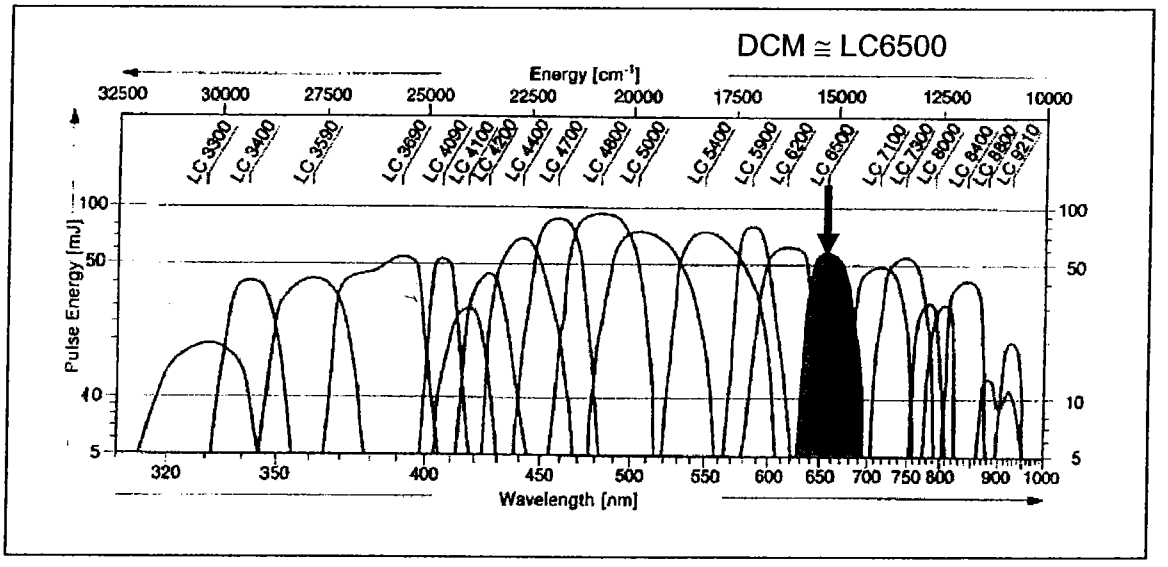


Figure I. 18. Colorants pompés par la seconde harmonique du Nd-YAG (532 nm, E = 360 mJ). Le DCM dans le méthanol correspond à la référence LC 6500 qui a pour λ_{max} = 640 nm, couvrant une gamme de 607 à 670 nm

Ce laser a été utilisé pour toutes les études photochimiques des photosensibilisateurs en solution. La puissance du laser est modulée grâce à un variateur et mesurée au moyen d'une cellule de mesure d'énergie jusqu'à l'obtention d'une énergie stable. La longueur d'onde est contrôlée fréquemment à l'aide d'un monochromateur.

Caractéristiques d'un laser

- La cohérence

La lumière produite par un laser est ordonnée dans le temps et dans l'espace. Ainsi, chaque photon qui la compose oscille en phase ; en même temps, et de la même manière, ce qui confère au dispositif une cohérence spatiale et temporelle. La directivité de la lumière laser est d'ailleurs une conséquence de sa cohérence.

- Directivité du faisceau laser

Les photons obtenus par émission stimulée ont la même énergie et la même direction que les photons incidents, ce qui explique la pureté et la directivité du faisceau. Parmi de nombreuses applications, l'emploi de fibres optiques a permis de révolutionner les actes médicaux endoscopiques.

- La monochromaticité

Elle fournit aux utilisateurs la possibilité de sélectionner une longueur d'onde bien précise. Par exemple, pour un laser fonctionnant dans un régime continu et émettant à une longueur d'onde de 500 nm, la largeur spectrale est de moins de 0,001 nm. Cette sélectivité en fait un outil précieux en médecine et particulièrement en thérapie photodynamique car elle permet d'obtenir des longueurs d'onde spécifiques aux maxima d'absorption des photosensibilisateurs.

- Puissance des raies laser

La puissance des lasers dépend de leur mode de fonctionnement, il dispose soit d'un régime continu, soit d'un régime impulsionnel. En régime continu, ils ne délivrent que des puissances de l'ordre du milliwatt (laser He-Ne, diodes semi-conductrices) allant à la dizaine de kilowatts

pour les lasers industriels à CO_2. En mode impulsionnel, les puissances délivrées deviennent supérieures au gigawatt.

- La modularité en fréquence

L'introduction de lasers à colorant et plus récemment les lasers solides accordables en fréquence permettent désormais de balayer l'ensemble du domaine spectral compris entre l'ultraviolet et le rayonnement infrarouge.

3. La nature des agents thérapeutiques utilisés en PDT

3.1. Critères du photosensibilisateur idéal

Pour qu'un composé puisse être utilisé comme agent photosensible en thérapie photodynamique, il doit remplir certains critères et attentes dont nous allons parler ci-après.

La structure du chimique du photosensibilisateur (PS) :

L'activation du PS par une illumination laser adéquate doit favoriser l'état triplet (^{3}PS) disposant d'une énergie suffisante (E > 94,2 KJ/mole) afin de permettre notamment la production d'espèces réactives tel que l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$. De même, le transfert d'énergie du photosensibilisateur (^{3}PS) vers l'oxygène ($^3\Sigma^-_g$) doit être efficace pour la formation d'oxygène sous l'état singulet $^1O_2$ ($^1\Delta_g$, E = 94,2 KJ/mole). De plus le PS ne devrait pas être enclin à l'agrégation car celle-ci a pour effet de limiter l'état triplet de ce dernier conduisant à la diminution du rendement en $^1O_2$[54].

Le photosensibilisateur doit être suffisamment stable pour éviter des processus de dégradation, notamment de photoblanchiment. Cependant, ce processus peut être un avantage car il limite la durée de la photosensibilité généralisée après le traitement PDT[55].

Le PS doit disposer d'une faible absorbance dans les basses longueurs d'onde et d'une haute absorbance dans les longueurs d'ondes supérieures à 600 nm. Le premier critère permettant de limiter la photosensibilité cutanée tandis que le second est propice à son activation même en

---

[54] (44) MacRobert; S.G. Bown; D. Phillips *Ciba Found Symp., Review* **1989**, *146*, 4-12, discussion 12-16.

[55] (45) R. Bonnett *Rev. Contemp. Pharmacother.* **1999**, *10*, 1–17.

profondeur[56]. En effet la pénétration de la lumière dans les tissus varie selon la longueur d'onde à savoir pour $\lambda \approx 400$ nm, elle est de l'ordre du millimètre tandis que pour des $\lambda > 600$ nm elle est de l'ordre du centimètre. Cependant, les longueurs d'onde d'absorption du photosensibilisateur ne doivent pas être trop déplacés dans le rouge afin d'éviter une diminution de la photostabilité du composé. De même, une absorbance trop importante dans le domaine d'absorption du photosensibilisateur conduirait à un "effet d'écran" (self shielding), ce processus se traduit de la façon suivante : les molécules de PS proches de la source lumineuse absorbent la quasi-totalité du rayonnement de tel façon que les molécules localisées plus en profondeur ne peut être activées[57].

De même, le photosensibilisateur ne doit pas être toxique en absence de lumière. Les photoproduits ainsi que les nouveaux produits générés par le médicament métabolisé ne doivent pas présenter de toxicité. Ainsi, il est important que ceux-ci soient rapidement éliminés du corps afin de minimiser les risques de photosensibilité cutanée. Leur élimination devrait pouvoir se compter en jours, voir en heures. L'administration doit pouvoir s'effectuer de manière simple, en faibles doses afin d'éviter tout effet secondaire (tel que de l'hypotension ou des réactions allergiques). Aussi, afin de faciliter le transport et l'absorption des agents photosensibles par les tissus, il est préférable que les PS soient solubles dans le milieu aqueux.

Enfin, il doit se localisé préférentielle dans le site d'intérêt, par exemple au niveau des mitochondries qui présentent un forte concentration en oxygène[58], permettant l'inactivation de ces dernières après illumination laser actionnant ainsi la mort cellulaire par apoptose.

3.2. Nomenclature de porphyrines

La plupart des photosensibilisateurs utilisés en thérapie photodynamique (PDT) sont des dérivés substitués de la porphyrine, chlorine, et bactériochlorine ayant comme élément commun un cycle tétrapyrroliques. Ces macrocycles, fortement conjugués, sont constitués de

56 (46) G. Jori *J. Photochem. Photobiol. A* **1992**, *62*, 371–378.
57 (21) Henderson, B. W.; Dougherty, T. J. *Photochem. Photobiol.* **1992**, *55*, 145-157.
58 (25) Fuchs, J.; Thiele, J. *Free Radical Biol Med* **1998**, *24*, 35-47.

quatre unités pyrroliques liées entre elles par des ponts méthines comportant un carbone au sommet appelé position *méso* (Figure I.19.).

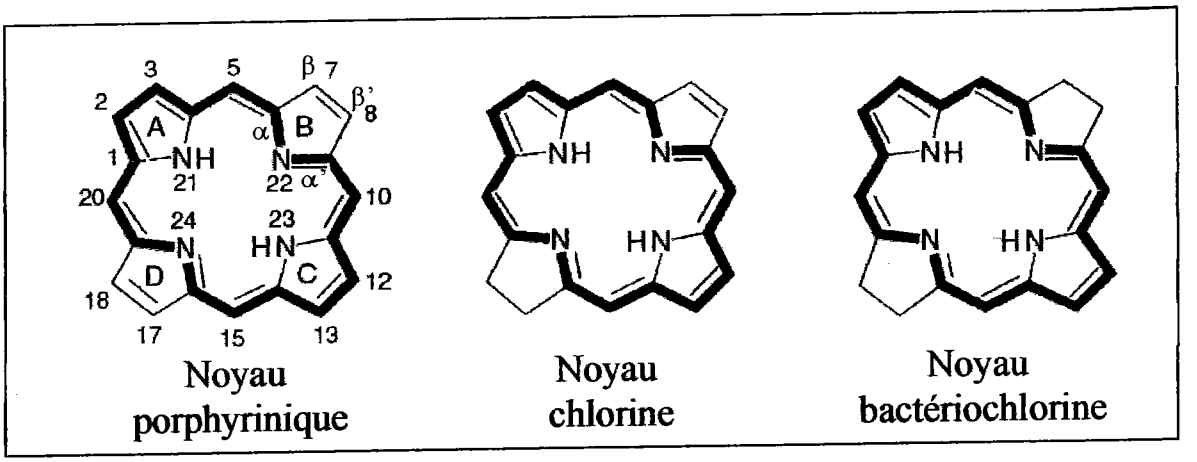


Figure I. 19. Représentation de la porphyrine, de la chlorine, bactériochlorine, la numération du cycle se faisant selon le système IUPAC. Le tracé en gras mettant en évidence le système de 18 électrons π aromatiques[59].

C'est le chimiste allemand Hans Fischer qui propose pour la première fois un système de nomenclature encore utilisé de nos jours pour désigner les porphyrines substituées sur les positions β-pyrroliques[60]. Ainsi, les atomes de carbone des positions méthines, aussi appelés "méso" sont numérotés α, β, γ et δ et les carbones β-pyrroliques sont notés 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 et 8. La complexité des porphyrines synthétisées augmentant, une numérotation systématique du macrocycle a été adoptée en 1987[61].

Pour autant dans un souci de simplification d'écriture, il est plus largement utilisé une nomenclature dans laquelle

- les carbones méso portent alors les numéros 5, 10, 15, 20,
- les positions α et β des cycles pyrroliques sont notées respectivement 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18
- et enfin les numéros 21, 22, 23, 24 ont été attribués aux quatre atomes d'azote.

---

59 (47) Dougherty T.; Kaufman J.; Goldfarb A.; Weishaupt K.; Boyle D.; Mittleman A. *Cancer Res* **1978**, *38*, 2628-2635.

60 (48) H. Fischer; A. Stern *Akademische Verlagsgesellschaft* **1940**, *II/2*.

61 (49) Dixon HBF; Cornish-Bowden A; Liebecq C; Loening KL; Moss GP; Reedijk J; Velick SF; Venetianer P; Vliegenthart JFG *Pure Appl. Chem* **1987**, *59*, 779-832.

Le squelette de base est donc aromatique et l'aromaticité est due, à un système de 18 électrons π, conformément à la règle de Hückel (Un hydrocarbure est aromatique s'il est plan et qu'il possède 4n + 2 électrons π délocalisables dans un système cyclique). De ce fait, ces macrocycles sont d'une part particulièrement stables et d'autre part développent une coloration prononcée lors de leur mise en solution. Afin d'obtenir ces différents photosensibilisateurs, deux voies sont envisageables à savoir la voie naturelle, ou la voie de synthèse.

3.3. Photosensibilisateurs naturels ou partiellement synthétiques.

Ces composés sont préparé en majeur partie à partir du chloro(protoporphyrinato)-fer(III) (Protohemin) (Figure I.20.) ou de la bilirubine. Le Protohemin est une source naturelle importante pour une grande variété de chlorines partiellement synthétiques. Protohemin peut être facilement isolé en forme pure à partir de sang de bovin par la méthode de Labbe et Nishida[62], et converti en diverses porphyrines dicarboxyliques, telles que le proto-, meso-, deutero-, et hematoporphyrine, en utilisant les méthodes standard de chimie des porphyrines[63].

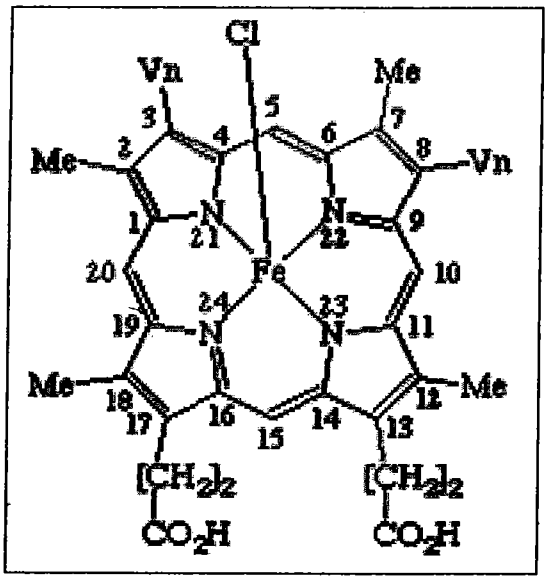


Figure I. 20. Structure du chloro (protoporphyrinato)-fer(III) (Protohemin)

62 (50) R.F. Labbe; G. Nishida *Biochim. Biophys.Acta* **1957**, *26*, 437.
63 (51) P.H. Hynninen; N. Ellfolk *Acta Chem. Scand.* **1973**, *27*, 1795–1806.

Grâce à des travaux initiés par johnson[64] mettant en évidence la formation de composés proche de porphyrines à partir de réactions de Diels-Alder appliquer à des vinyporphyrines, Dolphin[65] et Dougherty[66] purent synthétisés de dérivés de benzoporphyrines (BPD) dont un exemple le dérivé de benzoporphyrine mono acide A (BPA-MA, Verteporfin) est représenté ci-dessous (Figure I.21.).

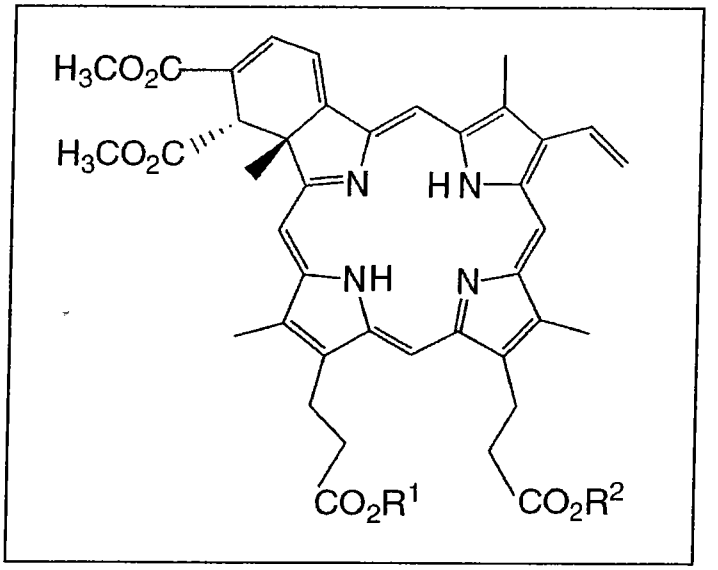


Figure I. 21 . Dérivé benzoporphyrinique - mono acide A (BPA-MA, Verteporfin).

De même Montforts et coll.[67] parvinrent à synthétiser à partir du protohemin une chlorine conjuguée à de l'oestrogène (Figure I.22.), afin d'augmenter la sélectivité du photosensibilisateur sachant que les récepteur d'oestrogène sont présent en plus grand nombre sur les membranes de cellules cancéreuses (notamment cancer du sein ou de l'utérus).

64 (52) H.J. Callot; A.W. Johnson; A. Sweeney *J. Chem. Soc.Perkin Trans* **1973**, *1*, 1324–1327.

65 (53) P. Yon-Hin; T.P. Wijesekera; D. Dolphin *Tetrahedron Lett.* **1991**, *32*, 2875–2878.

66 (54) R.K. Pandey; Herman, C. K.; , F.-Y. S.; K. Ramachandran; T.J. Dougherty; K.M. Smith *J. Chem. Soc. Perkin. Trans.* **1992**, *1*, 1377–1383.

67 (55) F.P. Montforts; D. Kusch; F. Hoper; S. Braun; B. Gerlach; H.- D. Brauer; G. Schermann; J.G. Moser *Proc. SPIE – Int. Soc. Opt. Eng.* **1996**, *2675*, 212–221.

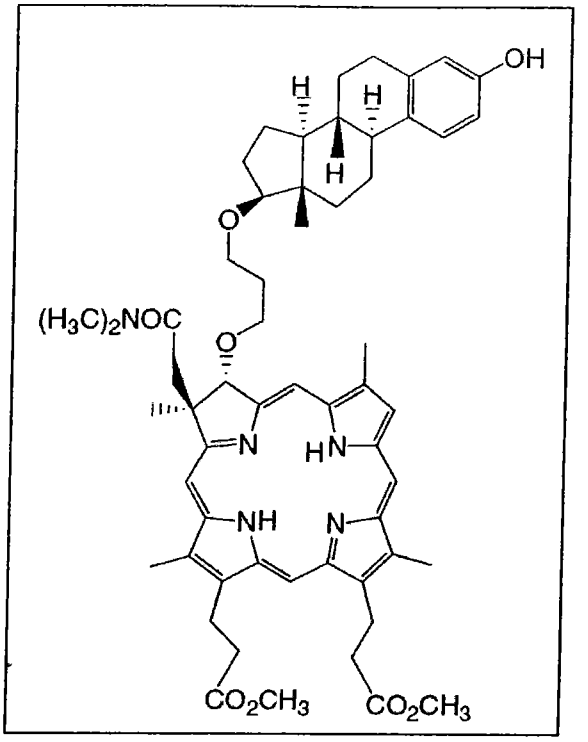


Figure I. 22. Structure d'une chlorine couplée à un œstrogène naturel, l'estradiol. Ce composé issu du photohemin a été obtenu à partir d'une synthèse partielle[68].

Une seconde source de chlorines naturelles est la chlorophylle, composé primordial du processus photosynthétique, leur rôle étant d'absorber l'énergie solaire afin de la transformer en énergie chimique. Les bactériochlorophylles (complexe Mg(II)/chlorophylle) agissent en tant que photosensibilisateurs[69], mais sont instables dans les conditions de thérapie photodynamique, imposant l'élaboration de dérivés plus stables[70].

L'extraction, la purification et la séparation des chlorophylles peuvent s'effectuer par des procédés simples. Il a été montré que l'obtention de composés purs était possible par utilisation d'une colonne de sucrose sur mélange[71,72]. Ainsi de nouveaux photosensibilisateurs ont vu le jour[73], tels que des dérivés amphiphiles du pyrophéophorbide a, dans lequel l'hydrophobicité augmente en fonction de la longueur de la chaîne alkylée ajoutée.

---

68 (56) Sternberg; Dolphin *Tetrahedron Lett.* **1998**, *54*, 4151-4202.

69 (57) J.D. Spikes, J. C. B. *H. Scheer (Ed.), Chlorophylls, CRC Press, Boca Raton, FL,* **1991**, 1181–1204.

70 (58) R.K. Pandey, C. K. H. *Chem. Ind.* **1998**, 739–743.

71 (59) Hynninen *Acta Chem. Scand. B* **1977**, *31*, 829–835.

72 (60) Hynninen *Synthesis* **1983**, 705–708.

73 (12) Pandey R.K.; Sumlin A.B.; Constantine S.; Aoudia M.; Potter W.R.; Bellnier D.A.; Henderson B.W.; Rodgers M.A.; Smith K.M.; Dougherty T.J. *Photochem. Photobiol.* **1996**, *64*, 194-204.

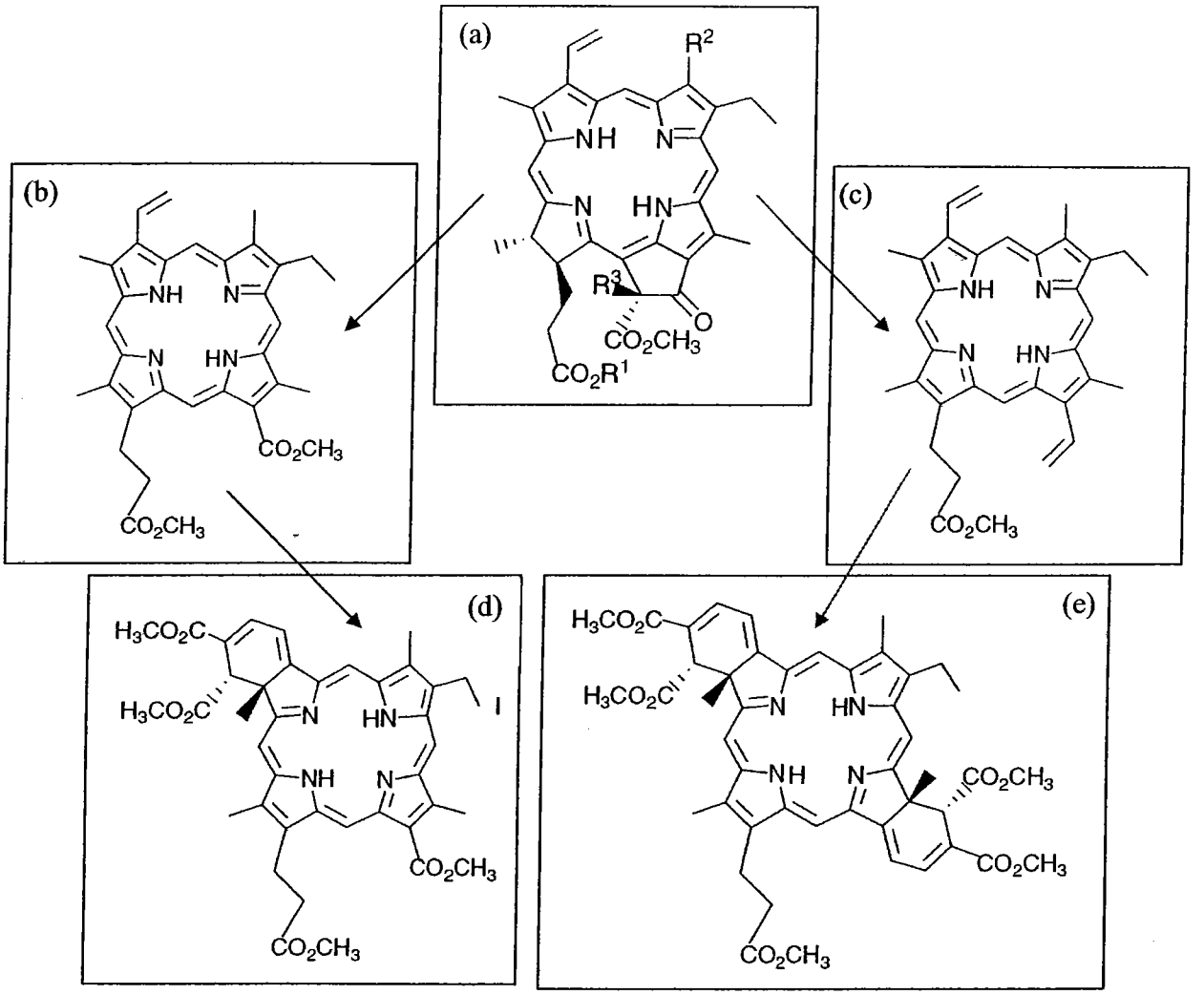


Figure I. 23. 3-vinylporphyrine (b) et divinylporphyrine (c) synthétisées à partir de la phéophorbide-a méthylique ester (R_1=R_2=CH_3, R_3=H) (a). Le dérivé [A]-benzoporphyrinique (d) a été préparé à partir de la 3-vinylporphyrine (b) tandis que le dérivé [A,C]-dibenzoporphyrinique (e) a été préparé à partir de la divinylporphyrine (c).

De même, de nouveau mode de préparations ont été étudiés et c'est ainsi que l'équipe de Dolphin[74] a développé des étapes pour la préparation de la 3-vinylporphyrine et de le divinylporphyrine, à partir de phéophorbide-a méthylique ester qui permettent d'aboutir à de nouveaux dérivés benzo et dibenzoporphyriniques (Figure I.23.).

[74] (61) Ma L.; Dolphin D. *Can. J. Chem.* **1997**, *75*, 262–275.

La spécificité de ce type de composé est qu'ils possèdent une forte absorbance dans les hautes longueurs d'onde. Pour le dérivé [A,C]-dibenzoporphyrinique représenté ci-dessus (Figure I.21. (e)), son maximum d'absorption a été relevé à λ = 784 nm, (ε = 38000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$ dans CH_2Cl_2), permettant une potentielle application pour le traitement de tumeurs pigmentées.

Depuis peu, une autre approche visant à obtenir des photosensibilisateurs possédant un maximum d'absorption dans les hautes longueurs d'ondes a été initiée. Elle repose sur la combinaison de composés tétrapyrroliques (chlorines et bactériochlorines) relié au moyen de groupements d'ester, d'éther, alkylés, amines, amides ou naphtalènes.
Pandey et Dougherty[75] ont notamment montré qu'a partir de composé inactif il était possible d'aboutir à des dimères photosensibles. L'un de ces édifices est le dimère HPPH–chlorin e6 représenté ci-dessous (Figure I.24.) dont le rendement quantique en oxygène singulet, Φ_Δ, (nombre de molécules de $^1O_2$ générées/nombre de photons absorbés par le photosensibilisant) est de l'ordre de à 0,50.

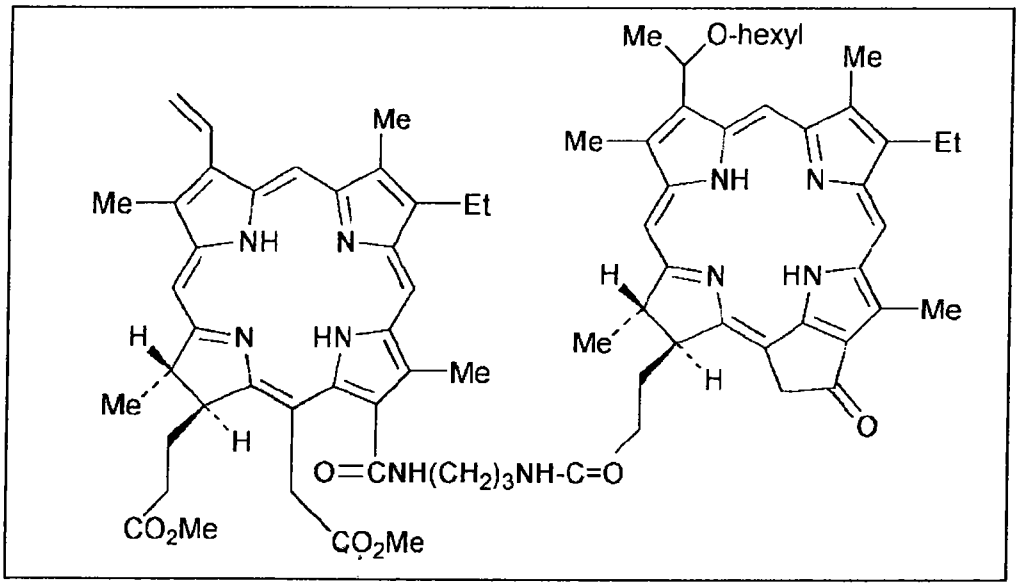


Figure I. 24. Structure du dimère HPPH–chlorin e6

L'emploi de ce composé lors de traitements PDT appliqués à des souris porteuses de tumeurs a été réalisé. Les études qui en découlent ont mises en avant l'efficacité de ce dimère (4,0 μmol/kg) qui se traduit par une réponse tumorale de 100% sur 2 et 7 jours.

[75] (62) Pandey; Dougherty *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* **2000**, *1*, 3113–3121.

3.4. Photosensibilisateurs synthétiques.

Beaucoup de chlorines et de bactériochlorines sont susceptibles de devenir les photosensibilisateurs de seconde génération pouvant potentiellement être utilisés en PDT.
Les bactériochlorines comme des naphthalocyanines, absorbent la lumière dans les hautes longueurs d'onde (λ > 650 nm) proche de l'infrarouge qui permettent une pénétration tissulaire minimale de 0,6 cm. Ainsi, l'utilisation de ces composés dans des tumeurs plus volumineuses peut être envisagé. De part leur forte absorbance, le recours à de tels photosensibilisateurs permet l'utilisation de concentration moindre 0,2–0,5 mg/kg en comparaison au Photofrin (1–5 mg/kg)[76]. De plus, les phtalocyanines et les naphthalocyanines (Figure I.25.) n'absorbant pas dans la gamme de 400 à 600 nm, le risque de photosensibilité cutanée généralisée due à la lumière du soleil est beaucoup moindre.

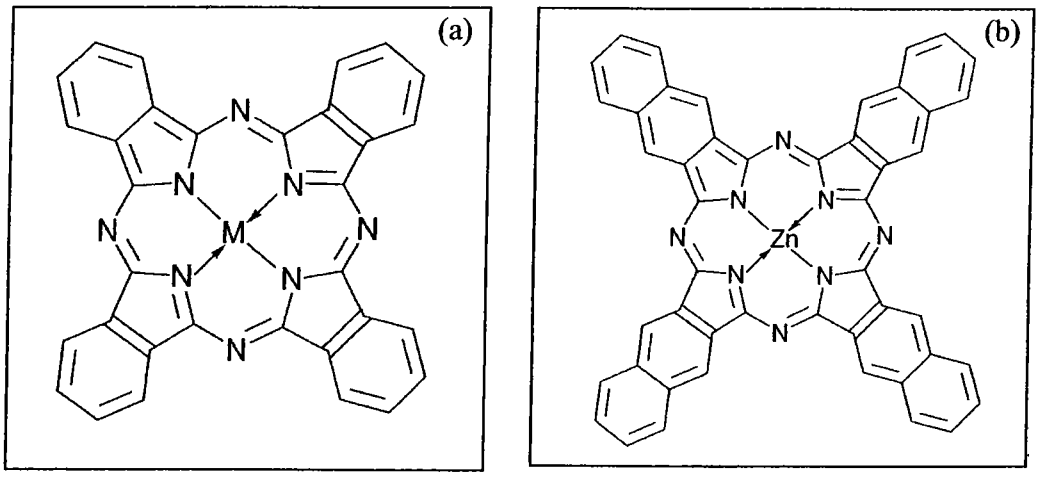


Figure I. 25. (a) Structure d'une phtalocyanine (λ ≈700 nm). (b) Structure de la naphthalocyaninato-Zn(II) (λ ≈780 nm)

Comme nous le voyons ci-dessus, les édifices peuvent accueillir un ion métallique M (Cu ou Zn) au centre de son noyau tétrapyrrolique. L'incorporation d'un ion métallique Zn permet d'obtenir la phthalocyaninato-Zn(II) (ZnPh) et la la naphthalocyaninato-Zn(II) (ZnNc) dont le rendement respectif en oxygène singulet Φ_Δ est égale à 0,53 et 0,45.

[76] (46) G. Jori *J. Photochem. Photobiol. A* **1992**, *62*, 371–378.

Leur haute hydrophobicité pose néanmoins des problèmes de solubilité en milieu aqueux. Afin d'y remédier, des substituants polaires y sont souvent liés[77]. Au début des année 90, l'équipe de Sokolov a notamment synthétisé de tel composés désigné par Photosens® correspondant à un mélange de chlorophthalocyaninato-Al(III) disposant de degrés variables de sulfonation (Figure I.26.).

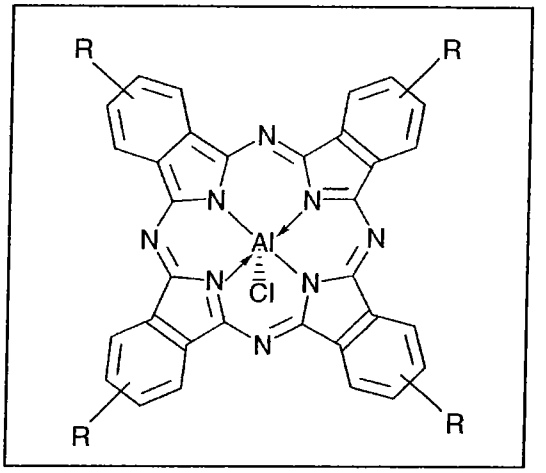


Figure I. 26. chlorophthalocyaninato-Al(III) pouvant de degrés variables de sulfonation.

$R = H$ *ou* SO^-_3 ($\lambda_{max} = 670$ nm)

Entre 1992 et 1993, ce mélange fut employé en PDT clinique en Russie dans l'optique de soigner des patients atteints de tumeurs métastatiques[78].

3.5. Agents thérapeutiques commercialisés.

3.5.1. Photofrin®

Le Photofrin® a été le premier photosensibilisateur approuvé par la Food and Drug Administration (FDA), il est le résultat final de nombreuses années de recherches qui avaient commencé avec l'hématoporphyrine (Hp), la synthèse des Hp-dérivés (HpD), et l'isolement et la purification de ses constituants les plus actifs. Son administration se fait habituellement par voie intraveineuse suivie d'une irradiation à 630 nm après deux à trois jours. La PDT au Photofrin® a reçu l'approbation de la FDA notamment comme thérapie palliative, dans le

77 (63) T. Nyokong *Coordination Chemistry Reviews* **2006**.

78 (64) Sokolov V. V.; Chissov V. I.; Yakubovskaya R. I.; Filonenko E. V.; Sukhin D. G.; Nemtsova, E. R.; Belous T. A.; N., Z. N. *The International Society for Optical Engineering* **1996**.

traitement complet ou partiel de cancers obstructif de l'œsophage ou des bronches avec également une utilisation dans le cas de certaines formes de cancer microinvasif endobronchiques. Le principal inconvénient de ce photosensibilisateur est une pharmacocinétique lente, entraînant un long délai entre l'application de la drogue et l'irradiation, ainsi qu'une photosensibilité accrue pouvant entraîner une vive réaction cutanée en cas d'exposition à la lumière du soleil.

3.5.2. L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA)

Ce composé est l'un des agents thérapeutiques les plus largement étudiés dans la PDT ainsi que dans le photodiagnostique ou diagnostique photodynamique (PDD) au cours de ces dernières années. Il s'agit en fait d'un précurseur, qui une fois administré, va se localiser au niveau intracellulaire pour initié la production d'un photosensibilisateur puissant, la protoporphyrine IX (PP IX) (Figure I.27.)[79].

Ce photosensibilisateur est approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) dans le cadre du traitement des kératoses actiniques (lésions épithéliales précancéreuses) et est commercialisé sous le nom de Levulan®.

Le 5-ALA présente un certain nombre d'avantages importants par rapport à d'autres composés utilisés en PDT : il peut être utilisé en application locale sous forme de crème, de gel, ou en solution liquide, et même en spray ou aérosol pour inhalation, mais surtout systématiquement sous forme de boisson en solution aqueuse. Comme il s'agit d'une substance endogène, les effets secondaires sont minimes. Son action pharmacocinétique est rapide, permet une irradiation quelques heures après l'application (1-6 heures) et la dégradation complète de la PP IX est effective en 2-3 jours. La PDT au 5-ALA a été essayée dans de nombreuses pathologies malignes et non cancéreuses[80,81,82]. De plus des études en phase III sont en cours pour le diagnostic par fluorescence du cancer de la vessie et du cerveau[83].

---

[79] (65) Peng Q.; Berg K.; Moan J.; Kongshaug M.; Nesland J.M. *Photochem. Photobiol.* **1997**, *65*, 235-251.

[80] (66) Marcus S.L.; Sobel R.S.; Golub A.L.; Carroll R.L.; Lindahl S.; D.G., S. *J. Clin. Laser Med. Surg.* **1996**, *14*, 59-66.

[81] (67) Peng Q.; Warloe T.; Berg K.; Moan J.; Kongshaug M.; Giercksky K.E.; Nesland J.M. *Cancer* **1997**, *79*, 2282-2308.

[82] (68) Ibbotson, S. H. *Br. J. Dermatol.* **2002**, *146*, 178-188.

[83] (69) Wang I.; Bendsoe N.; Klinteberg C.A.; Enejder A.M.; Andersson-Engels S.; Svanberg S.; Svanberg K. *Br J Dermatol* **2001**, *144*, 832-840.

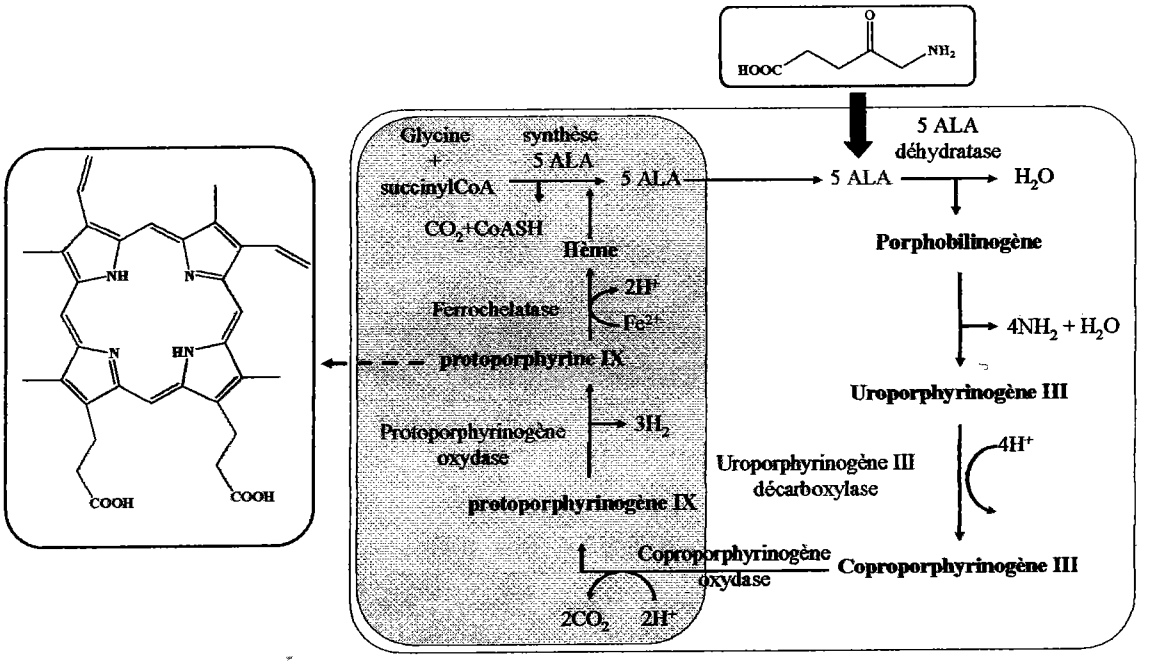


Figure I.27. Synthèse de la Protoporphyrine IX (PP IX) (dans la mitochondrie) à partir du 5-ALA présent dans le cytosol (phase liquide où baignent les organites cytoplasmiques).La flèche bleu correspondant à la régulation (inhibition) de la production du 5 ALA par le hème[84]

3.5.3. La Visudyne®

La Visudyne® (Figure I.28.) est à un dérivé benzoporphyrinique (BPD) commercialisé également sous le nom de verteporfine. Son domaine d'application correspond à l'ophtalmologie, il connaît un grand succès dans le traitement de certaines formes de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Après activation avec une lumière laser non thermique à 690 nm, les néovaisseaux de la rétine, brouillant la vue, sont obturés. Ceci stabilise l'acuité visuelle pendant un temps dans une affection qui sans cela progresse vers la cécité. Comme la DMLA est une des principales causes de cécité chez les sujets âgés, la PDT à la Visudyne® a reçu agrément dans de nombreux pays ce qui fait de ce type de PDT la plus largement utilisée en clinique[85] [86].

---

[84] (70) L. R. Braathen *Photodynamic Therapy - Basic principles and Clinical Experience with Metvix PDT.*

[85] (71) Lim J.I. *Ophthalmol. Clin. North Am.* **2002**, *15*, 473.

[86] (72) Van den Bergh H.; Ballini J.P.; Sickenberg M. *Med. Laser Appl.* **2003**, *18*.

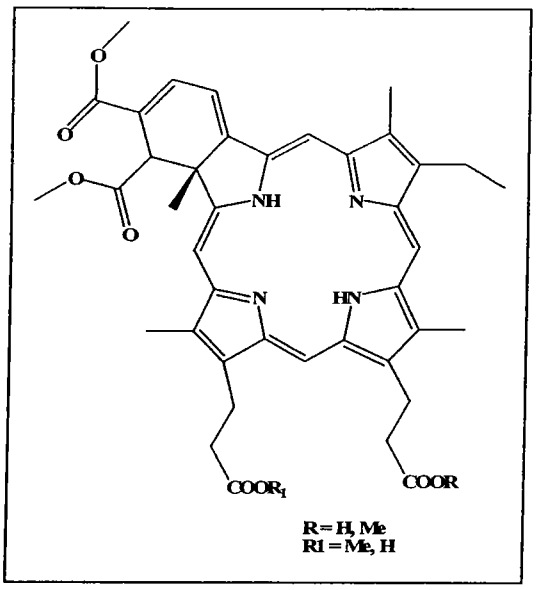


Figure I.28. Structure de l'agent photosensible visudyne®

3.5.4. La méso-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC, Foscan®)

En raison des inconvénients qu'entraînes l'utilisation de Photofrin®, à savoir une pharmacocinétique lente conduisant à de longs délais entre le moment de l'injection de la drogue et l'irradiation, un certain nombre de nouveau photosensibilisant on été développés la *méso*-tétrahydroxyphénylchlorine commercialisée par Biolitec en 2002 sous le nom de Foscan® (m-THPC). Les points forts de ce composé est que son absorption maximum est à 652 nm permettant des traitements en profondeur, que les doses administrées sont relativement base de l'ordre de 0.1 mg/kg et que son activation s'effectue à partir de 10 J/cm². C'est pour cela que ce photosensibilisant est parmi les plus intéressant de sa génération. En comparaison le Photofrin à la m-THPC, il s'avère que cette dernière est 100-200 fois plus efficace en termes de dose globale de PDT.

Pour ces raisons, elle a fait l'objet de nombreux travaux que ce soit au niveau de ses propriétés physico-chimiques[87], de sa diffusion[88] ou sa dégradation[89].

---

87 (73) Bonnett, R. *Gordon and Breach Science Publishers* **2000**.
88 (74) Li Wei Ma; E. Bjørklund; J. Moan *Cancer Letters* **1999**, *138*, 197-201.
89 (75) R. Bonnett; G. Martínez *Tetrahedron Lett.* **2001**, *57*, 9513-9547.

Au sein du laboratoire de spectrométrie de masse et de chimie laser, l'étude par MALDI-TOF/MS de ce photosensibilisateur a été initiée il y a 10 ans déjà par les travaux concernant les porphyrines en milieu aqueux[90], suivi de travaux en milieu cellulaire[91]. Par le biais de cette technique non seulement la caractérisation des agents photosensibles a été possible dans le cadre de la thérapie photodynamique mais également celle de leurs photoproduits.

Comme nous avons pu le voir au chapitre I.3.2., la famille des porphyrines regroupe des agents photosensibles caractérisés par leur noyau tétrapyrrolique, en l'occurrence les bactériochlorines, les chlorines et les porphyrines. Les travaux antérieurs de notre laboratoire ont porté notamment sur la *méso*-tétrahydroxyphénylbactériochlorine (m-THPBC), *méso*-tétrahydroxyphénylchlorine (m-THPC, Foscan®) et la *méso*-tétrahydroxyphénylporphyrine (m-THPP) et plus précisément sur la phototransformation de ces agents photosensibles[92]. Les résultats qui transparaissent, de ces études en milieu aqueux, ont mis en évidence la phototransformation de la m-THPBC en m-THPC suite à une irradiation à λ = 532 nm et 735 nm d'une part et la phototransformation de la m-THPC en m-THPP suite à une irradiation à λ = 650 nm (Figure I.29.). Ces longueur d'ondes correspondant respectivement aux longueurs d'onde d'absorption de l'agent photosensible considéré.

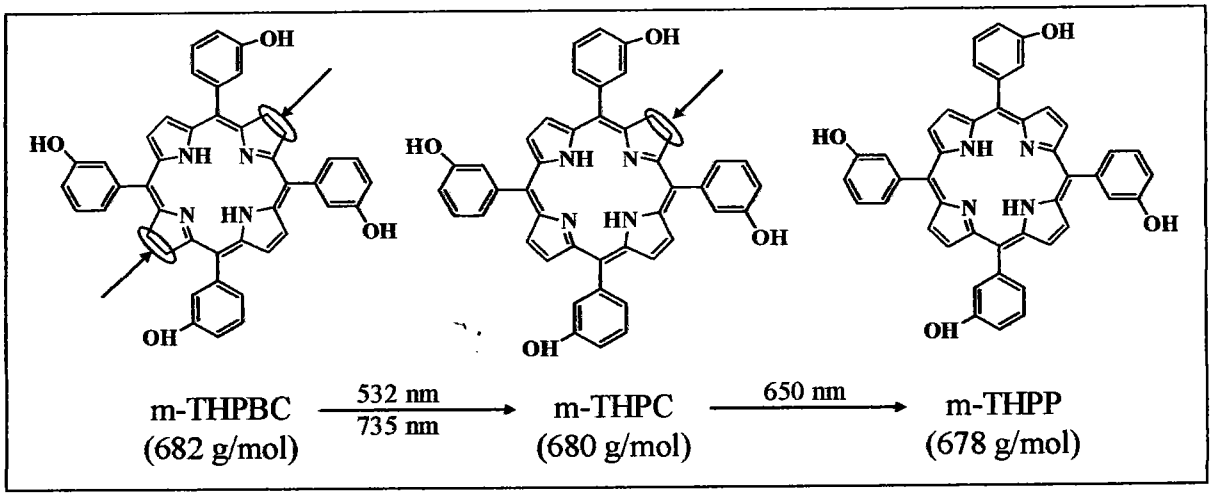


Figure I. 29. Phototransformation en milieu aqueux de la m-THPBC (10^{-5}M) en m-THPC ainsi que de la m-THPC (10^{-5}M) en m-THPP après irradiation laser.

90 (76) Angotti, M. *Thèse à l'Université Paul verlaine, Metz* **2001**.
91 (77) Lourette, N. *Thèse à l'Université Paul verlaine, Metz* **2004**.
92 (78) Angotti M; Maunit B; Muller J F; Bezdetnaya L; Guillemin F *RCM* **1999**, *13*, 597-603.

Ces processus étant liés à la déshydrogénation d'une double liaison du noyau tétrapyrrolique, (Figure I.) les modifications en masse qui en découlent sont de 2 Da. Afin de permettre une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent la thérapie photodynamique, l'étude des photosensibilisants, plus particulièrement celle du Foscan®, s'est orientée vers l'*in situ*.

Pour ce faire, ont été développé des méthodologies et des protocoles MALDI-TOF/MS visant la détection du médicament ainsi que ses photoproduits directement dans des cellules intactes, après traitement PDT (Figure I.30.).

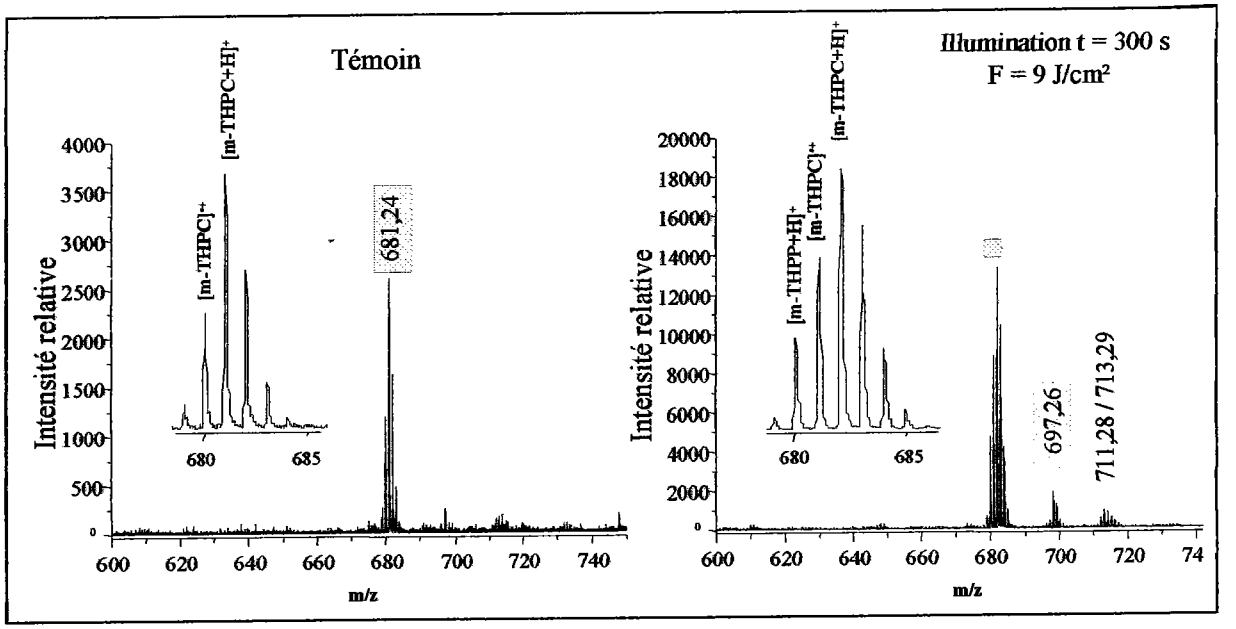


Figure I. 30. Phototransformation de la m-THPC (5 µg/mL) incubée dans les cellules HT29 durant 20h avant et après illumination (diode laser, λ = 652nm, 30mW/cm²).

Pour l'étude *in situ*, le Foscan® a été incubée à hauteur de 5 µg/mL dans des cellules adénocarninomale du colon humain (HT29) durant 20h, puis on été considéré deux échantillons : l'un correspondant à des cellules incubées non illuminées servant de témoin, l'autre étant des cellules incubées illuminées à l'aide d'une diode laser à 652 nm (T = 300s, 30mW/cm²). L'observation des spectres de masse laisse apparaître pour le "témoin", une distribution relative à l'ion $[m\text{-}THPC+H]^{\bullet+}$ à 681,24 Da tandis que pour les cellules illuminées, la formation de photoproduits est visible. Il est possible de noter non seulement la présence de la m-THPP issue de la desydrogénation d'une double liaison du noyau tétrapyrrolique mais également des photoproduits hydroxylés et dihydroxylés à 697,26 Da,

711,28 Da et 713,29 Da. La littérature[93] suggérant de l'ion $[m\text{-}THPC+OH]^+$ pour m/z 697,26 Da dont les différentes propositions de structures sont présentées ci-dessous (Figure I.31.)

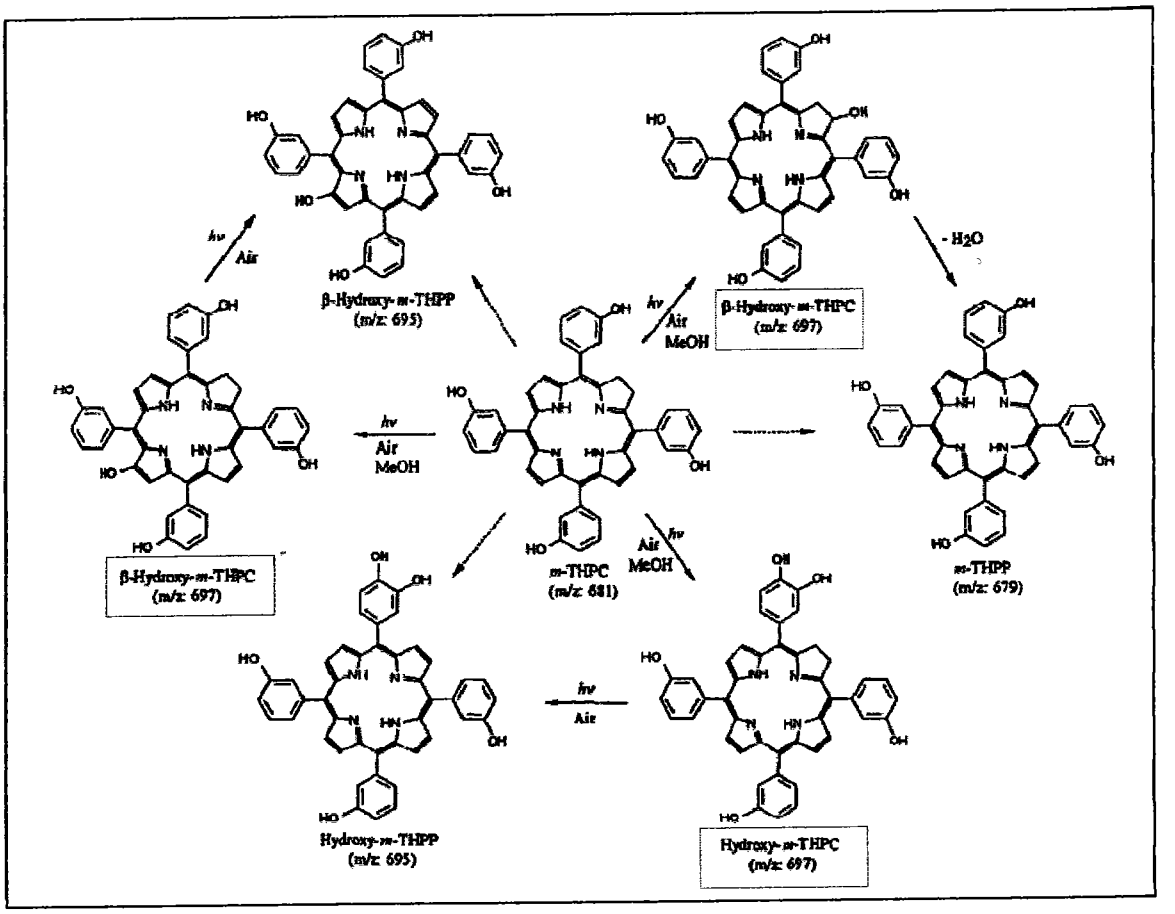


Figure I. 31. Propositions de structures et de voies de formation de composés mono hydroxylés

Quant à l'identification des ions dihydroxylés à 711,28 et 713,29 Da, elle s'est effectuée au moyen d'une technique de fragmentation disponible sur le temps de vol. les fragments respectifs ont permis de proposer des structures et ont mis en évidence que les ions dihydroxylés correspondaient à la m-THPP[94] (Figure I.32.).

93 (79) R. M. Jones; Q. Wang; J. H. Lamb; B. D. Djebal; R. Bonnett; C. K. Lim *Journal of Chromatography A* **1996**, *722*, 257-265(259).

94 (77) Lourette, N. *Thèse à l'Université Paul verlaine, Metz* **2004**.

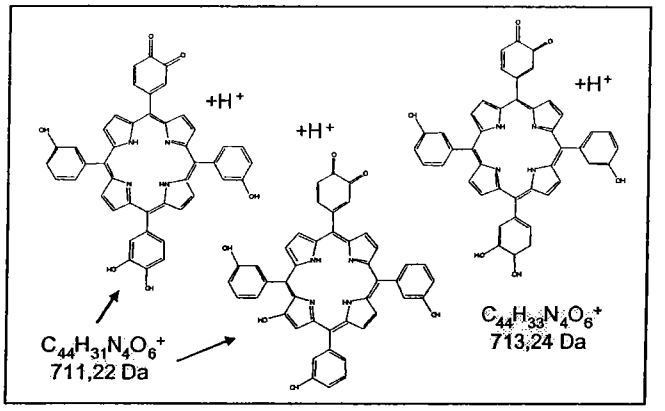


Figure I. 32. Proposition de structure pour les ions issus des études par spectrométrie MALDI-TOF de l'ion parent 711,22 et 713,24.

Les travaux réalisés dans le passé ont permis de nous doter de bases robustes concernant les études par spectrométrie de masse à temps de vol dans le cadre de la thérapie photodynamique. La littérature ainsi que nos travaux personnels nous ont conduit vers une meilleur compréhension du comportement du Foscan® que ce soit en milieu aqueux ou dans le milieu cellulaire. Fort de notre savoir et conscient des potentialités de ce médicament, nous avons souhaité approfondir notre étude en nous penchant sur les effets immédiats in situ du médicament activée lors du traitement photodynamique.

3.6. Les photosensibilisateurs de 3ème génération.

Les photosensibilisateurs de troisième génération sont issus, des photosensibilisateurs de première et/ou de seconde génération qui ont alors été chimiquement modifiés afin d'être reconnus spécifiquement par un type cellulaire permettant ainsi d'augmenter leur effet thérapeutique vis-à-vis du tissu tumoral.

<u>Trois stratégies de synthèse sont particulièrement employées :</u>

i) L'utilisation de groupements hydrophiles permettant de modifier la solubilité du photosensibilisateur dans les milieux biologiques. On peut citer par exemple la fixation de groupements galactosyles et cholesteryloxy[95] ou des groupes anioniques tels que des

[95] (80) C. Schell; H. K. Hombrecher *Bioorg. Med. Chem.* **1999**, *7*, 1857-1865.

groupements sulfates ou carboxylique permettant l'obtention de la « tétraphényl porphyrine trisulfonate » (TPPS3) ou de la « tétracarboxy-phénylporphyrine » (TCPP)[96], ou la fixation de groupements cationiques tels que le cycle pyridinium[97].

Le greffage de groupements glycosylés est un choix tout aussi judicieux car le caractère hydrophile de ces derniers est en faveur d'un meilleur transport du photosensibilisateur dans la cellule tout en limitant les phénomènes d'agrégations[98]. Ces macrocycles tétrapyrroliques (porphyrine) portant des unités glycosylées (Figure I.33.) [99] sont spécifiquement reconnus par des récepteurs lectines présents à la surface des cellules tumorales.

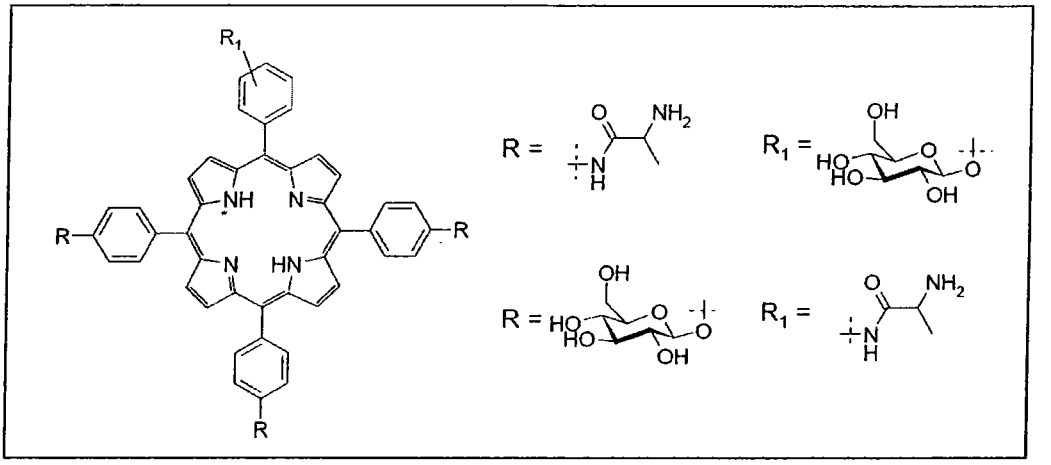


Figure I. 33. Macrocycles tétrapyrroliques portant des unités glycosylées

ii) La deuxième solution repose sur une stratégie de ciblage actif ou adressage. Il existe ainsi plusieurs voies de synthèse afin d'aboutir à un effet spécifique de la part du photosensibilisateur:

L'association d'anticorps monoclonal a un agent photosensible. La biodistribution de photosensibilsateurs notamment le dérivé benzoporphyrinique monoacide ring A (BPD-MA) couplé à un anticorps monoclonal (5E8) spécifique à un antigène présent sur les cellules A549 (cellules carcinomales du poumon humain) a été étudié[100]. Les résultats qui en découlent

---

[96] (81) Pasternack R. F.; Huber P. R.; Boyd P.; Engasser G.; Francesconi L.; Gibbs E.; Fasella P.; Cerio Venturo G.; Hinds L. *J. Am. Chem. Soc.* **1972**, *94*, 4511- 4517.

[97] (82) Kaldapa C.; Blais J. C.; Carré V.; Granet R.; Sol V.; Guilloton M.; Spiro M.; P., K. *Tetrahedron Lett.* **2000**, *41*, 331-335.

[98] (83) V. Sol; J. C. Blais; V. Carré; R. Granet; M. Guilloton; M. Spiro; P. Krausz *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 4431-4444.

[99] (84) G. Csík; E. Balog; I. Voszka; F. Tölgyesi; Oulmi, D.; , P. M.; M. Momenteau *J of Photoch & Photobiol B: Bio* **1998**, *44*, 216-224.

[100] (85) Jiang F.N.; Richter A.M.; Jain A.K.; Levy J.G.; Smits C. *Biotechnol Ther.* **1993**, *4*, 43-61.

montrent que la concentration de l'agent photosensible au niveau de la cible et le temps de rétention BPD-MA sont bien plus importants que pour le dérivé benzoporphyrinique seul (BPD).

Le ciblage via les récepteurs membranaires comme les récepteurs aux LDL fait parti également des voies explorées par la recherche. Les résultats rapportés par Hamblin mettent en avant que le haematoporphyrine associée à des lipoprotéines ciblent des récepteurs apoB/E spécifiques aux LDL, permettant une augmentation de l'assimilation de HP-LDL au sein des cellules[101].

L'utilisation de récepteurs à transferrine[102], ou de facteur de croissance EGF (Epidermal Growth Factor) a également été préconosée. Les travaux basés sur ce principe[103] ont mis en avant le couplage d'une phtalocyanine ($AlPcS_4$) et d'une séquence d'un adénovirus (RGD), motif possédant une grande affinité et spécificité avec les récepteurs intégrines exprimés par certaines lignées cancéreuses tel que les A549 (cellules carcinomales du poumon humain).

Les travaux[104] menés sur la synthèse d'un édifice BSA-insulin-chlorin e6 qui se lie spécifiquement au récepteurs d'insuline de cellules humaines (PLC/PRF/5) ont montré la concentration en agent photosensible modifié pouvant être 100 fois inférieur à la chlorine e6 native pour l'obtention du même résultat.

Le ciblage peut également être effectué via les récepteurs nucléaires comme l'ont montré les travaux de Rosenkranz[105] lors de l'étude de récepteurs à oestrogènes et à insuline avec une séquence NLS (Nuclear Localization Signal).

---

101 (86) Hamblin MR, N. E. *J Photochem Photobiol B.* **1994**, *26*, 147-157.

102 (87) Hamblin MR, N. E. *J Photochem Photobiol B.* **1994**, *26*, 45-56.

103 (88) Allen C. M.; Sharman W. M.; La Madeleine C.; Weber J. M.; Langlois R.; Ouellet R.; van Lier *J. E. Photochem Photobiol.* **1999**, *70*, 512-523.

104 (89) Akhlynina T.V.; Rosenkranz A.A.; Jans D.A.; Sobolev A.S. *Cancer Res.* **1995**, *55*, 1014-1019.

105 (90) Rosenkranz A. A.; Jans D. A.; Sobolev A. S. *Immunol Cell Biol.* **2000**, *78*, 452-464.

Le ciblage des récepteurs membranaires de l'acide folique est également à l'étude[106]. Ces récepteurs, difficiles d'accès à la surface des cellules saines, sont surexprimés à la surface de nombreuses cellules cancéreuses (cancer du cerveau, des ovaires, des poumons en autres) et sont donc des cibles privilégiées. La 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique (Por-COOH-Fa) est l'un des exemples de ces complexes (Figure I.34.).

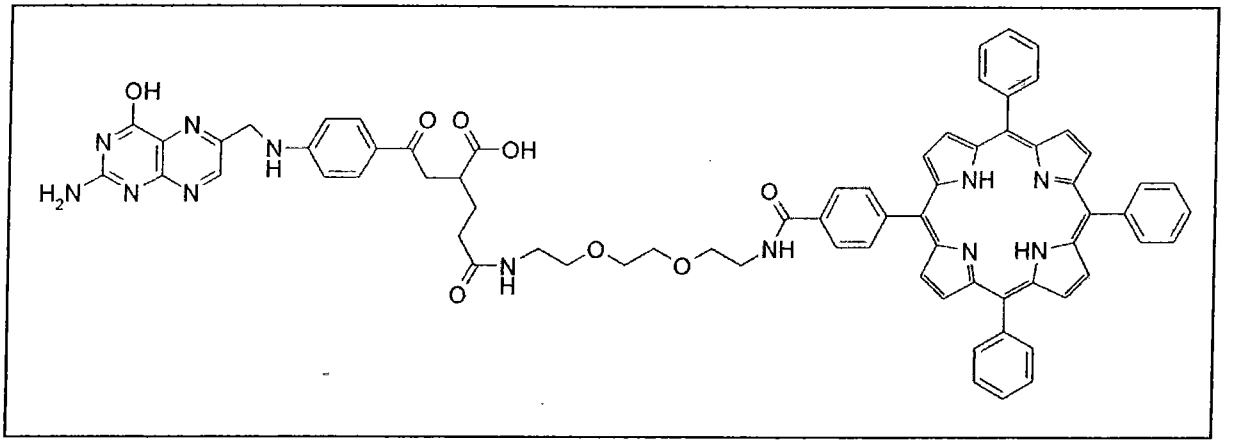


Figure I. 34. Le complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique (Por-COOH-Fa)

Ce dernier a notamment été utilisé lors d'étude PDT sur la lignée cellulaire KB (cellules carcinomales de épiderme humain). Cette étude a révélé une hausse de la concentration de l'ordre de 7 fois du complexe Por-COOH-Fa par rapport à la porphyrine initiale au niveau des cellules cancéreuses ainsi qu'une forte réponse tumorale à l'issu du traitement.

L'émergence de nouveaux types de transport des Photosensibilisateurs via l'utilisation de macromolécules. Le premier aspect de cette vectorisation est l'emploi de dendrimère, macromolécule constituée de monomères qui s'associent selon un processus arborescent autour d'un cœur central plurifonctionnel. La construction arborescente s'effectue par la répétition d'une même séquence de réactions jusqu'à l'obtention à la fin de chaque cycle réactionnel d'une nouvelle génération et d'un nombre croissant de branches identiques. Après quelques générations, le dendrimère prend généralement une forme sphérique, hautement ramifiée et plurifonctionnalisée grâce aux nombreuses fonctions terminales présentes en périphérie (Figure I.35.).

[106] (91) Schneider R.; Schmitt F; Frochot C; Fort Yves; Lourette N; Guillemin F; Muller JF; M., B.-H. *Soumis Bioorganic & Medicinal Chemistry* **2004**.

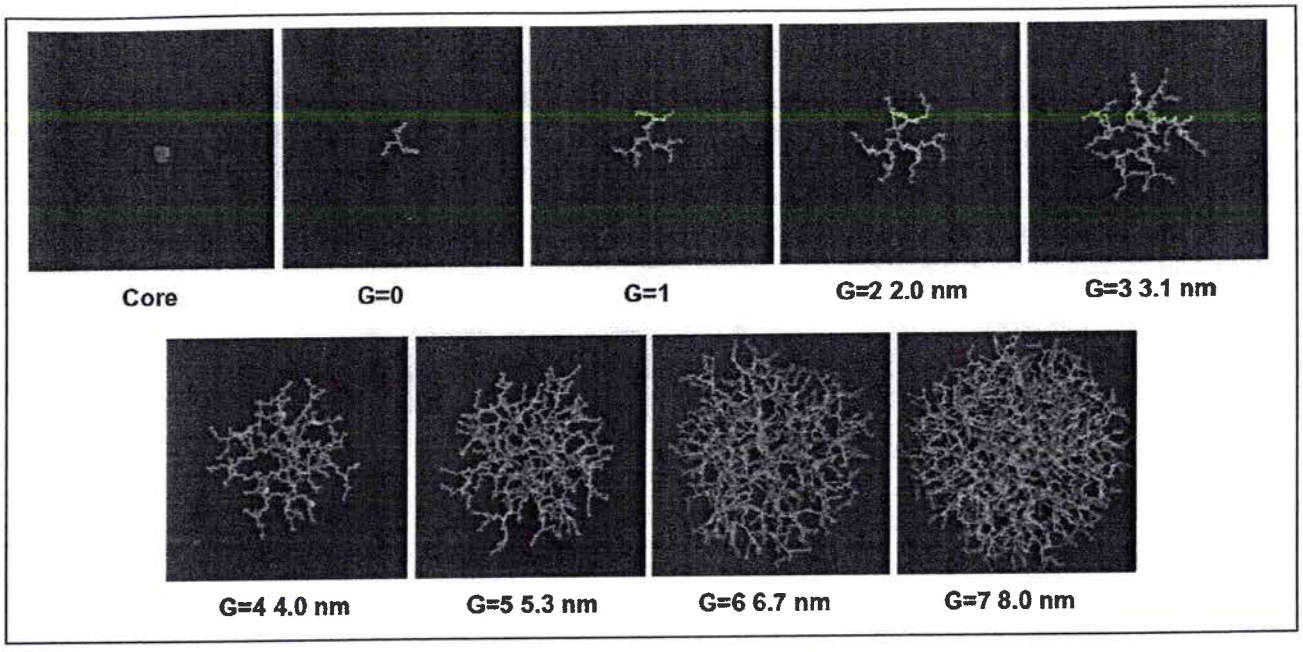


Figure I. 35. Synthèse divergente d'un dendrimère[107]*, s'effectuant du cœur vers la périphérie, en greffant un nombre de plus en plus grand de petites molécules sur la surface multifonctionnalisée du dendrimère*

Des dendrimères ont été étudiés en tant que drogues antitumorales, antivirales, et antibactériennes[108]. En ce qui concerne les drogues antitumorales, les agents thérapeutiques employés principalement dans le cadre de la thérapie photodynamique sont élaborés selon les modes principaux ci-après :

1) Le dendrimère est développé autour d'un photosensibilisateur tel qu'une porphyrine[109]. L'enrobage de ces derniers par du polyéthylène glycol (PEG) ou de l'acide aspartique leur confère une grande solubilisation dans les milieux aqueux ainsi une stabilité dans des conditions physiologiques (pH 6,2 à 7,4). L'édifice étant sensible aux environnements acides tel que le compartiment endosomal intracellulaire (pH ≈ 5,0), il y a désagrégation du dendrimère permettant un relargage du photosensibilisant conduisant à un ciblage accentué[110].

---

107 (92) S. Svenson; D. A. Tomalia *Advanced Drug Delivery Reviews* **2005**, *57*.

108 (93) U. Boas; P.M.H. Heegaard *Chem. Soc. Rev.* **2004**, *33*, 43– 63.

109 (94) Nishiyama N; Stapert HR; Zhang GD; Takasu D; Jiang DL; Nagano T; Aida T; Kataoka K *Bioconjug. Chem.* **2003**, *14*, 58– 66.

110 (95) Zhang G.-D.; Harada A.; Nishiyama N.; Jiang D.-L.; Koyama H.; Aida T.; Kataoka K. *J. Control. Release* **2003**, *93*, 141-150.

2) Le dendrimères peut également être construit autour d'un noyau auquel sont fixés des photosensibilisateurs tel que l'acide 5-aminolaevulinique (ALA). Ces structures étant assimilées soit par diffusion ou transport actif lorsqu'elles ont de petites tailles soit par endocytose pour des édifices plus gros[111]. L'avantage de ce mode d'administration est que l'agent photosensible est délivré sur une plus longue durée permettant des irradiations différées[112].

3) Une autre approche repose sur le PEBBLE (Photonic Explorer for Biomedical use with Biologically Localized Embedding), méthode d'imagerie consistant à incorporer un fluorophore dans une nanoparticule afin de le délivrer dans la cellule tout en les préservant d'interactions mutuelles. W. Tang[113] a effectué l'incorporation de bleu de méthylène dans diverses nanosphères, figure I.36.

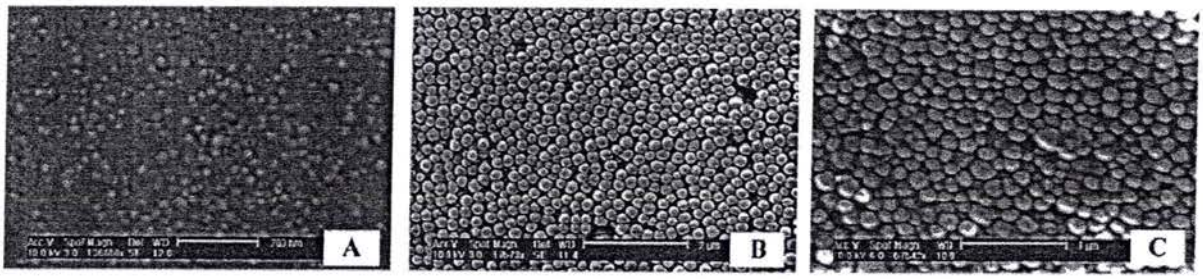


Figure I. 36. Image par microscopie électronique à balayage de nanosphères incorporant du bleu de méthylène (A) particules de polyacrylique, (B) nanoparticules de silice sol-gel et (C) nanoparticules ORMOSIL (organically modified silicate). Les échelles sont respectivement de 200 nm, 2µm et 1 µm.

Une application directe de cette méthode à la PDT concerne l'utilisation du Photofrin® comme agent photosensible[114] encapsulé dans une nanoparticule de polyacrylamide lors du traitement de rats ayant une tumeur au cerveaux (Figure I.37.). Il en ressort de cette étude que la zone tumorale traitée est sujette à une nécrose conduisant à une diminution de la taille de la

---

111 (96) G. M. Di Venosa; A. G. Casas; S. Battah; P. Dobbin; H. Fukuda; A. J. MacRobert; A. Batll *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2006**, *38*, 82-91.

112 (97) S. Battah; S. O'Neill; C. Edwards; S. Balaratnam; P. Dobbin; A. J. MacRobert *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **2006**, *38*, 1382-1392.

113 (98) W.Tang, R. K.; H. Xu; M. Philbert *Photochem. Photobiol.* **2005**, *81*, 242–249.

114 (99) Y.-E. Koo; W. Fan; H. Hah; R. Kopelman; H. Xu; M. Philbert; D. Orringer; B. Ross; A. Rehemtulla *Applied Optics* **2007**, *46*, 1924-1930.

tumeur permettant une disparition de la tumeur dans 60% des cas, 60 jours après traitement PDT.

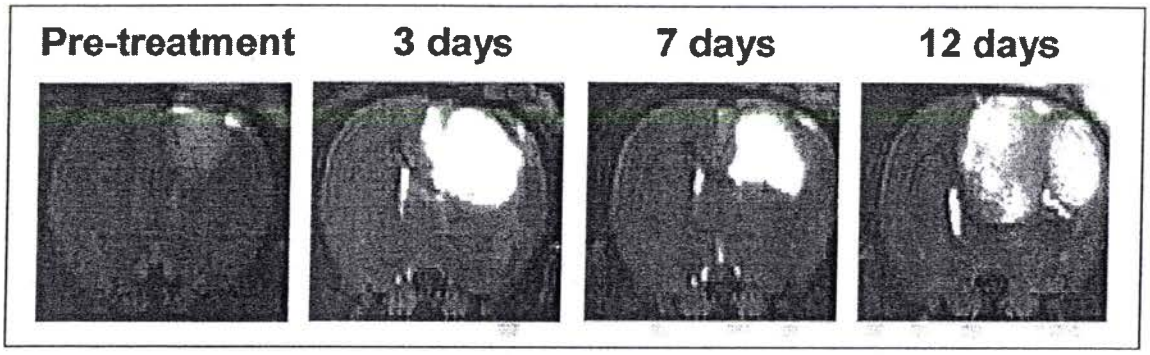


Figure I. 37. Coupe de cerveau de rat traitée par le biais du Photofrin® encapsulé dans une nanoparticule de polyacrylamide (λ = 630 nm).

4. De la PDT vers la spectrométrie de masse

Les avancées de la spectrométrie de masse dans le domaine instrumental, notamment avec l'augmentation de la sensibilité, l'amélioration de la détection et l'optimisation de la préparation des échantillons, permettent aujourd'hui d'analyser des échantillons biologiques.

La contribution majeure de la spectrométrie de masse vis-à-vis de la PDT a été le contrôle de la pureté des photosensibilisateurs synthétisés ainsi que le suivi de ces photosensibilisateurs au cours des processus photodynamiques. Non seulement, elle a permit de mettre en évidence le photosensibilisateur, mais de surcroît elle est apte de caractériser ses produits de dégradations. Aboutissant de ce fait à une meilleure compréhension des phénomènes photochimiques.

Les premiers suivis par spectrométrie de masse de la dégradation de la m-THPC dissoute dans le méthanol, ont été effectués par Jones et coll. par HPLC-ESI/MS en 1996[115]. Ils ont réussi à mettre en évidence la formation de photoproduits de la m-THPC induit par une exposition à la lumière blanche pendant une semaine.

[115] (79) R. M. Jones; Q. Wang; J. H. Lamb; B. D. Djebal; R. Bonnett; C. K. Lim *Journal of Chromatography A* **1996**, *722*, 257-265(259).

En parallèle, au LSMCL, J.-F. Muller, et coll. ont étudié les photoproduits de la m-THPC solvatée par l'éthanol après irradiation laser à 650 nm par MALDI-FTICR/MS. Puis, les photoproduits de la m-THPC incubées avec des cellules malignes HT29 après irradiation laser à 650 nm par MALDI-TOF/MS. De même les travaux menés sur ces photosensibilisateurs ont mis en exergue, qu'une partie de la m-THPBC se transforme en m-THPC suite à une illumination laser à 532 nm et que cette même m-THPC peut générer à son tour de la m-THPP par déshydrogénation, après illumination à 650 nm.

Une réflexion a été engagée au sein de notre laboratoire au cours des années 1998-1999 quant à la possibilité d'étudier par spectrométrie de masse (ICRMS ou TOFMS) le comportement d'agents photosensibles utilisés notamment en PDT (Thèse Marc Angotti 2001). Cette démarche a débouché sur de nombreuses perspectives qui, pour certaines d'entre elles sont devenues réalités. Notamment avec d'une part la détection et la caractérisation de photosensibilisateurs dans des cellules intactes lors du traitement PDT et d'autre part la mise en évidence d'empreintes spécifiques de diverses lignées cellulaires (Thèse Natacha Lourette 2004).

En effet, le travail commencé il y a 10 ans maintenant, tant au niveau protocole d'échantillonnage MALDI qu'au niveau instrumental a été mené dans le but de mettre en place des méthodologies fiables et précises concernant la détection d'une part de composés exogènes au niveau cellulaire et d'autre part de composés endogènes évoluant lors de processus PDT. Le présent travail de thèse a été effectué dans cette lignée.

Chapitre II

Spectrométrie de masse et spectroscopie

Partie instrumentale

TABLE DES MATIERES

1. Les différentes sources d'ionisation **64**

1.1. L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (matrix assisted laser desorption/ionization : MALDI) 65

1.1.1. Historique 65

1.1.2. Principe de la technique MALDI 66

1.1.3. La formation des ions 67

1.1.3.1. Désorption et formation des ions 67

1.1.4. Réactions secondaires dans le nuage gazeux 69

1.1.5. Conditionnement du support d'analyse – échantillonnage MALDI 72

1.1.5.1. Le conditionnement de l'échantillon 72

1.1.5.2. Les différents types de dépôts usuels 73

1.1.5.3. La matrice 74

1.1.5.4. Sélection de la matrice dans le cadre de notre étude 75

1.1.5.5. Etalonnage des spectres de masse 78

1.1.5.6. Conclusion 81

1.2. La source d'ionisation par électronébulisation (électrospray, ESI) 81

1.2.1. Le principe 81

1.2.2. La formation des ions dans le nuage gazeux 83

1.2.2.1. Formation du Spray 83

1.2.2.2. La fission des gouttelettes 83

1.2.2.3. La formation des ions en phase gazeuse 84

1.2.3. Spécificité de notre source électrospray 89

2. Les spectromètres de masse utilisés lors de nos études. 91

2.1. Le spectromètre de masse à temps de vol (Time of Flight : TOF) 91

2.1.1. Principe de l'analyseur à temps de vol (TOF) 92

2.1.2. Evolution de la technique TOF/MS 95

2.1.2.1. Le retard à l'extraction "Delay extraction" 96

2.1.2.2. Le miroir électrostatique (le réflectron) 98

2.1.3. Technique d'analyse à partir d'un ion présélectionné 100

2.1.4. Spécificités et limitations du spectromètre de masse à temps de vol utilisé lors de nos recherches 103

2.1.4.1. Avantages et inconvénients du MALDI-TOF/MS 104

2.2. Le spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions (FT-ICR) 105

2.2.1. Historique 105

2.2.2. Principe du spectromètre à résonance cyclotronique des ions 106

2.2.3. Le piège de Penning et technique ICR (Ion Cyclotron Resonance) 108

2.2.3.1. Le piège de Penning 108

2.2.3.2. La cellule d'analyse FT-ICR 111

2.2.4. Mesure de la fréquence cyclotronique 112

2.2.5. Performances et limitations de l'instrument ICR 116

2.2.5.1. Précision en masse et résolution 116

2.2.5.2. Les modes de fragmentations 118

2.2.6. Transfert des ions de la source vers la cellule 123

3. Les techniques de spectrophotométrie et de microscopie 127

3.1. La spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible 127

3.1.1. Le principe 127

3.2. Le microscope à épifluorescence 129

4. Echantillonnage et protocole d'irradiation laser 133

4.1. Echantillonnage 133

4.1.1. Les composés étudiés 133

4.1.2. Mise en solution des échantillons 133

4.1.3. Le milieu cellulaire 134

4.2. Protocole d'illumination 134

4.2.1. Protocole d'illumination de solution aqueuse 135

4.2.2. Protocole d'illumination laser des monocouches cellulaires 136

Chapitre II

Spectrométrie de masse et spectroscopie
Partie instrumentale

Un grand nombre de travaux ayant comme objectif la compréhension et la mise en évidence de processus inhérents à la thérapie photodynamique repose sur des techniques telles que la spectrophotométrie d'absorption ou la fluorescence. Ce genre d'approche est idéale pour le suivi d'un agent photosensible mais ne permet que rarement d'identifier les composés initiaux et les photoproduits générés lors de ces processus.

Ces dernières années, la spectrométrie de masse à progressivement montrer son utilité dans la compréhension des processus biologiques notamment dans le cadre de la dégradation d'agents photosensibles. Les nouveaux modes d'échantillonnage et ses améliorations techniques en font un outil de choix.

Dans le cadre de nos travaux, nous avons procédé à l'amélioration de protocoles aux vues d'analyses *in situ*. De ce fait, ce chapitre sera consacré à la description des différentes techniques utilisées dans le cadre des études relatives à la thérapie photodynamique.

1. Les différentes sources d'ionisation

Dans le cadre des études menées par spectrométrie de masse, nous avons eu recours sur deux modes d'ionisation : L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (matrix assisted laser desorption/ionization dite MALDI) et l'ionisation par électronébulisation des échantillons (ElectroSpray Ionisation ; ESI).

1.1. L'ionisation par désorption laser assistée par matrice (matrix assisted laser desorption/ionization : MALDI)

Cette technique de désorption/ionisation assistée par matrice, dite "douce", voit le jour au début des années 1980 et repose sur des interactions laser/matière. Les processus mis en œuvre sont d'une haute complexité relevant à la fois les domaines de l'optique, de la thermodynamique et de la mécanique quantique. Après un bref rappel historique, nous allons aborder les différents mécanismes contribuant à l'obtention de spectres de masse.

1.1.1. Historique

Bien avant l'utilisation de la désorption/ionisation assistée par matrice dans les années 80, des expériences furent menées sur le principe de la désorption/ionisation laser à la fin des années 60. Les premiers articles[1,2] relatent de l'utilisation de lasers pulsés pour la désorption/ionisation d'échantillons organiques de faibles masses. L'irradiation de ces molécules via des lasers pulsés CO_2 (λ = 10,6µm) et de lasers UV de haute intensité, mène à la formation d'ions analysés par spectrométrie masse. Si cette désorption laser ionisante laissait envisager des résultats encourageants, les limites instrumentales de l'époque ne permettaient pas l'analyse de molécules organiques possédant des masses supérieures à 2 kDa.

Dans la deuxième moitié des années 80, l'utilisation de la désorption/ionisation assistée par matrice a levée cette limitation. Le principe MALDI est né des investigations de Karas et Hillenkamp[3] sur l'influence de la longueur d'onde des lasers UV dans la désorption. Ainsi le concept d'UV-MALDI est développé entre 1984 et 1986 et résumé dans un article en 1987[4]. Il repose sur l'ajout à l'échantillon d'un composé organique de faible poids moléculaire, cet élément nommé « matrice », présentant une forte absorbance à la longueur d'onde du laser utilisé. Elle a pour rôle d'induire une désorption douce et uniforme, de favoriser l'ionisation par réaction chimique ce qui entraîne l'amélioration du processus de formation des ions.

---

1 (1) Vastola F. J.; Mumma R. O.; Pirone A. J. *J. Org. Mass Spectrom* **1970**, *3*, 101.

2 (2) Hillenkamp F.; Unsöld E.; Kaufmann R.; Nitsche *R. Nature* **1975**, *256*, 119-120.

3 (3) Karas M.; Buchman D.; Hillenkamp F. H. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 2935.

4 (4) Karas M.; Bachmann D.; Bahr U.; Hillenkamp F. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **1987**, *78*, 53.

Une approche alternative a été mise au point en 1987 par Koichi Tanaka (Prix Nobel de chimie 2002)[5]. Elle repose sur l'utilisation de poudre de cobalt, en suspension dans du glycérol, qui absorbe l'énergie laser. Cette démarche permit la détection d'ions moléculaires de protéines de masse proche de 35 kDa. L'approche de Tanaka est devenue fondamentale dans les méthodes standard d'analyses. Plusieurs des technologies de désorption par laser sur le marché (MALDI, Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation (SELDI) et Desorption Ionization On Silicon (DIOS)) sont basées sur les principes élaborés par Tanaka.

Malgré cela, la matrice solide a supplanté le glycérol car les sensibilités enregistrées étaient au moins 500 fois supérieures à celle du liquide avec un signal de meilleure qualité.
A l'heure actuelle, la technique MALDI est devenue une technique incontournable en spectrométrie de masse notamment pour de nombreuses applications dans le domaine bio-organique et notamment celui de la protéomique. Bien que le mécanisme exact du MALDI n'ait pas encore été totalement élucidé, son principe de base peut être annoncé comme suit.

1.1.2. Principe de la technique MALDI

La technique MALDI repose sur la détection d'un échantillon, l'analyte (A) cocristallisé dans un composé organique de faible poids moléculaire (150 - 250 Da), la matrice (M). Pour l'analyse, la matrice (M) est en très large excès vis-à-vis de l'analyte (A), 1000 à 10000 fois environ. Après dépôt d'une goutte de ce mélange sur la plaque d'échantillonnage, l'évaporation du solvant permet la cocristallisation du mélange analyte/matrice. Puis celui-ci est irradié par un laser à impulsions dont la longueur d'onde correspond à une bande d'absorption de la matrice. Ainsi, la matrice va servir à protéger l'analyte des photons incidents au moment de l'impact laser, de refroidir les ions (distribution plus fine de l'énergie cinétique) et d'améliorer le rendement d'ionisation. Dans la majeure partie des cas, l'irradiation laser s'effectue dans la gamme de longueur d'onde de l'ultraviolet (λ = 266, 337 et 355nm), mais certains instruments sont développés pour travailler dans l'infrarouge (λ = 2,94 μm)[6].

---

[5] (5) Tanaka K.; Waki H.; Ido Y.; Akita S.; Yoshida Y.; Yoshida T. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151 - 153.

[6] (6) J. Kampmeier; K. Dreisewerd; M. Schurenberg; K. Strupat *Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes* **1997**, *169-170*, 31-41.

Pour obtenir un résultat optimal, l'analyte ne doit pas ou très peu absorber à la longueur d'onde du laser. Ainsi, lors des impacts lasers, 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, passage d'une phase condensée vers une phase gazeuse. Au cours du processus de désorption qui suit l'impact laser, une partie de l'énergie absorbée par la matrice est transférée aux molécules cibles. Ceci se traduit par une coéjection d'espèces moléculaires (A) intactes et de fragments de la matrice (M). Il y a formation d'ions par transfert de protons ou transfert d'électrons entre la matière photoexcitée et l'analyte. Toutefois ce transfert d'énergie reste faible[7], le rendement d'ionisation ayant été estimé à environ 10^{-4}. Les espèces ioniques ainsi générées sont produites majoritairement selon des processus de protonation $[A+H]^+$, de cationisation $[A+K]^+$ et $[A+Na]^+$ (détection mode positif), de déprotonation $[A-H]^-$ et d'addition d'atomes halogènes tels que le chlore $[A+Cl]^-$ (détection en mode négatif)

1.1.3. La formation des ions

1.1.3.1. Désorption et formation des ions

Le phénomène de désorption correspond à un processus où les molécules passent d'une phase condensée à une phase gazeuse. Lors de ce phénomène de désorption, le dépôt analysé est ablaté, il y a éjection de matière. La profondeur de la couche attaquée par le faisceau laser dépend de l'intensité du faisceau. Dans le cas d'un faisceau ayant une intensité assez importante ($>10^8$ W/cm²), il y a formation à la surface de l'échantillon d'un plasma constitué en majeur partie d'espèces neutres, d'ions positifs et d'ions négatifs. Cependant, dans le contexte du MALDI, l'irradiance employée est plus faible et le terme « nuage gazeux » s'impose.

Il a été montré que, lors des processus MALDI, pour que la désorption entraîne la formation d'ions, l'énergie de l'impulsion laser doit être supérieure à une valeur seuil limite. Ces

[7] (7) Mowry C. D.; Johnston M.V. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 569-575.

processus sont influencés par de nombreux paramètres notamment l'irradiance[8], la longueur d'onde, la durée de l'impulsion laser et le diamètre d'impact laser[9], ceux-ci ayant des répercutions directes sur le rendement d'ions. De bons résultats sont alors obtenus pour une gamme d'irradiance très étroite proche du seuil de formation des ions (10^6 à 5.10^7 W/cm²) dénommé fenêtre MALDI, selon la longueur d'onde et l'échantillon analysé (Figure II.1.).

De plus, suivant la longueur d'onde utilisée, le mécanisme MALDI fera appel soit à des processus essentiellement thermiques (IR-MALDI), soit à des processus photochimiques (UV-MALDI). Des travaux réalisés au moyen de la dynamique moléculaire, sur le processus MALDI, par Zhigilei[10] ont permis d'estimer la vitesse d'éjection des molécules d'échantillon sous un régime d'ablation. Leurs simulations suggèrent que les molécules d'échantillons éjectées sont incorporées dans des agrégats de molécules de matrice et sont désolvatées durant le développement du nuage gazeux, soit grâce à l'accélération produite par le champ électrique[11], soit lors d'une préformation des ions à proximité du support d'échantillonnage[12]. Dans cette publication Russell et coll., deux voies de formation des ions sont avancées, l'une qui aurait lieu au niveau du porte-échantillon et la seconde dans le nuage gazeux.

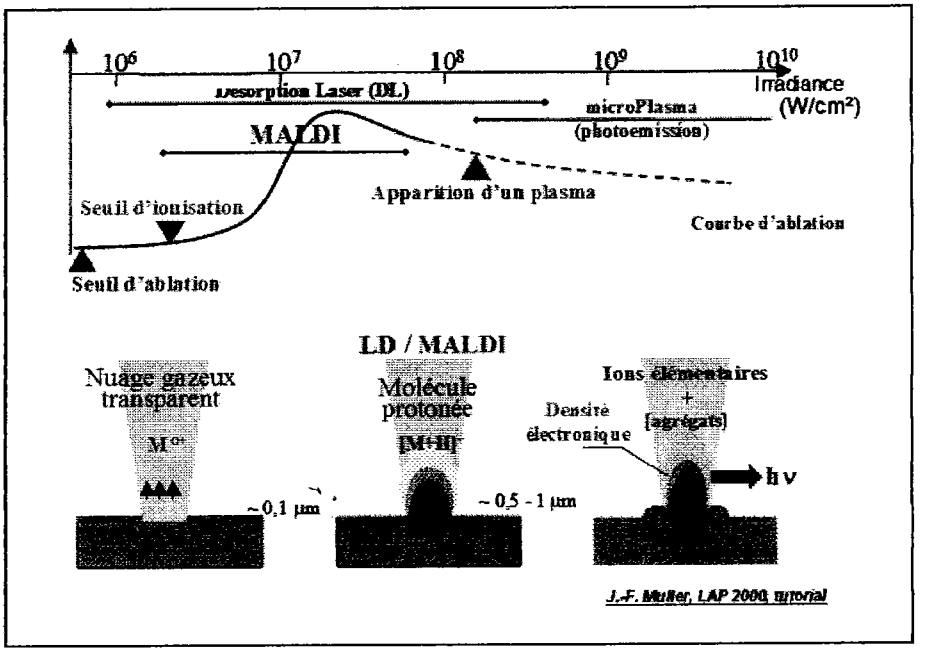


Figure II. 1. Courbe d'ablation et fenêtre MALDI

8 (8) Ens W.; Mao Y.; Mayer F.; Standing K. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1991**, *5*, 117.

9 (9) Dreisewerd K.; Schürenberg M.; Karas M.; Hillenkamp F *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **1995**, *141*, 127-148.

10 (10) Zhigilei L. V.; Yingling Y. G.; Itina T. E.; Schoolcraft T. A.; Garrison B. J. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **2003**, *226*, 85-106.

11 (11) Fournier I.; Brunot A.; Tabet J. C.; Bolbach G. *Int. J. Mass Spectrom.* **2001**, *213*, 203-215.

12 (12) Kinsel G. R.; Edmondson R. D.; Russell D. H. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 714-722.

Néanmoins la désorption de petits agrégats de matrice et d'échantillon est de plus en plus discutée. Le modèle de Karas et coll.[13] repose sur une possible similarité entre l'ionisation par électrospray et le MALDI. De gros agrégats sont formés suite à l'impact laser sous la forme de précurseurs multiprotonés en présence d'une matrice acide[14]. Des phénomènes de désolvatation par des molécules de matrices neutres ont lieu jusqu'à l'obtention d'ions relatifs à l'espèce d'intérêt. Ce modèle met en avant le rôle d'électrons produits par photoionisation qui réduiraient l'état de charge des agrégats et conduisant ainsi à l'obtention de quelques ions monochargés. Tabet[15] et coll. ont quant à eux étudié, via un analyseur à temps de vol, l'influence de l'énergie laser, le potentiel d'accélération et le délai d'extraction des ions sur l'abondance d'agrégats d'insuline protonés en mélange avec l'acide sinapinique utilisés en tant que matrice. Les ions détectés proviennent, dans ce cas, de la fragmentation de gros agrégats. Plus ceux-ci sont gros et plus la relaxation de leur énergie interne est efficace et ils résistent d'autant plus alors à la région d'extraction.

Finalement, l'étape de désorption ionisation reste encore relativement énigmatique et reste toujours le sujet de nombreuses études. En ionisation MALDI, la production des ions est donc étroitement liée dans une première étape à la désorption, puis à des réactions secondaires ayant lieu dans la plume.

1.1.4. Réactions secondaires dans le nuage gazeux

Les différents types de réactions secondaires ayant lieu dans le nuage gazeux ont été répertoriés par Knochenmuss et Zénobi[16,17]. Il apparaît que ces processus peuvent influencer de façon déterminante le spectre de masse. La distinction entre les évènements primaires et secondaires se fait sur une base temporelle, correspondant respectivement au temps nécessaire à la désorption (quelques microsecondes) avec l'expansion d'ions préformés et à celui de la durée de vie du nuage gazeux. En effet, des réactions entre les ions et les neutres vont avoir lieu au sein du nuage gazeux. Ainsi, des ions peuvent être formés après l'impact laser à des

---

13 (13) Karas M.; Glückmann M.; Schäfer J. *J. Mass Spectrom. Rev.* **2000**, *35*, 1–12.

14 (14) Krüger R.; Pfenninger A.; Fournier I.; Glückmann M.; Karas M. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 5812 - 5821.

15 (15) Livadaris V.; Blais J. C.; Tabet J. C. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2000**, *6*, 409.

16 (16) Zenobi R.; Knochenmuss R. *Mass Spectrometry Reviews* **1998**, *17*, 337 - 366.

17 (17) Knochenmuss R.; Zenobi R. *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 441-452.

distances (une dizaine de micromètres) et à des temps considérables (des dizaines voire des centaines de nanosecondes)[18].

Quatre types de réactions secondaires peuvent être distingués (dans le cadre d'une analyse d'ions positifs).

a) Le transfert de protons

Le transfert de protons[19] est probablement le phénomène le plus important des réactions secondaires en MALDI. Ce transfert a généralement lieu entre la matrice (M) et l'analyte (A). Une affinité protonique des échantillons tels que des peptides et des protéines (>900 kJ/mol) plus grande que celle des matrices typiquement utilisées (entre 850 et 900 kJ/mol) est à l'origine de ce phénomène.

$$MH^+ + A \rightarrow M + AH^+$$ (M : matrice ; A : analyte)

Cependant, la matrice ne doit pas être considéré comme seule source de protons. Une étude de la matrice nitroanthracène, qui n'a pas de protons échangeables[20] a mis en évidence la formation de ions moléculaires protonés. Dans ce cas, il a été établit que, la source du proton n'était pas la matrice mais le solvant voire l'échantillon lui-même. Ainsi, la protonation d'une molécule peut provenir de différents processus[21]. En considérant A et B l'analyte, M la matrice et Me un ion métallique, les processus peuvent être décris de la façon suivante :

- <u>Réduction de l'état de charge net d'adduits de métaux (Me):</u>

$$AMe^{2+} + M \rightarrow [(A-H)Me]^+ + MH^+$$

- <u>Délocalisation de proton de molécules multiprotonées:</u>

$$A(nH)^{n+} + M \rightarrow A[(n-1)H]^{(n+1)+} + MH^+$$

- <u>Echanges de protons:</u>

$$M^{+\bullet} + M \rightarrow [M-H]^{\bullet} + MH^+$$

---

[18] (18) Vertes A.; Irinyi G.; Gijbels R. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2389 - 2393.

[19] (19) Breuker K.; Knochenmuss R.; Zhang J.; Stortelder A.; Zenobi R *Int. J. Mass Spectrom.* **2003**, *226*, 211-222.

[20] (20) Wong C. K. L.; So M. P.; Chan T.-W. D. *Eur. J. Mass Spectrom.* **1998**, *4*, 223 - 232.

[21] (21) Knochenmuss R.; Stortelder A.; Breuker K.; Zenobi R. *J. Mass Spectrom.* **2000**, *35*, 1237-1245.

- Interconversion entre matrice protonée et son adduit sodique:

$$MNa^+ + M \rightarrow [M-H]Na + MH^+$$

- Transfert de cation Na^+ entre analyte-matrice:

$$A + (BNa)^+ + M \rightarrow AH^+ + B + [M-H]Na$$

b) Le transfert de cations

Le transfert de cations entraîne la formation d'adduits[22]. Même si l'affinité cationique des molécules est beaucoup plus faible que leur affinité protonique, cette réaction est possible, d'un point de vue thermodynamique. La cationisation est typiquement observée pour les échantillons qui ont des très faibles affinités protoniques, inférieures à celle de la matrice. La matrice, la plus utilisée pour former des cations est le dithranol. Des travaux ont notamment montré que le dithranol cationisé (Na^+) était en mesure de transférer directement le sodium vers l'analyte (diméthoxyéthane, DME) sans passer par un intermédiaire (adduit, [DME + Na + dithranol]$^+$)[23].

c) Le transfert d'électrons

Le transfert d'électrons a été mis en évidence pour certaines combinaisons de matrice et d'échantillon[24,25], lorsque l'énergie d'ionisation (EI) de la matrice est plus grande que celui de l'échantillon.

$$M^{+\bullet} + A \rightarrow M + A^{+\bullet}$$

Mais de telles réactions ne sont pas fréquemment observées en UV-MALDI puisque les potentiels d'ionisation (PI) des matrices sont le plus souvent plus faibles que ceux de l'échantillon.

---

22 (5) Tanaka K.; Waki H.; Ido Y.; Akita S.; Yoshida Y.; Yoshida T. *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 151 - 153.

23 (22) Zhang J.; Knochenmuss R.; Stevenson E.; Zénobi R. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *213*, 237-250.

24 (23) Macha, S. F. M., T. D.; Limbach, P. A. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *397*, 235-245.

25 (24) McCarley, T. D. M., R. L.; Limbach, P.A. *A. Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4376 – 4379.

d) La capture d'électrons

La capture d'électrons est un concept proposé récemment pour expliquer la prédisposition de la technique UV-MALDI à former des ions monochargés, nommé par Karas "lucky survivors"[26]. En effet les électrons libres, présents en quantité non négligeables, vont jouer un rôle significatif en neutralisant un grand nombre d'ions positifs dans le nuage gazeux. Ces électrons sont formés par un effet photoélectrique du support d'échantillonnage en général métallique. Une étude en UV-MALDI-FTICRMS, (spectromètres de masse par résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier), sur les ions négatifs SF^{6-} a révélé que le rendement en électrons dépendait de l'épaisseur du matériel organique déposé et devient négligeable pour un dépôt supérieur à 1 mm[27]. Ces électrons ont un rôle important car ils réduisent les charges positives et modifient la balance des charges dans le nuage gazeux. Toutefois, ces photoélectrons apparaissent comme des artefacts liés à l'irradiation laser du substrat et non à un évènement intrinsèque au processus MALDI.

1.1.5. Conditionnement du support d'analyse – échantillonnage MALDI

1.1.5.1. Le conditionnement de l'échantillon

Il existe de nombreux protocoles prédéfinis pour l'analyse en MALDI. Bien que les grandes lignes soient bien définies, chaque analyse de nouveaux produits nécessite une optimisation particulière, basée sur le choix de la matrice, le solvant ou mélange de solvatation, le rapport matrice/analyte, le support d'analyse ou encore le type de dépôt. Tous ces paramètres ont un impact direct sur l'obtention d'un bon spectre de masse. Après un rappel des différentes techniques de dépôt et une revue des différentes matrices employées généralement en MALDI, nous reviendrons sur notre démarche expérimentale lors de la mise en œuvre de notre échantillonnage.

---

26 (13) Karas M.; Glückmann M.; Schäfer J. *J. Mass Spectrom. Rev.* **2000**, *35*, 1–12.

27 (25) Frankevich V.; Knochenmuss R.; Zenobi R. *Int. J. Mass Spectrom.* **2002**, *220*, 11-19.

1.1.5.2. Les différents types de dépôts usuels

Les trois dépôts les plus fréquemment employés peuvent être résumés comme suit :
a) **La goutte sèche**[28] (dried droplet) ou encore dépôt en mélange intime est la méthode la plus fréquemment employée. La matrice (M) et l'échantillon (A) sont mélangés le plus souvent à volume équivalent. Cependant, la matrice et l'échantillon doivent être préférentiellement solubles dans des solvants identiques, afin d'éviter la migration de l'échantillon lors du séchage, ce qui entraînerait l'hétérogénéité du dépôt (Figure II.2.).

b) **La couche mince** (thin layer) se fait en deux étapes. La matrice (M) et l'échantillon (A) sont déposés indépendamment au même endroit après cristallisation de la première couche. Deux variantes sont exploitées, soit l'échantillon est recouvert de la matrice après évaporation du solvant, soit l'échantillon est déposé sur la fine pellicule de matrice cristallisée. Le recours à ce mode de dépôt se faisant dans le cas où le milieu de solvatation de la matrice et de l'analyte n'est pas miscible. Il en va de même pour le mode de dépôt suivant.

c) La méthode dite **"sandwich"** est une variante de la couche mince. En effet, une première couche de matrice (M) est déposé, puis d'une goutte d'échantillon (A) et enfin à nouveau d'un film de matrice (M). Chaque dépôt est effectué après la cristallisation du précédent.

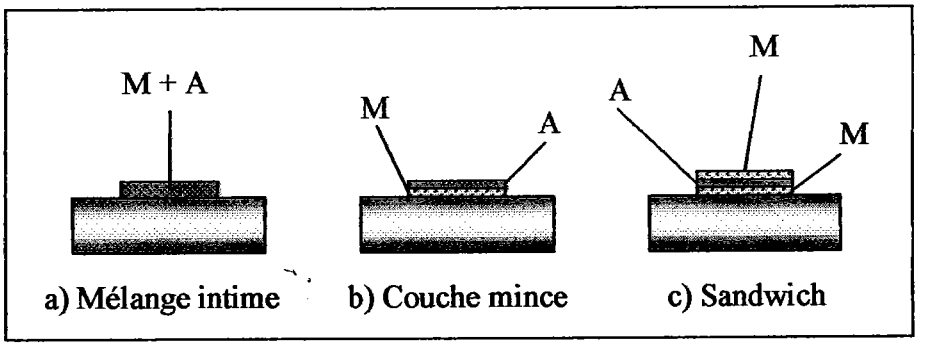


Figure II. 2. Représentation des différents types de dépôts usuels: (a) en mélange intime, (b) en couche mince et (c) en sandwich

[28] (26) Karas M.; Hillenkamp F. *Anal. Chem.* **1988**, *60*, 2299 - 2301.

1.1.5.3. La matrice

Comme nous l'avons vu précédemment, la matrice est un élément majeur concernant la bonne détection de nos composés. Pour être efficace, la matrice doit répondre à certains critères, notamment :

- Avoir un poids moléculaire faible afin que ses adduits ou/et ses fragmentations soient les plus faibles possibles.
- Favoriser la séparation et une distribution homogène des molécules d'analytes pour réduire les forces intermoléculaires entre celles-ci. En entourant les molécules de l'échantillon, la matrice préserve l'analyte d'une dégradation photochimique d'une part lors des impulsions laser, tout en étant inerte chimiquement vis-à-vis du composé étudié et d'une dégradation thermique d'autre part grâce à des interactions spécifiques comme des liaisons hydrogènes.
- Etre compatible avec un milieu de solvatation identique à celui de l'analyte, pour un bon transfert d'énergie et pour une cocristallisation homogène et complète.
- Absorbée préférentiellement à la longueur d'onde du laser d'ionisation et ainsi limiter les phénomènes d'adduits. Elle constitue ainsi, un centre de transfert d'énergie entre le rayonnement laser et le composé analysé. De plus, elle favorise l'ionisation en induisant notamment des transferts de protons de la matrice vers l'analyte.
- Présenter une faible enthalpie de sublimation avec toutefois une vitesse d'ablation relativement importante, afin de créer un jet supersonique permettant la codésorption des molécules cibles.

À la vue de tous ces critères, il est évident qu'une matrice universelle n'est pas envisageable et parmi les nombreux composés possédant ses caractéristiques, seul un nombre restreint donne de bons résultats. Parmi celle-ci, certaines semblent être moins sensibles que d'autres à la présence de contaminants, souvent rencontrés dans le matériel biologique. Il est donc souvent nécessaire d'adapter la nature de la matrice à chaque type de famille de composés étudiés. Toutes les matrices que nous emploierons ont un point commun qui tient à leur caractère acide, favorisant les transferts de protons. Cependant, des matrices de nature basique

(telle que la 2-amino-5-nitropyridine) ont été synthétisées et ont permis l'analyse et la détection de petites protéines (< 12 Da) et d'oligonucléotides (< 20 bases)[29].

1.1.5.4. Sélection de la matrice dans le cadre de notre étude

Le composé majeur analysé lors de ces études est l'agent photosensible Foscan®. De ce fait, nous avons pris les précautions suivantes ; tout d'abord toutes les manipulations ont été réalisées dans un environnement sombre afin d'éviter toute photodégradation suite à une exposition à la lumière solaire. Ensuite, nous avons vérifié par spectroscopie UV-visible que cet agent photosensible et d'autres composés d'intérêts n'absorbent pas ou très peu ($\varepsilon < 2.10^4$) la longueur d'onde d'ionisation MALDI (λ = 337 nm), afin d'éviter des réactions photoinduites dans la source liées à l'irradiation laser MALDI. (Figure II.3)

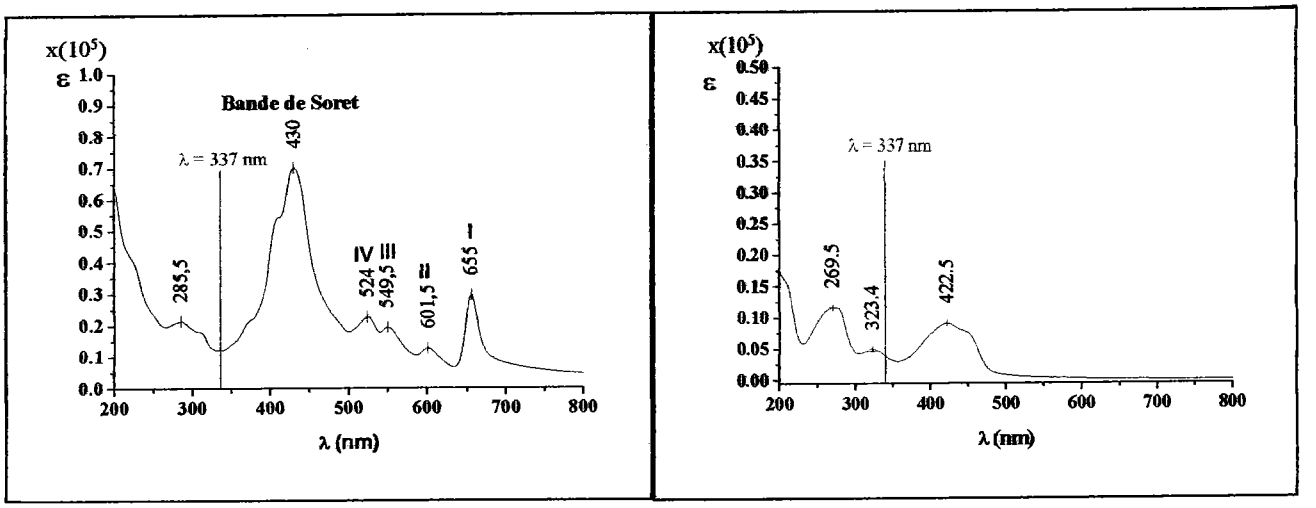


Figure II. 3. (a)Spectres d'absorption UV-visible du Foscan® à 10-5M en milieu éthanol/eau (v:v, 1/99); (b) Spectres d'absorption UV-visible de la sonde DPBF à 10-5M en milieu éthanol/eau (v:v, 1/99).

Nous avons procédé par la suite à l'optimisation de notre protocole d'échantillonnage. Comme nous l'avons vu précédemment, une bonne analyse MALDI repose sur le choix de la matrice, du milieu de solvatation et de la nature de l'échantillon. Pour ce faire, nous nous

[29] (27) Fitzgerald M. C.; Parr G. R.; Smith L. M. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3204-3211.

sommes basés sur des études réalisées au sein du laboratoire LSMCL par UV-MALDI-FTICR-MS sur des agents photosensibles similaires[30],[31].

Dans le cadre des études menées sur des échantillons de faible poids moléculaire, notre choix de matrice s'est porté sur l'acide 2,5-dihydroxybenzoique (2,5DHB). Les échantillons (Foscan® 10^{-5}M ; DPBF 10^{-4}M en milieu éthanol/eau) et la matrice 2,5DHB (10^{-1} M, ACN/eau) sont mélangés puis déposés sur le support d'analyse (échantillonnage mode goutte sèche). La matrice 2,5 DHB a pour avantage d'être polyvalente dans ses applications, cependant elle présente une hétérogénéité cristalline au niveau macroscopique car en se solidifiant, elle forme des cristaux en forme d'aiguille en périphérie du dépôt. Cette hétérogénéité peut être atténuée en jouant sur le milieu de solvatation de la matrice. Cette démarche sera discutée de manière plus explicite dans le chapitre III.

En ce qui concerne les études en milieu cellulaire, plus précisément l'analyse de cellules intactes, nous avons été amenés à mettre au point un protocole adapté d'une part à la détection de composés internalisés de faibles masses (agent photosensible et sonde à oxygène singulet) et d'autre part à l'analyse de l'empreinte protéique de cellules traitées.

De l'analyse de monocouches de cellules cancéreuses humaines HT29 (adénocarcinomales du colon) et MCF7 (adénocarcinomales du sein) sur lamelles de verre, correspondant au support de croissance de ces cellules adhérentes, et dans un soucis de reproductibilité et d'optimisation des résultats, un nouveau protocole de dépôt a été mis en place.

Les cellules considérées sont des cellules incubées (37°C, 5% CO_2) avec du milieu de croissance (RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v) contant du Foscan® (10^{-5} M) et du DPBF (10^{-4} M). Au bout de 5 heures, nous les avons lavé par deux fois au RPMI et par trois fois au PBS. Suite à cela, la monocouche cellulaire est relavée avec une solution de matrice 2,5DHB (ACN/eau, 7/3, v/v +0,1% TFA), avant d'être immergée dans un bain de cette même matrice durant 2 secondes (Figure II.4.). Dès que la cristallisation de la matrice est effective, l'analyse peut débuter.

---

30 (28) Angotti M. *Thèse de l'Université Paul Verlaine, Metz, France* **2001**.

31 (29) Lourette N. *Thèse de l'Université Paul Verlaine, Metz, France* **2004**.

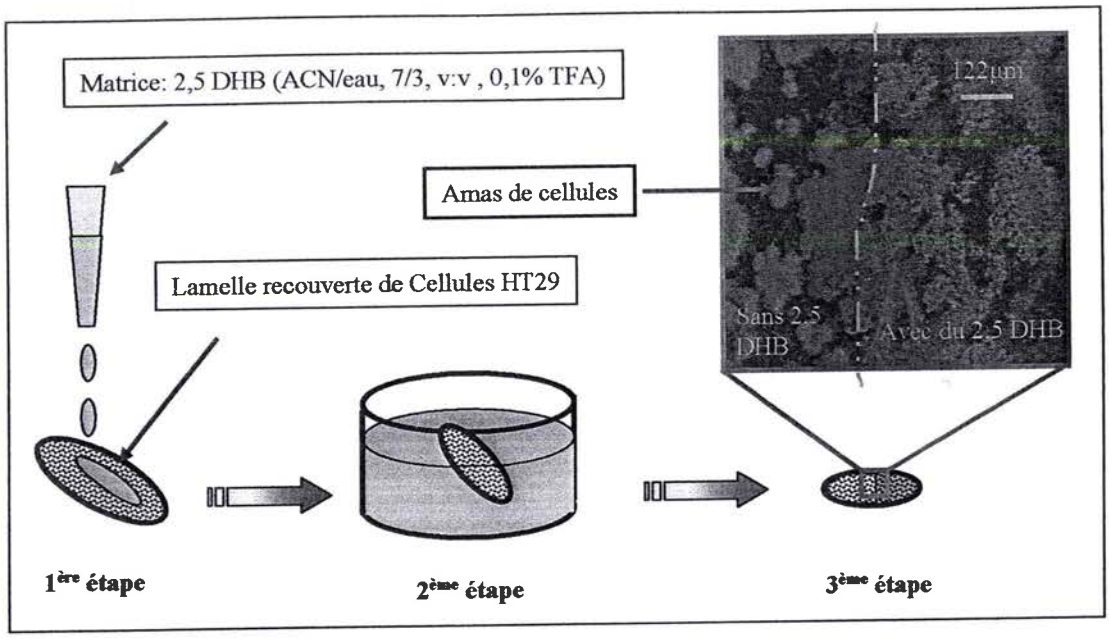


Figure II. 4. Dépôt par immersion des monocouches cellulaires HT29 sur lamelle de verre. L'immersion partielle de la lamelle de verre met en avant la cristallisation ciblée de la matrice 2,5 DHB au niveau des amas cellulaires.

Il s'est avéré que ce protocole était surtout destiné à la détection de petites molécules internalisées, l'analyse d'empreintes protéiques (masse > 6 kDa) de cellules intactes pouvant être obtenu via la méthode des couches minces en utilisant de l'acide sinapinique . Pour l'optimisation de la proportion des solvants de SA, nous nous sommes inspirés des méthodes proposées par Chaurand et de Caprioli[32] qui utilisent comme matrice SA, en solution dans un mélange eau/acétonitrile, (50/50 ; v/v).

Il est à noter que l'utilisation de CHCA et SA présentent deux avantages dans l'analyse de composés biologiques. Tout d'abord, les dépôts formés sont homogènes, à l'issu de leur cristallisation, il y a formation de petits cristaux qui permettent l'obtention de bonnes résolutions spectrales. De surcroît, leur faible solubilité dans l'eau permet de laver les dépôts avec de l'eau froide pour éliminer les sels sans dissoudre l'échantillon.

32 (30) Chaurand P.; Caprioli R. *Electrophoresis* **2002**, *23*, 3125-3135.

Afin d'accentuer l'homogénéité des dépôts, les solutions de matrices sont placées au bain à ultrasons pour une durée de 15 minutes avant chaque utilisation. Comme nous l'allons vu précédemment, la matrice doit envelopper l'analyte afin de le préserver lors de l'analyse. Un autre facteur important est le rapport matrice/échantillon. Afin d'obtenir une bonne acquisition, le rapport molaire matrice/échantillon peut varier de 1000/1 à 100 000/1, la proportion en matrice étant plus importante lors de l'étude de petites molécules. Lors de nos différentes expériences, nous avons obtenu des résultats satisfaisants pour des rapports en concentration matrice/échantillon de 100 000/1 à 10 000/1.

Suite à nos études sur cellules intactes, nous avons effectué une première approche en protéomique ciblée via la spectrométrie de masse MALDI-FT-ICR. Suite à une électrophorèse bidimensionnelle, les protéines d'intérêts sont prélevées, placées dans des microtubes et subissent une digestion enzymatique par ajout d'une solution de trypsine (Promega). La digestion s'effectue durant 14 heures. A l'issue de cette période, 1µL de solution est recueillie, mélangée à 1µL de matrice 2,5 DHB (ACN/eau + 0,5% TFA; v/v; 50/50) puis déposée sur le support d'analyse en mélange intime. Pour des concentrations en protéines proches de une picomole, la concentration de la matrice est de 1M (1 mole/litre) soit 154 g/L. Pour des concentrations moindres à savoir 0,1 picomole, la solution de matrice est diluée dix fois afin que les pics de masses puissent avoir une intensité similaire au pic de la matrice (protocole d'échantillonnage MALDI-FT-ICR/MS fournit par la société Ionspec).

Nos dépôts d'échantillons liquides comme nos préparations cellulaires sont séchés à l'air ambiant. D'autre part, la matrice est déposée sur les cellules alors que celles-ci ne sont pas encore totalement déshydratées afin de faciliter la co-cristallisation.

1.1.5.5. Etalonnage des spectres de masse

Dans le cadre des études en solution, nous avons choisi l'utilisation de calibrants externes pour ne pas augmenter le nombres de pics de masses et afin de limiter les interactions entre les différents composés (nos analytes, la matrice et le calibrant) lors de nos acquisitions de spectres. Comme calibrant externe nous avons retenu le polymère PEG 600 de la famille des

Etalonnage des spectres mesurés lors des études d'extraits cellulaires digérés.

En parallèle à nos études de cellules cancéreuses HT29 en monocouche, une approche en protéomique a été effectuée. Les échantillons considérés sont des protéines ayant subit une digestion à la trypsine. Dès que le "spot" d'intérêt est sélectionné, celui-ci est retiré du gel électrophorétique avant d'être plongé dans 7µl d'une solution de trypsine (20mg/ml) durant 14 heures. La trypsine permettant le clivage des protéines au niveau des lysines et des arginines. La trypsine (Promega Corporation, USA) utilisée est une trypsine bovine modifiée par une méthylation réductive afin de la rendre résistante à la digestion protéolytique (autolyse). Il est à noter que dans le cadre d'études de ce type, cette autolyse est mise à profit lorsque l'intensité des pics de masse le permet. En effet, la digestion conduit à des peptides spécifiques qui permettent d'effectuer une calibration interne sur une gamme de 500 à 5500 Da. Néanmoins lors de nos études, notre calibration a reposée sur un mélange de peptides pour la calibration externe ainsi que sur un peptide pour la calibration pseudo interne.

Afin de valider nos résultats en protéomique, les analyses se sont faites d'une part par MALDI-TOF-TOF/MS (LSMBO, Strasbourg) et d'autre part par MALDI-FT-ICR/MS. En ce qui concerne les analyses par temps de vol, le choix de la matrice s'est porté sur la CHCA alors que pour les analyses par ICR, la matrice utilisée est la 2,5DHB.

La solution de matrice CHCA a été préparée à partir d'une solution saturée ACN/H_2O (50/50, v/v). Suite à une sonication (20 min) afin d'accroître la solubilité du composé et d'une centrifugation (1 min à 10000 g), un volume de 100µL est prélevé puis ajouter à 150 µL d'ACN/H_2O (50/50, v/v).

Quant à la solution de 2,5 DHB, elle est obtenue en solubilisant 150mg dans 1mL ACN/H_2O (60/40, v/v). L'eau ultrapure utilisée dans ce cas est acidifiée avec du TFA à hauteur de 0,5%.

Dans les deux cas de figure, le dépôt en couche mince s'effectue avec 1µL de matrice et 1µL d'analyte. Il est à rappeler que la solution d'analyte correspond soit à la solution de trypsine initiale ajoutée au spot afin de permettre une digestion enzymatique (T = 14 heures) (cf. protocole de trypsination), soit à une solution extraction (ACN/H_2O, 60/40, v/v, t = 60min), cette dernière étant utilisé lorsque le volume nécessaire n'est pas suffisant par cause d'évaporation. La calibration s'est faite en mode externe dans le cas des analyses par MALDI-TOF-TOF/MS en utilisant le Kit calibrants n°206195 de la société Bruker et en mode pseudo-interne pour les analyses MALDI-FT-ICR/MS en utilisant la protéine P14R à m/z 1533,8582)

1.1.5.6. Conclusion

Pour conclure, la technique MALDI est une technique polyvalente qui permet d'accéder à une largue gamme d'analyses, de biomolécules, de médicaments, de polymères voire à des nanoparticules pouvant être détectées et identifiées. Parmi les grandes applications du MALDI, l'analyse des protéines est sans aucun doute le premier domaine à évoquer, avec les nombreuses possibilités notamment dans le cadre du séquençage. L'analyse de modifications post-traductionnelles, les analyses de protéomes et l'étude de complexes non-covalents (interactions protéine/protéine, protéine/acides nucléiques, protéine/médicaments) sont d'autres domaines où le MALDI est également utilisé.

La technique MALDI possède de nombreux atouts. En effet, elle peut être appliquée à une large gamme de masse allant de quelques Da à plusieurs centaines de KDa, avec une bonne précision de mesure de masse (0,1 à 0,01 %), lorsqu'il est couplé à un spectromètre à temps de vol. L'échantillonnage (après optimisation) permet une grande rapidité d'analyse. Enfin, l'analyse par MALDI présente une tolérance relative vis-à-vis des sels ou d'autres additifs lors d'analyses de molécules d'intérêt biologique, bien qu'il soit préférable d'effectuer un dessalage. Sa sensibilité élevée rend l'utilisation de cette technique adéquat pour les études biologistes : la quantité de produit à analyser sur le porte-échantillon est de l'ordre de la picomole sans purification exhaustive.
De plus, cette technique produit peu de fragments, on observe dans la plupart des cas la désorption de molécules intactes en mode positif du type : $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ ou $[M+K]^+$.

1.2. La source d'ionisation par électronébulisation (électrospray, ESI)

1.2.1. Le principe

Les sources de type électrospray permettent la production d'ions en phase gazeuse à partir d'un échantillon en solution. L'avantage de ce type de source est qu'on puisse travailler à partir d'un échantillon en solution. En effet la majeure partie des réactions chimiques et biologiques se déroulant en phase liquide, l'analyse de ces réactions peut se faire de façon simple. Un second point important est que ce type de source peut être aisément couplé avec des techniques séparatives telles que la chromatographie liquide ou électrophorèse capillaire.

Dans le mode d'ionisation électrospray, l'échantillon est solubilisé dans un solvant organique (tel que l'éthanol ou le méthanol) à pH acide (ou basique) et amené par un capillaire dans la source à pression atmosphérique. L'extrémité du capillaire étant portée à un haut potentiel (≈ 4000 V), il en résulte un champ électrostatique entre l'extrémité du capillaire et la contre-électrode : un spray est formé. Le processus d'électrospray peut être assisté d'un gaz nébuliseur tel que N_2. Les gouttelettes chargées sont ensuite désolvatées, puis séchées par un flux d'azote chauffé circulant à contre courant. Ceci entraîne une série de fission de la goutte et des ions multichargés en phase gazeuse sont finalement produits (Figure II.6.)[33].

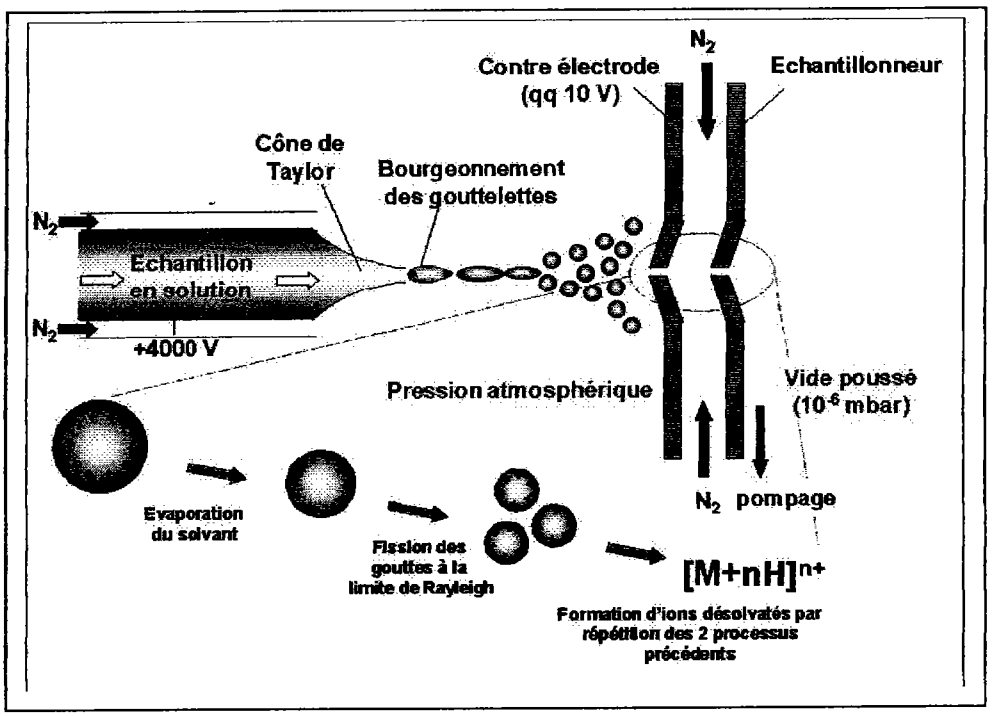


Figure II. 6. Représentation schématique d'une source électrospray. La haute tension fait migrer les charges à l'extrémité du capillaire. Des gouttelettes chargées sont créées. Suite à leur désolvatation, elles subissent des explosions coulombiennes, se transforment en micro - gouttelettes puis en nanogouttelettes et enfin en ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite transférés vers l'analyseur.

[33] (31) Kebarle P.; Tang L. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*.

1.2.2. La formation des ions dans le nuage gazeux

1.2.2.1. La formation du spray.

La naissance du spray est liée à l'application d'une différence de potentiel entre l'extrémité du capillaire et de la contre-électrode. Cette variation est généralement de 2 à 6kV, selon le type de l'échantillon. Le champ électrostatique qui en résulte induit la migration des ions. Si le capillaire est considéré comme étant la cathode, les ions positifs vont migrer vers l'extrémité du capillaire. Les forces de répulsion des charges vont alors augmenter et dépasser la tension de surface du solvant. Il y a formation d'un ménisque qui va s'étendre en suivant la ligne des champs électriques, appelé cône de Taylor (Figure II.7.). Lorsque le champ électrique à l'extrémité de ce cône sera assez important, des fines gouttelettes seront émises. La source électrospray peut être apparentée à une cellule électrolytique dans laquelle se passe une réaction d'oxydoréduction entre le capillaire et le solvant. Ce mode de création de gouttelette est appelé « mécanisme électrophorétique ».

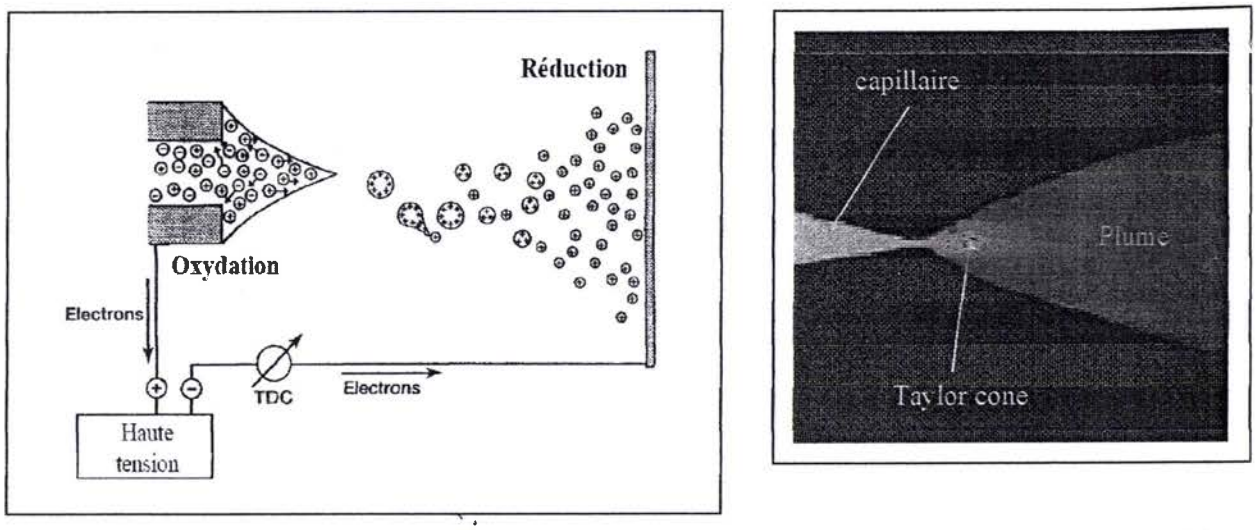


Figure II. 7. Schéma et image du spray: La source est assimilée à une cellule électrolytique[34]

1.2.2.2. La fission des gouttelettes

Les gouttelettes du spray sont progressivement évaporées avec l'aide du gaz rideau d'azote à contre-courant et de la température à l'interface. Les charges se concentrent alors dans la goutte dont le rayon diminue. Les forces de répulsion coulombiennes augmentent jusqu'à

[34] (32) J. B. Fenn; M. Mann; C. K. Meng; S. F. Wong; Whitehouse, C. M. *Mass Spectrometry Reviews* **1988**, *9*, 37 - 70.

devenirs supérieures aux forces de cohésion de la goutte. On atteint alors la limite de Rayleigh (la limite pour laquelle les répulsions électrostatiques des charges l'emportent sur la tension superficielle qui garantissait la cohésion de la goutte) et une fission coulombienne a lieu, permettant d'aboutir à des microgouttelettes, voir des nanogouttelettes.

1.2.2.3. La formation des ions en phase gazeuse

Lorsque la goutte atteint un diamètre de 10 nm environ, on ne connaît pas les phénomènes exacts qui conduisent à la formation de l'ion en phase gazeuse. Plusieurs modèles ont été proposés, les deux principaux sont le modèle de Dole d'une part et le modèle d'Iribarne et Thomson d'autre part.

1.2.2.3.1. Le modèle de Dole (1968).

Pour ce modèle, il est estimé que le processus de division par fission coulombienne est relativement poussé. Dans le cas d'une solution suffisamment diluée, on finit par obtenir une goutte qui ne contient qu'une seule molécule avec une ou plusieurs charges. Cette molécule passe alors en phase gazeuse après évaporation du solvant[35]. C'est le modèle de la goutte sèche. (Figure II.8.)

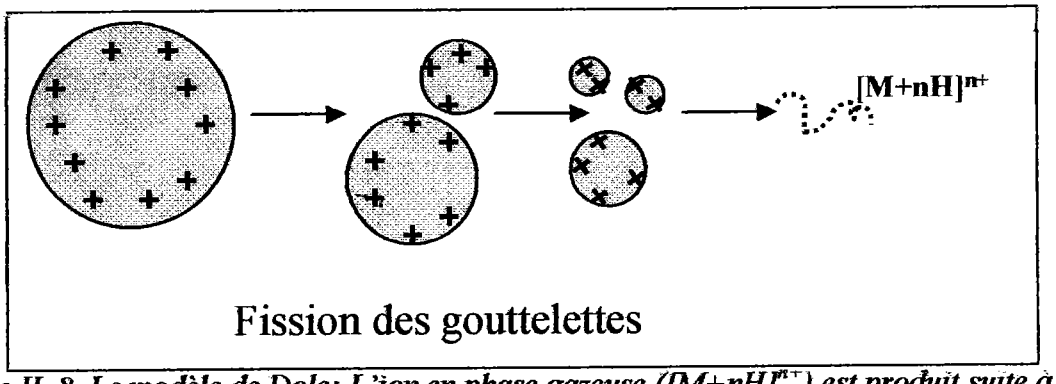


Figure II. 8. Le modèle de Dole: L'ion en phase gazeuse ($[M+nH]^{n+}$) est produit suite à une ultime fission coulombienne.

Ce modèle laisse supposer que i) les ions doivent toujours être produits quelque soit leur structure, ii) un même effet doit être observé par variation du débit de la solution, iii) la

[35] (33) Dole M.; Mack L. L.; Hines R. L.; Mobley R. C.; Ferguson L. D.; Alice M. B. *Journal of Chemical Physics* **1968**, *49*.

distribution des ions et la moyenne des états de charge doivent dépendre de la concentration du substrat de la solution. Hors, ces prédictions ne sont pas cohérentes avec les résultats expérimentaux.

1.2.2.3.2. Le modèle d'Iribarne et Thomson (1976)

Les auteurs de ce modèle ne raisonnent pas selon un éclatement de la gouttelette mais pour une évaporation ionique qui conduirait à un ion extrait par désorption de champ (Iribarne et Thomson, 1976), (Figure II.9.) lorsque la valeur du champ électrique présent dans les gouttelettes multichargées atteint la valeur de 10^9 V/m².

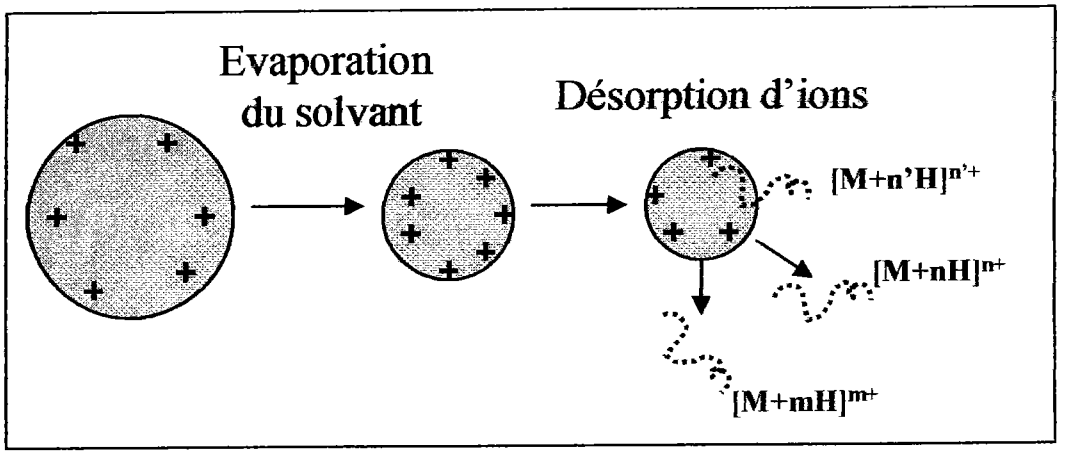


Figure II. 9. Modèle d'Iribarne et Thomson: Le champ électrique à la surface de la goutte est si intense que l'ion est extrait par désorption de champ.

Pour atteindre un champ en surface suffisamment élevé, on admet que l'évaporation du solvant à partir des gouttelettes se produit et augmente la densité de charge pour atteindre la limite de Rayleigh (Pulsions coulombiennes comparables aux forces de tension superficielles) conduisant à de multiples explosions de coulomb.

D'après l'équation de Rayleigh[36], la condition pour laquelle la charge Q de la gouttelette dépasse juste la tension de surface γ du solvant est donnée par :

$$Q^2 = 64.\pi^2.\varepsilon_0.\gamma.R^3$$

[36] (34) Lord Rayleigh *Phil. Mag.* **1882**, *14*, 184-186.

R : rayon critique de Rayleigh [m]

Q : charge de la gouttelette

ϵ_0 : permittivité du vide

γ : tension de surface du solvant [N/m²]

La gouttelette devient ensuite instable et produit de plus petites gouttelettes par fission coulombienne qui contiennent environ 2% de la masse et 15% de la charge de la gouttelette initiale[37]. Ce processus, répété plusieurs fois, aboutit à la formation d'un ion complètement désolvaté.

Il n'est pas possible de conclure sur un mécanisme précis quant à la création de l'ion en phase gazeuse, chaque modèle possédant ses limites. Le modèle de Dole est compliqué à appliquer à des solutions très concentrées, quant au modèle d'Iribarne et Thomson, il est difficilement concevable pour des macromolécules biologiques pour des raisons cinétiques et thermodynamiques.

1.2.2.3.3. Le modèle de Fenn (1988)

C'est un compromis tenant compte des modèles précédents, la formation d'ions en phase gazeuse à partir de gouttelettes liquides chargées passe par plusieurs étapes :
- une succession d'explosions coulombiennes provoquent une diminution de la taille des gouttelettes,
- en deçà de la limite de Rayleigh, la valeur du champ électrique est tel qu'il y a éjection de nanogouttelettes ou de molécules chargées parfois encore partiellement solvatées.

1.2.2.4. Le calcul de la masse

L'ionisation de type électrospray est caractérisée par la formation d'ions multichargés de type $[M+nH]^{n+}$ avec M la masse moléculaire de l'analyte et n le nombre de charge. En mode positif, les charges sont apportées par des protons H^+ ou par des cations Na^+, K^+, $NH4^+$, le

[37] (35) J.B. Fenn *J. of the Am. Soc. for Mass Spectr.* **1993**, *4*, 524-535.

plus souvent issus du solvant. Dans le cas de l'analyse des peptides, on considère que les charges positives sont issues de la protonation du groupement NH_2 terminal et des résidus basiques (lysine, arginine et histidine) ou de la neutralisation des charges négatives. Les charges négatives dans le cas des analyses en mode négatif sont liées à la déprotonation des résidus acides (acide aspartique, acide glutamique) et du groupement COOH terminal ou à des contre-ions[38].

Le spectre de masse d'une protéine correspond aux intensités relatives des ions multichargés en fonction de leur rapport m/z. Cette répartition statistique de tous les états de charge de l'échantillon a généralement l'allure d'une courbe de Gauss (Figure II.10.).

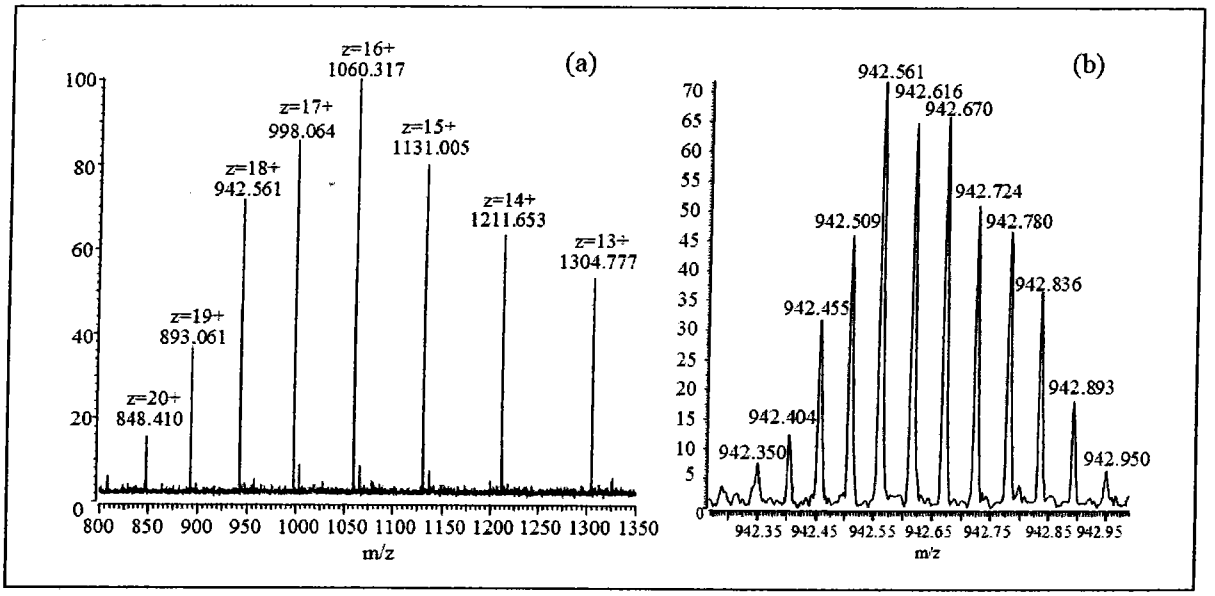


Figure II. 10. Spectre de masse ESI-FT-ICR/MS de la myoglobine. (a) Chaque pic sur le spectre de masse représente un état de charge de la molécule, (b) Distribution isotopique de l'état de charge +18 de la myoglobine.

La masse moléculaire est calculée à partir de deux états de charges consécutifs grâce à la résolution d'un système d'équations suivant :

38 (36) Loo JA; Udseth HR; Smith RD *Rapid Commun Mass Spectrom.* **1988**, *2*, 207-210.

$$\begin{cases} m_1 = \dfrac{M + Z_1.m_H}{Z_1} \\ m_2 = \dfrac{M + Z_2.m_H}{Z_2} \\ Z_2 = Z_1 - 1 \end{cases}$$

Avec :

- m_1 et m_2 les valeurs de m/z de deux pics consécutifs (avec $m_1 < m_2$),
- M la masse moléculaire de l'analyte,
- Z_1 et Z_2 étant l'état de charge du pic m_1 et du pic m_2.
- m_H la masse du proton soit 1,00783 g/mol

La résolution du système d'équation nous permet d'aboutir à l'expression de l'état de charge Z_1 et de la masse moléculaire M du composé analysé.

$$Z_1 = \frac{m_2 - m_H}{(m_2 - m_1)}$$

$$M = \frac{(m_2 - m_H).(m_1 - m_H)}{(m_2 - m_1)}$$

Pour déterminer la masse de la myoglobine, nous avons considéré le massif monoisotopique à 942,350 Da (m_1) avec Z_{1exp} = 18 et le massif monoisotopique à 997,726 Da (m_2) relatif à Z_{2exp} = 17. Ainsi, nous avons obtenu une charge $Z_{1calculée}$ correspondant à 17,999 et une masse moléculaire M égale à 16939,185 Da.

Il est à noter que le système d'équations n'est valable que dans le cas où la charge est apportée par un proton. Des logiciels de déconvolution permettent de réaliser ce calcul et d'obtenir ainsi un spectre déconvolué (ou spectre reconstruit) de la protéine qui représentera cette fois l'intensité en fonction de la masse moléculaire et non plus en fonction du rapport m/z.

1.2.3. Spécificité de notre source électrospray

L'introduction de la solution à analyser se fait via un capillaire de diamètre interne de 10µm permettant des débits s'échelonnant de 20 µL/min à 1 µL/min. La génération d'ions positifs se fait en application d'une tension +4 kV entre l'extrémité du capillaire et le cône d'échantillonnage du spectromètre. Ainsi à la sortie du capillaire, l'échantillon sous forme liquide passe sous forme gazeuse par action du champ électrique appliqué entre le capillaire et le cône d'échantillonnage et par la faible pression régnant dans la première zone (10^5 Pa). L'évaporation du solvant est accentuée par introduction d'un flux d'azote. Sous l'action du champ électrique, les ions ainsi formés sont alors entraînés vers l'orifice du cône d'échantillonnage (orthogonal au capillaire d'introduction) pour pénétrer dans une seconde zone sous une pression de 300 Pa. Enfin un cône d'extraction permet d'injecter les ions dans un système de transfert composé d'hexapôles et d'un quadripôle (10^{-2} Pa) permettant d'acheminer les espèces dans la cellule FT-ICR[39]. Le spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions FT-ICR/MS est équipé d'une source Zspray^{TM} : les ions sont injectés dans l'analyseur en suivant une trajectoire en Z. Ce type de source présente l'avant age d'être robuste et relativement tolérant vis-à-vis des sels et des molécules peu volatiles (Figure II.11.).

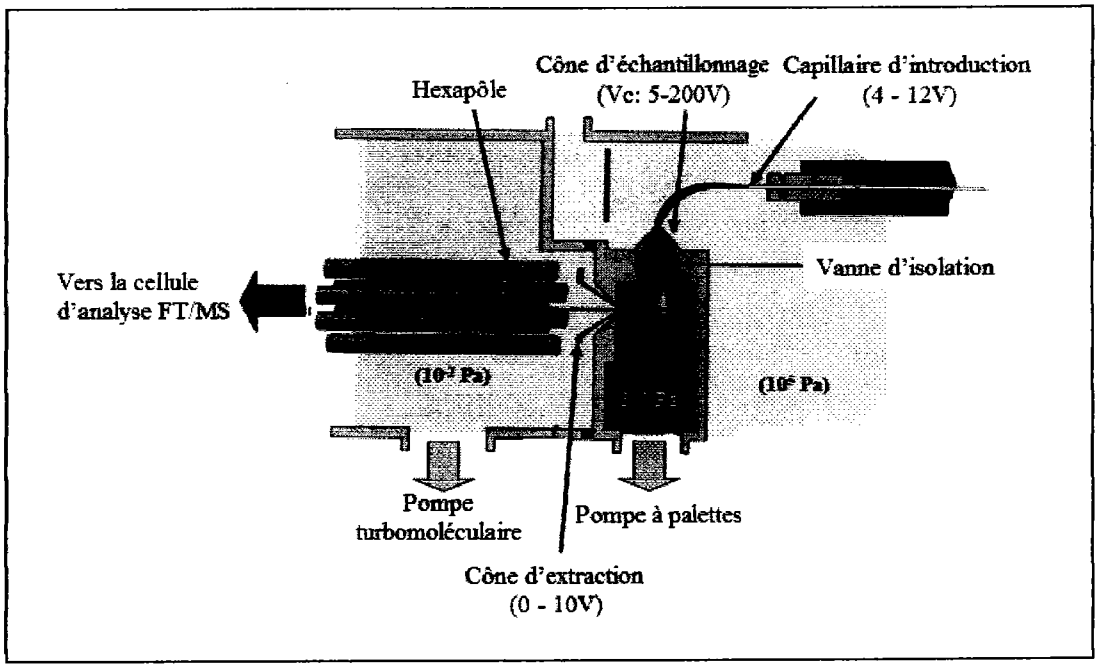


Figure II. 11. Schéma de la source d'ionisation électrospray dans la configuration de Zspray^{TM}.

[39] (37) Irina Manisali, D. D. Y. C., and Bradley B. Schneider *Trends in Analytical Chemistry* **2006**, *25*, 243-256.

De plus, elle permet une augmentation de la sensibilité et une meilleure transmission des ions d'intérêts au niveau de l'analyseur augmentant par la même, la quantité d'informations disponible amenée par l'application du mode de fragmentation tel que l'ECD, l'IRMPD et /ou le SORI. De même l'ouverture de la source électrospray est rapide et facile et un système de vannes permet un nettoyage de la source sans avoir recours à un arrêt total des pompes.

L'avantage de ce dispositif est qu'il possède deux zones d'échantillonnage perpendiculaires (Figure II.10.). La technique d'échantillonnage double Z cherche à éviter les facteurs limitants et à améliorer le rapport signal/bruit. Pour ce faire, dans la première zone à pression atmosphérique, l'échantillon est dirigé perpendiculairement au cône d'échantillonnage. Au niveau de ce cône, seuls les ions sont extraits perpendiculairement de l'aérosol, conduisant à l'élimination des gouttes les plus importantes et de particules neutres nuisibles à la sensibilité de la technique. Le transfert des ions s'effectue vers un second compartiment où règne un vide plus poussé (10^{-2} Pa), facilitant le transport des ions vers la cellule de détection via le cône d'extraction et le guide d'ions (hexapôle et octopôle).

Cette technique d'ionisation dispose de nombreux avantages, à savoir :
- elle est fortement adaptée à couplage ave une chromatographie liquide,
- elle permet l'utilisation de faibles énergies d'ionisation,
- elle permet l'étude d'interactions non covalentes,
- c'est une technique très sensible,
- elle autorise l'observation de molécules intactes,
- les ions multichargés d'analytes de haute masse (> 40 kDa) sont détectables.

Néanmoins il existe également des désavantages, notamment :
- il peut y avoir des suppressions de signaux induits par la présence de sels,
- la réponse et/ou la quantification de l'analyte peuvent être affectées par la présence d'autres espèces.

2. Les spectromètres de masse utilisés lors de nos études.

Les instruments utilisés lors de nos études sont de deux types, à temps de vol (TOF) pour l'un et à résonance cyclotronique des ions (ICR) pour le second. Cette partie que nous allons aborder à présent va permettre d'introduire les deux techniques ainsi que de détailler leurs spécificités.

2.1. Le spectromètre de masse à temps de vol (Time of Flight : TOF)

C'est au milieu des années 50 que A.E. Cameron énonce le principe de l'analyse par mesure de temps de vol des ions (TOF)[40] avec le premier temps de vol "ion velocitron". Ceci arrive après l'invention du premier spectromètre de masse à aimant (secteur magnétique)[41] et celui à double focalisation (analyseur électrostatique et magnétique) construit par J. Mattauch et R. Herzog en 1934.

Quel que soit le spectromètre utilisé, un vide poussé ($P < 10^{-5}$ Pa) est indispensable car toute collision entraînerait une déviation de la trajectoire des ions, et provoquerait leur perte de charge sur la paroi de l'appareil. D'après la théorie cinétique des gaz, le libre parcours moyen (L) est donné en fonction de **n**, est le nombre de molécules par cm^3, et σ le diamètre de collisions en centimètre, c'est-à-dire la somme des rayons des molécules qui entrent en collision.

$$L = \frac{V}{n} \frac{1}{\pi\sqrt{2}\sigma^2}$$

où $n = p/k_B T$

V : est le volume occupé par le gaz [m^3] ;

n : est la quantité de matière [mole],

p : est la pression en [Pascal],

T : la température en [Kelvin],

k_B : constante de Boltzmann = R/N_A = $1{,}380662.10^{-23}$ $J.K^{-1}$

R : Constante des gaz parfaits = 8.31441 $J.K^{-1}.mol^{-1}$

N_A : Constante d'Avogadro = $6, 02045.10^{23}$ mol^{-1}

---

40 (38) A. E.Cameron; D. F. Eggers *Rev. Scie. Instrum.* **1948**, *19*, 605.

41 (39) Dempster A. *J. Phys. Rev.* **1918**, *11*, 316.

Avec n/V correspondant à la densité de particules.

Comme $pV = nk_BT$ alors $\frac{V}{n} = \frac{k_BT}{p}$

D'où, $L = \frac{1}{P}\frac{k_BT}{\pi\sqrt{2}n\sigma^2}$

En pratique, on peut estimer le libre parcours moyen d'un ion dans les conditions rencontrées dans un spectromètre de masse ($\sigma = 3{,}8.10^{-10}$ m, $T \approx 300$ K) par l'équation dans laquelle la pression **P** est exprimée en Pascal, et **L** en cm :

$$L = \frac{0{,}66}{P}$$

Dans un spectromètre, le libre parcours doit être au minimum de l'ordre du mètre, ce qui correspond à une pression maximale $P = 0{,}66.10^{-2}$ Pa. Dans des appareils utilisant de hautes tensions dans la source, cette pression doit encore être réduite pour éviter les décharges. Dans le cas de notre instrument, le système de pompage (pompe primaire) permet d'obtenir des pressions de l'ordre de $4{,}5.10^{-5}$ Pa au niveau de la source et de 10^{-5} Pa dans l'analyseur.

Durant nos travaux, le spectromètre de masse à temps de vol est couplé à la technique MALDI. Au cours des paragraphes qui suivent, nous reviendrons tout d'abord sur les principes de base de l'analyseur à temps de vol linéaire et nous discuterons des améliorations instrumentales qui ont été apportées à notre instrument. Nous terminerons sur les caractéristiques spécifiques de la technique MALDI-TOF/MS et MALDI-TOF-TOF/MS.

2.1.1. Principe de l'analyseur à temps de vol (TOF)

Le principe de cet analyseur repose sur la mesure du temps de vol des ions entre la source d'ionisation et le détecteur à travers un tube appelé « tube de vol ». La taille du tube, dans lequel ne règne aucun champ, varie d'une longueur de 0,25 m à 1,8 m en mode linéaire et 3,3 m en mode réflecteur. Les ions formés dans la source, et ceci quel que soit le type

- Calcul t_1, temps de vol dans l'espace d'accélération:

Dans l'espace d'accélération de longueur **d**, l'ion de charge **q**, de masse **m** est soumis au champ électrostatique uniforme $\vec{E}$. Ainsi, la force électrostatique $\vec{F}$ parallèle au champ d'extraction procure à l'ion une accélération $\vec{\gamma}$. Selon le principe fondamental de la thermodynamique, nous obtenons:

$$\Sigma\vec{F} = q.\vec{E} = m.\vec{\gamma} \text{ d'où } \vec{\gamma} = \frac{q}{m}.\vec{E}$$

(avec **m** en kg, **q** = **z.e** ; **z** :le nombre de charge et **e** la charge élémentaire = $1{,}602.10^{-19}$ C)

Par projection sur l'axe de la trajectoire de l'ion, nous pouvons déduire la vitesse **v** et la position **x** de l'ion en fonction du temps t_1, dans la zone d'accélération.

$$\text{Comme } \vec{\gamma} = \frac{q}{m}.\vec{E} \text{ alors } v(t_1) = \frac{dx}{dt_1} = \frac{q.E}{m}.t_1 + v_0 \text{ d'ou } x(t_1) = \frac{q.E}{m}.t_1^{\,2} + v_0.t_1 + x_0$$

Il est à noter que **E** est proportionnel à la différence de potentiel appliqué entre l'échantillon porté à un potentiel U_{acc} (en Volt) et la grille d'extraction (relié à la masse).

En posant v_o et x_o, vitesse et position de l'ion à $t_1 = 0$, $x(t_1) = d$ et $E = U_{acc}/d$, nous obtenons :

$$t_1 = \sqrt{\frac{2d^2m}{qU_{acc}}}. = 2d\sqrt{\frac{m}{2qU_{acc}}}$$

- Calcul t_2, temps de vol dans l'espace libre de champ:

Considérons à présent la seconde zone, la région libre de champ de longueur **L**. Le temps t_2 est calculé comme suit. A la sortie de l'espace d'accélération, l'ion possède un mouvement rectiligne uniforme ainsi **v** = constante:

$$t_2 = \frac{V}{L}$$

Selon le théorème de l'énergie cinétique:

$$E_c = \frac{1}{2}mv^2 = qU_{acc} \text{ d'ou } v = \sqrt{\frac{2qU_{acc}}{m}}$$

Par conséquent, le temps t_2 mis pour parcourir la région libre de champ L est égal à:

$$t_2 = L\sqrt{\frac{m}{2qU_{acc}}}$$

- Calcul du temps de vol global **t**:

En considérant que l'ion a une vitesse initiale nulle, son temps de vol total ou global **t** est proportionnel à $\sqrt{\frac{M}{q}}$ selon la formule :

$$t = (2d + L)\sqrt{\frac{m}{2qU_{acc}}} = (2d + L)\sqrt{\frac{m}{2zeU_{acc}}} = (2d + L)\sqrt{\frac{1}{2eU_{acc}}}\sqrt{\frac{m}{z}}$$

La mesure de t^2 permet le calcul du rapport masse sur charge (m/z), les autres termes étant constants. En principe le domaine de masse d'un instrument à temps de vol n'a pas de limite ce qui le rend spécialement adapté aux techniques d'ionisation douce telle que la technique MALDI.

2.1.2. Evolution de la technique TOF/MS

Lorsqu'un spectre dit « classique » est réalisé sur un spectromètre à temps de vol en mode linéaire, les ions détectés peuvent être de trois natures.

→ Si les ions sont formés sur la cible pendant ou juste après la désorption en un temps t et si t est très inférieure à t_1 (temps de vol dans l'espace d'accélération), c'est-à-dire compris entre 10^{-15} et 10^{-9}s, ils sont dits « stables ».

→ Si les ions sont formés dans l'espace d'accélération, entre 10^{-8} et 10^{-7}s, ils acquièrent une énergie cinétique inférieure à l'énergie normale et contribuent alors au bruit de fond du spectre puisqu'ils sont observés à des temps supérieurs à t.
→ Si les ions sont formés après la zone d'accélération en un temps supérieur à 10^{-7}s, il s'agit alors d'ions issus de la décomposition en région libre de champ d'ions dont la durée de vie est supérieure à t_l : ce sont les ions « métastables ». Ces ions fragments ont une vitesse égale à celle de l'ion parent modifiée d'une composante isotrope due à la fragmentation et induisent sur les spectres un élargissement du pic correspondant à l'ion parent.

Ainsi, les performances de l'analyseur à temps de vol (TOF) sont dépendantes de la dispersion initiale des ions qui influe sur la distribution temporelle et sur la distribution en énergie cinétique des ions de même masse. L'inhomogénéité de la nature des ions va entraîner plusieurs limitations des appareils à temps de vol. C'est pourquoi l'analyseur à temps de vol a été perfectionné notamment pour diminuer la dispersion en énergie cinétique des ions formés sur la cible à un temps t très inférieur à t_l (10^{-15}s et 10^{-9}s) grâce au délai d'extraction et au réflecteur électrostatique.

2.1.2.1. Le retard à l'extraction "Delay extraction"

La technique MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation) possède une restriction due à la distribution en énergie des ions formés, qui est causée par le processus d'ionisation. En effet, tous les ions ne sont pas désorbés et ionisés en même temps et à la même place. De plus, la densité dans le nuage gazeux formé suite à l'impact laser est importante et entraîne beaucoup de collisions entre les ions et les molécules de matrice. Il en résulte un ralentissement de la propagation et une dispersion des ions. Ceci entraînera une différence d'énergie cinétique pour les ions de même masse donnant lieu à une accélération différente et provoquant des temps de détection différents sur le détecteur. Les conséquences seront un élargissement des pics de masse. Pour palier à cet inconvénient, on a recourt à l'utilisation d'une extraction retardée (Figure II.13.).

L'utilisation de l'extraction retardée introduit un délai entre le pulse laser et l'application de la tension d'accélération. Celui-ci entraîne une baisse de la densité du nuage gazeux et donc une

diminution des probabilités de collisions entre espèces désorbées. Ainsi, l'utilisation de l'extraction retardée permet d'augmenter la résolution et la sensibilité du spectromètre de masse à temps de vol.

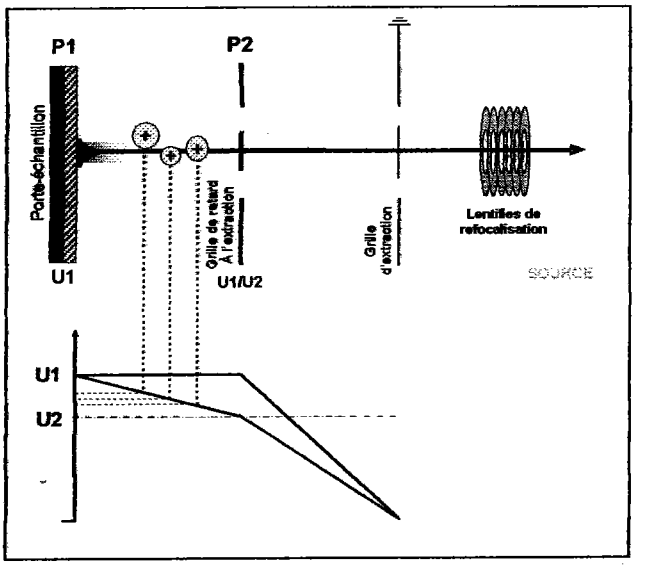


Figure II. 13. Evolution des potentiels du porte-échantillon et de la grille de retard à l'extraction dans le temps lors d'une expérience TOF/MS avec délai d'extraction.

L'application du délai d'extraction se fait au niveau du porte-échantillon (**P1**), sur la lentille (**P2**) et sur la grille d'extraction en trois étapes distinctes :

- P1 et P2 sont portés au même potentiel U1 (20 kV), la lentille d'extraction étant à la masse.
- Après le tir laser, les ions sont éjectés à environ 700 m/s entre P1 et P2.
- Après un temps t' (0,2, 0,4 et 0,6 µs sur notre appareil réglable selon la gamme de masse analysée), P2 est porté à un potentiel U2 équivalent à 17kV. Le gradient du champ électrique ainsi généré va permettre le transfert des ions de P1 à P2. Durant cette durée, les ions générés évoluent selon leur vitesse initiale. Lorsque les ions arrivent après P2, ils subissent une accélération due à la différence de potentiel entre P2 et la grille d'accélération (0V). L'amélioration apportée à la résolution par l'extraction retardée est remarquable.

2.1.2.2. Le miroir électrostatique (le réflectron)

Un autre dispositif permettant de compenser les effets d'une distribution en énergie cinétique des ions analysés consiste à placer un réflecteur, ou miroir électrostatique (réflectron) à la sortie du tube de vol. Le premier miroir électrostatique conçu est un réflectron à un étage avec un seul champ électrique[42]. Cependant, il subsiste des problèmes d'homogénéité de champs dans le réflecteur. Afin de palier à cet inconvénient, un réflecteur à deux étages a été développé. Ce réflectron est constitué d'une série d'électrodes annulaires équidistantes, plus deux électrodes placées à l'avant dont la séparation est plus importante (Figure II.14.). Le réflecteur électrostatique dont nous disposons au laboratoire est agencé de façon non coaxiale.

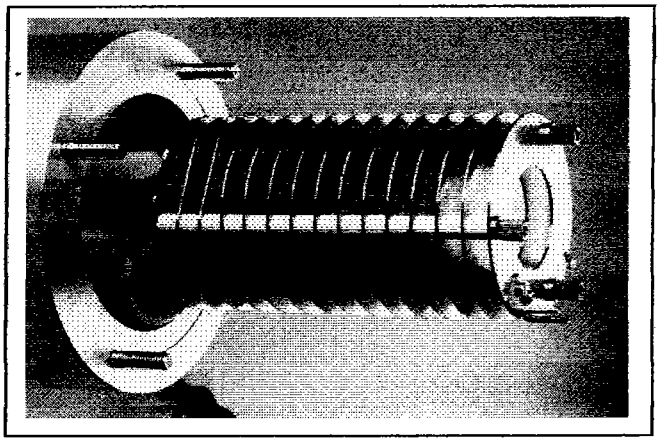


Figure II. 14. Photographie d'un réflecteur utilisé au sein d'un spectromètre de masse à temps de vol

La Figure II.15., schématise ce système qui permet de travailler en mode « deux grilles ou deux étages ». Il est en fait constitué de deux régions (terre-U_s et U_s-U_{Ref}) à l'intérieur desquelles sont créés deux champs uniformes d'intensités différentes. Dans ces conditions normales d'utilisation du miroir à deux étages, seuls les ions fragments d'énergie supérieure à U_S sont détectés avec une bonne résolution, les ions fragments d'énergie inférieure à U_S ne peuvent pénétrer dans le deuxième étage du miroir et forment un massif non résolu.

La première région a pour but de ralentir brutalement les ions qui pénètrent dans le réflectron sans modifier leur différence d'énergie. La tension appliquée à U_S doit correspondre à la tension maximale de fonctionnement. Une différence de potentiel plus faible entre U_S et $U_{Réf}$

[42] (40) Mamyrin B. A. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **1994**, *131*, 1-19.

annule la vitesse des ions et les renvoie dans le tube de vol. L'annulation a lieu à l'endroit où l'énergie cinétique de l'ion à l'entrée dans le miroir est égale à l'énergie potentielle linéairement croissante avec la profondeur du miroir. Les distances parcourues dans le miroir sont donc fonction de l'énergie cinétique des ions. Pour trois ions de masse identique **(1, 2 et 3)**, l'ion d'énergie plus élevée **(1)** (110% de l'énergie nominale par exemple) parcourt dans le miroir une distance plus grande que l'ion de faible énergie (90%) **(3)** de façon à ce que les trois ions sortent du réflectron et atteignent en même temps le détecteur.

Le temps de vol d'un ion m_i dans un spectromètre de masse à temps de vol équipé d'un réflectron est donné par :

$$t = (L_1 + L_2 + 4d + 2l)\left(\sqrt{\frac{m_1}{2qU_{acc}}}\right)$$

l : longueur du trajet des ions de la zone d'accélération,

L1, L2 : longueur des régions sans champ avant et après le réflectron,

d : distance moyenne de pénétration des ions dans le réflectron.

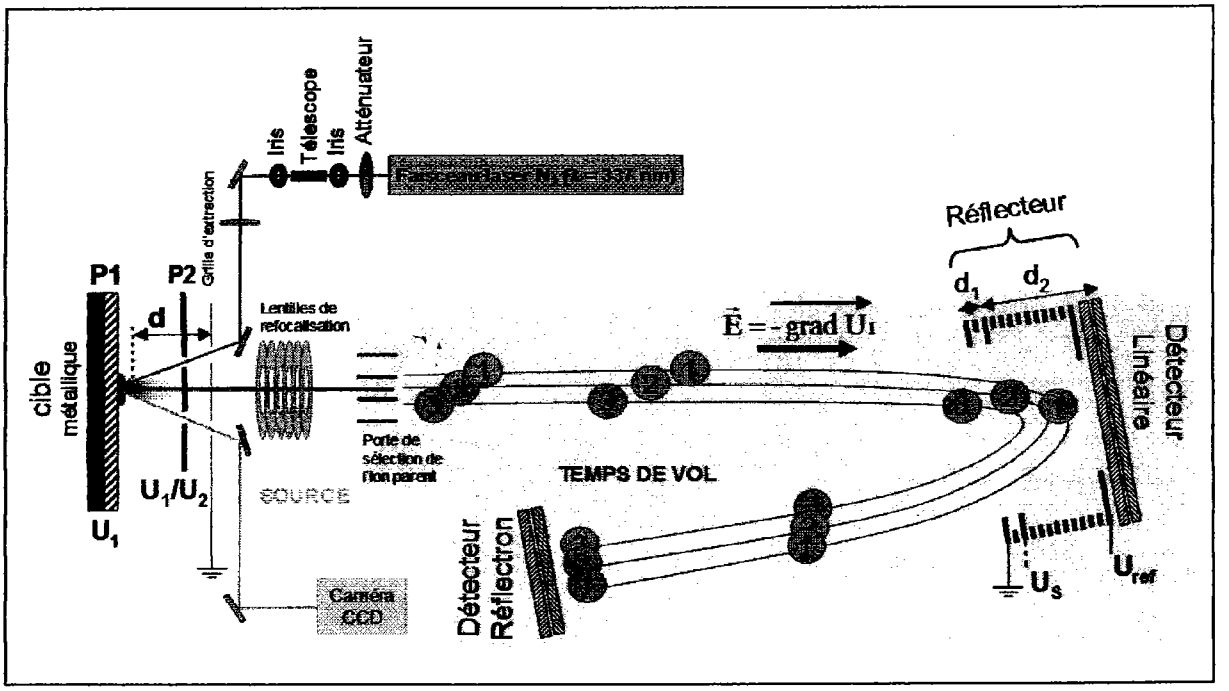


Figure II. 15. Schéma de disposition du réflecteur du spectromètre à temps de vol Bruker Reflex IV utilisé dans le cadre de nos études.

L'avantage du réflecteur à 2 grilles ou à 2 étages par rapport à un réflecteur à une grille réside essentiellement dans sa capacité à refocaliser la trajectoire des ions de même masse sur le détecteur, ce qui entraîne une augmentation de la résolution et la possibilité de réduire considérablement la taille du miroir électrostatique. De plus, le réflecteur à deux étages va avoir un impact sur les ions métastables. Les ions issus de décompositions métastables ont une énergie cinétique plus faible que celle de l'ion parent. Ainsi, ces fragments sont réfléchis dans le miroir à une profondeur inférieure à celle de l'ion parent. Ces ions fragments atteignent le détecteur en un temps inférieur à ce dernier, ce qui induit les formations de pics "parasites" relativement larges et difficilement interprétables sur les spectres de masse.

Néanmoins la fragmentation des ions peut apporter une information riche dans le cadre d'étude structurale de composés. La première étape conduisant à de ce type d'étude repose sur la sélection des ions d'intérêts, d'où la nécessité d'avoir développer des techniques qui permettent cette approche.

2.1.3. Technique d'analyse à partir d'un ion présélectionné

Les fragmentations se produisant au cours du vol des ions suite à leur accélération peuvent être porteuses d'informations qui peuvent s'avérer primordiales dans le cadre de l'analyse structurale. Le spectromètre de masse à temps de vol utilisé lors de nos expériences permet la mise en œuvre de fragmentations par le mode dénommé Fragmentation Analysis and Structural, également dénommé Post Source Decay (PSD) pour des ions de masse inférieure à 6000 Da. Les ions fragments formés en région libre de champs (tube de vol) possèdent une vitesse égale à celle de l'ion parent dont ils sont issus, mais leur énergie cinétique est bien évidemment différente (figure II.16.).

R. Kaufmann et coll.[43,44] ont mis en place le premier système PSD en modifiant un spectromètre à temps de vol équipé d'un réflectron à deux étages afin d'étudier le séquençage de peptides ionisés en utilisant la technique MALDI comme mode d'échantillonnage et d'ionisation.

---

[43] (41) Kaufmann R.; Spengler B.; Lützenkirchen F. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **1993**, *7*, 902-910.

[44] (42) Kaufmann R.; Kirsch D.; Spengler B. *Int. J. Mass Spectrom. and Ion Proc.* **1994**, *131*, 355-385.

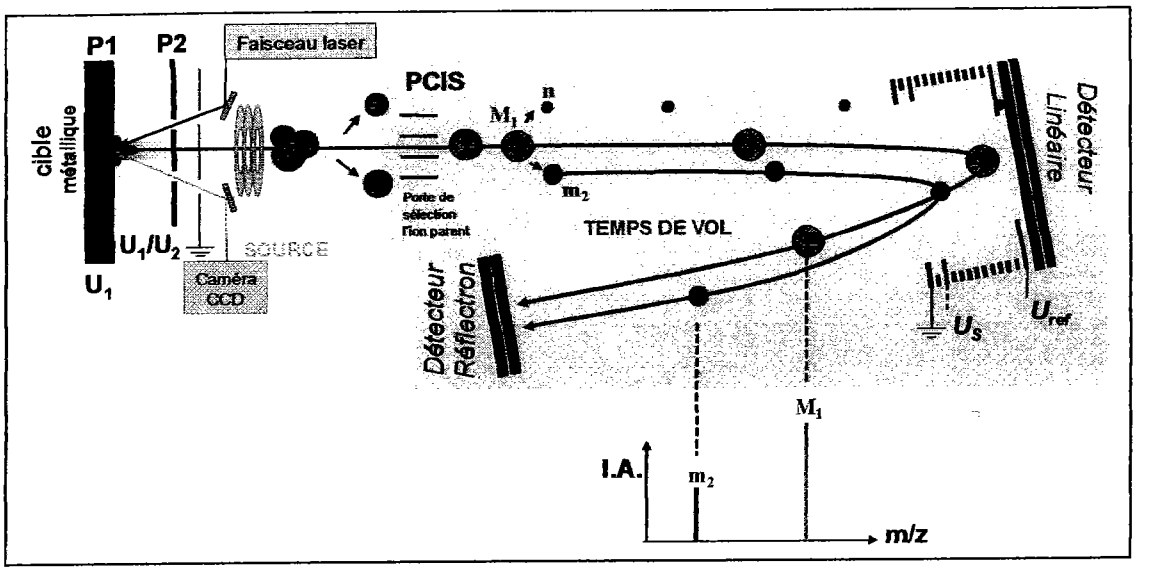


Figure II. 16. Schéma du trajet des ions en mode PSD

Une « barrière » à ion est placée en tête du tube de vol afin de ne laisser passer que l'ion parent souhaité ainsi que ses fragments métastables qui se déplacent en paquet d'ions à la même vitesse. Ainsi, la porte de sélection d'un ion ou "precursor ion selector" (PCIS) est utilisée comme un filtre de masse (la sélection s'effectue par simple calcul du temps de vol entre la sortie de l'espace d'accélération et la barrière à ion).

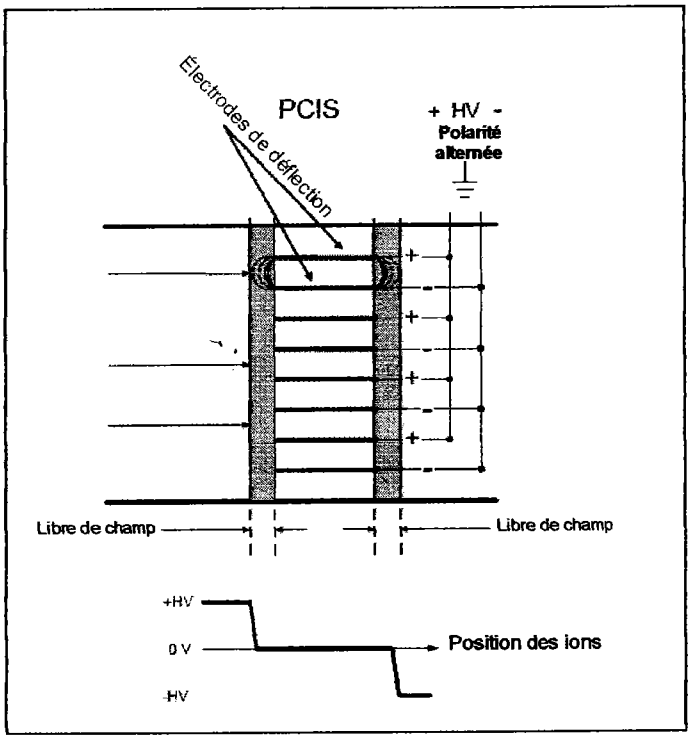


Figure II. 17. Schéma du PCIS, servant à la sélection des ions d'après le manuel UltraTOF Bruker.

Le PCIS (Figure II.17.) est un empilement de plaques de déflection sur lesquelles est appliquée une haute tension alternative. La différence de potentiel entre chaque électrode entraîne un champ électrostatique perpendiculaire au trajet des ions qui aura pour but de dévier tous les ions qui entrent dans ce champ. Lorsque l'ion sélectionné et ses fragments arrivent dans cette partie, les potentiels sont remis à zéro. Ainsi, le paquet d'ions n'est pas dévié et passe à travers le PCIS.

La qualité et l'efficacité du PCIS nécessitent un réglage fin de son temps d'ouverture via une calibration précise, qui repose sur la détection de molécules dont la masse est connue.

Sur cette courte distance la résolution est évidemment peu élevée ce qui entraîne une sélectivité en masse limitée, mais suffisante pour séparer par exemple un ion protoné ($M+H^+$), d'un ion sodique ($M+Na^+$).

Si un ion m_1 se fragmente dans la région en amont du réflectron pour donner un ion fragment m_2, le temps de vol de ce dernier est :

$$t_2 = (L_1 + L_2 + 4d(\frac{m_1}{m_2}) + 2l)(\sqrt{\frac{1}{2eU_{acc}}}\sqrt{\frac{m_1}{z}})$$

La mesure de t_1 et de t_2 permet aussi de déduire la masse de l'ion fragment m_2 formé à partir de l'ion parent m_1 préalablement sélectionné.

Afin d'obtenir un spectre complet d'ions fragments (PSD fragments ions) avec un miroir à deux étages, il faut réaliser de 10 à 14 segments de masse consécutifs en ajustant les tensions du réflectron aux énergies des ions fragments. Ainsi, un gradient de potentiel de plus en plus faible est créé de manière à dévier les ions métastables issus des ions sélectionnés vers le deuxième détecteur. Le spectre PSD est donc un spectre composite.

Pour déterminer la masse des ions fragments, il est nécessaire de connaître avec la plus grande précision les paramètres géométriques du spectromètre ainsi que les différentes tensions utilisées pour calibrer le spectre. Dans la pratique, un algorithme est intégré dans le programme du logiciel d'acquisition (XACQ ou Brukercontrol).

D'une grande utilité dans le domaine bio-organique, la technique MALDI-TOF-PSD est une méthode puissante pour déterminer, par exemple, la structure primaire de biopolymères[45]. Cependant, cette expérience de type MS/MS reste laborieuse et a laissé place à des techniques bien plus performantes parmi lesquelles figures la spectrométrie de masse en tandem TOF-TOF.

2.1.4. Spécificités et limitations du spectromètre de masse à temps de vol utilisé lors de nos recherches

L'appareil qui nous a servi à réaliser la plupart de nos travaux est un spectromètre de masse à temps de vol, Reflex IV commercialisé par Bruker avec une source SCOUT 384 puits. Le système utilise un laser à azote pulsé (impulsion 3ns) de longueur d'onde 337 nm (modèle VSL-337ND, Laser Science Inc.) avec une énergie en sortie de laser de 400 µJ par pulse laser. La puissance du laser est modulée par un filtre neutre à densité variable. Le faisceau laser est focalisé grâce à un télescope (jeu de deux lentilles de quartz divergentes et convergentes respectivement) et filtré spatialement par deux iris ($ø_{max}$ = 1cm). Le faisceau est dirigé sur la cible avec un angle d'incidence de 45° par un jeu de miroir.
Les ions sont accélérés sous des conditions de délai d'extraction (0,2 µs pour les analyses du photosensibilisateur et 0,4 µs pour les hautes masses). La plupart des expériences sont effectuées en mode de détection positif avec un voltage d'accélération de 20 kV et un réflecteur porté à une haute tension de 23 kV. L'appareil peut être utilisé dans deux modes de détection, le mode linéaire (trajet de 1,80 m) et le mode réflectron (trajet 3 m environ). Les ions générés arrivent sur le détecteur constitué d'une galette de microcanaux[46]. Chaque microcanal agit comme un multiplicateur d'électrons qui amplifie le signal pour être digitalisé par un oscilloscope Leroy (2 GHz, LSA 1014) (Figure II.18.). Chaque détecteur contient deux MCPs (Microchannel Plate) montés en série.

Ce détecteur est composé de millions de microcanaux dont le corps est en verre (ø = 5-10 µm, longueur = 0,5-0,8 mm). Leur surface interne est recouverte par une couche de semi-conductrice qui permet à tous ces microcanaux de se comporter comme des multiplicateurs

---

45 (43) Spengler B. J. *J. Mass Spectrom.* **1997**, *32*, 1019-1036.
46 (44) J. Ladislas Wizamicro *Nuclear Instruments and Methods* **1979**, *162*, 587 - 601.

d'électrons indépendants. Pour obtenir un rendement d'électrons maximum, tous les microcanaux sont électriquement montés en parallèle.

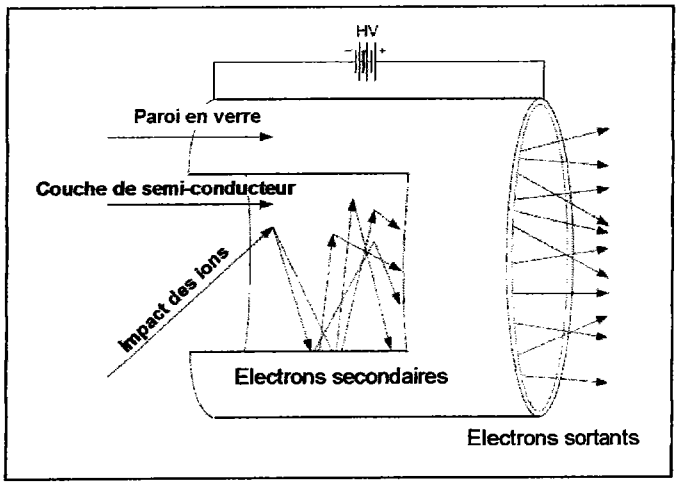


Figure II. 18. Principe du détecteur microcanaux UltraTOF Bruker.

Ces détecteurs sont aussi appelés micro Channel plate ou MCP, évoluent dans un environnement sous vide ($1{,}3.10^{-3}$ Pascal) et sont spécifiquement adaptés aux mesures d'un spectromètre à temps de vol notamment parce qu'ils permettent d'atteindre un gain global de 10^6 à10^8. Pour un ion à m/z 5 kDa accéléré à 20 kV, le temps de réponse est de 0,3 ns.

Lors d'une acquisition, les ions formés se heurtent à la couche semi-conductrice et provoquent l'émission d'électrons secondaires. Ces derniers sont accélérés et leurs impacts provoquent une nouvelle émission électronique et ainsi de suite. Le processus d'amplification continue ainsi jusqu'à la production d'un courant exploitable. Pour finir, le signal est détecté et converti en un signal électrique enregistrable, de façon à obtenir un spectre de masse qui est la représentation graphique des abondances relatives des divers ions et fragments "ioniques".

2.1.4.1. Avantages et inconvénients du MALDI-TOF/MS

Les avantages de ce spectromètre de masse reposent d'une part sur son mode d'ionisation et d'autre part sur l'analyseur. En effet, il est possible d'ioniser des molécules de hautes masses moléculaires de même ; les ions générés sont principalement des ions monochargés qui permettent d'aboutir à un spectre de masse simple à analyser. De plus s'agissant d'une

méthode d'ionisation douce : la fragmentation des ions moléculaires est faible. Nous pouvons également noter que la technique est tolérante vis-à-vis des sels, qui permettent même à favoriser le signal en fournissant des sodiums et des potassiums dans le cadre de la formation d'analytes cationisés. Cette technique est également à même d'étudier des échantillons de faible concentration de l'ordre de la picomole ou de la femtomole et cela sur une large gamme de masse, sachant que cette dernière est théoriquement illimitée.

Malgré ces points positifs, la technique MALDI-TOF/MS est néanmoins soumise à certaines contraintes à savoir la formation d'adduits et d'ions de matrice limitant les analyses pour les faibles masses. De plus les analyses effectuées ne sont pas quantitatives, l'étude d'une solution deux fois plus concentrée ne conduisant pas à l'obtention d'un signal deux fois plus important. La dernière limitation étant liée à l'affinité protonique de nos analytes, selon ce paramètre il est plus ou moins facile de détecter une espèce, cela se traduisant par des suppressions de signal dans le cadre de mélange.

2.2. Le spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions (FT-ICR)

2.2.1. Historique

En 1929 aux États-Unis fut découvert par Ernest O. Lawrence (prix Nobel en 1939) le principe du cyclotron[47]. Puis en 1949, l'équipe de J.A. Hipple détermina la fréquence de résonance cyclotronique du proton grâce au spectromètre de masse Omégatron. En 1974 Comisarow et Marshall[48] ont associé le traitement par transformée de Fourier à la technique de résonance cyclotronique des ions (ICR-MS) et l'année 1985 marque l'utilisation pour la première fois d'un aimant supraconducteur pour créer le champ magnétique nécessaire à l'étude.

Actuellement la puissance du champ magnétique des appareils sur le marché est comprise entre 3 et 15 Tesla. Depuis l'année 2000, on observe une hausse constante de 25 à 30% par an du nombre d'équipements de type FTICR dans le monde.

La spectrométrie de masse FT-ICR combine l'analyse simultanée en mode haute résolution et haute précision en masse (inférieur au ppm) des ions produits au cours de l'étape d'ionisation.

---

47 (45) Lawrence, E. O. *Nobel lecture* **1951**.

48 (46) Comisarow M. B.; Marshall A. G. *Chem. Phys. Lett.* **1974**, *25*, 282-283.

C'est un outil de premier choix pour l'analyse structurale de biomolécules[49], de produits naturels dans des milieux complexes, ainsi qu'à l'étude de composés de coordination, comme les complexes métalliques[50].

2.2.2. Principe du spectromètre à résonance cyclotronique des ions

Une première approche va consister à mettre en évidence les forces et les lois que subit une particule chargée, de vitesse V et se déplaçant dans un champ magnétique uniforme.
Dans ce cas précis elle subit la force de Lorentz (Eq. 1) et la force centrifuge (Eq. 2). Ces forces ne dépendent que de la composante du vecteur vitesse orthogonale au champ magnétique. Si on définit l'axe *z* parallèle au champ magnétique et *Vxy* la projection du vecteur vitesse dans le plan *xy*, on obtient et ce quelle que soit la vitesse, une force résultante dans le plan *xy* et perpendiculaire à *Vxy*. Ces deux forces agissent simultanément et en sens opposé (Eq. 3).En se restreignant à la projection dans le plan *xy* et en considérant uniquement l'action du champ magnétique, la résolution des équations du mouvement met en évidence que la trajectoire de la charge est circulaire, autour d'un axe parallèle à *z* (Figure II.19.).

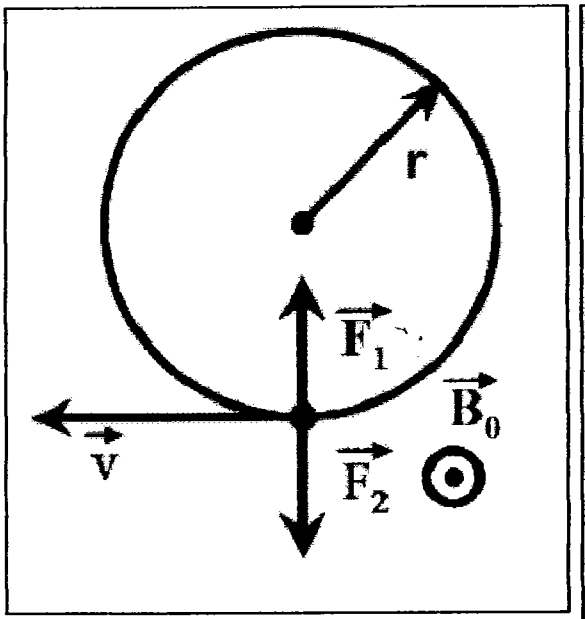


Figure II. 19. Principe du mouvement cyclotronique

$$\vec{F}_1 = q\vec{v} \wedge \vec{B}_o \qquad \text{(Eq. 1)}$$

$$\vec{F}_2 = \frac{m\vec{v}^2}{r} \qquad \text{(Eq. 2)}$$

$$F_1 = F_2 \qquad \text{(Eq. 3)}$$

nous obtenons: $qvB_o = \frac{mv^2}{r}$

ainsi $\frac{v}{r} = \frac{qB_o}{m} = \omega_c$ (Eq. 4)

comme $q = ze$ alors $\omega_c = \frac{eB_o}{(m/z)}$

d'ou $\upsilon_c = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{eB_0}{2\pi \times m/z}$ (Eq. 5)

[49] (47) Page J. S.; Masselon C. D.; Smith R. D. *Current Opi. Biotech.* **2004**, *15*, 3-11.
[50] (48) Le Caer S.; Heninger M.; Lemaire J.; Boissel P.; Maitre P.; Mestdagh H. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *385*, 273-279.

Il apparaît que la vitesse angulaire ω_c de rotation autour de cet axe est indépendante de la vitesse initiale (Eq. 4 et 5). Le moment de rotation mis en évidence est nommé mouvement cyclotronique et sa fréquence υ_c ne dépend que du champ magnétique B_0 et du rapport masse sur charge m/z (unité : Thomson, 1 u.m.a. = 1,6605402. 10^{-27} kg).

Le tableau II.1. ci-dessous indique la fréquence cyclotronique de quatre ions de rapport m/z 200, 500, 1000 et 2000 Th pour un champ magnétique B_0 de 9,4 Tesla utilisé lors de nos expériences.

$B_{0\ (Tesla)}$	$m/z_{\ (Th.)}$	$\upsilon_{c\ (kHz)}$
9.4	200	722
9.4	500	289
9.4	1000	144
9.4	2000	72

Tableau II. 1. Exemple de fréquences cyclotroniques ν_c de quatre ions sous à un champ magnétique de 9,4 Tesla

Bien que la fréquence soit indépendante de la vitesse initiale, le rayon de la trajectoire circulaire quant à lui y est relié et peut être calculé selon l'équation :

$$\frac{v}{r} = \frac{qB_0}{m} = \omega_c$$

Jusqu'ici seul le mouvement dans le plan *xy* a été considéré. En l'absence d'autres champs, la vitesse suivant l'axe *z* reste constante et la trajectoire résultante est un mouvement hélicoïdal autour d'un axe parallèle à *z*, qui se poursuivra indéfiniment (Figure II.20.). Pour construire un piège, une possibilité est de "bloquer" le mouvement suivant *z* par deux plaques de piégeage perpendiculaires à l'axe *z* portées à un faible potentiel répulsif. Une description complète du mouvement des ions va faire intervenir à la fois la rotation cyclotronique, une oscillation de long de l'axe O_z et une précession autour de l'axe O_z. La mesure de la fréquence cyclotronique s'effectue quant à elle en deux étapes que sont l'excitation du mouvement cyclotronique et la détection du mouvement cyclotronique excité.

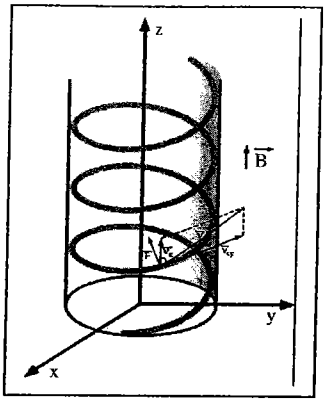


Figure II. 20. Trajectoire hélicoïdale autour d'un axe parallèle à z d'une particule chargée soumise à un champ magnétique B.

Ainsi un premier modèle à l'image d'une cellule cubique désigné par "piège de Penning" ou encore cellule à résonance cyclotronique des ions fut développé par Hans Dehmelt (1980) sur une idée de F.M. Penning en 1936. Il s'agit d'un dispositif qui s'appuie sur l'action conjuguée d'un champ magnétique intense et d'un champ électrostatique constant pour confiner les ions dans un espace réduit.

2.2.3. Le piège de Penning et technique ICR (Ion Cyclotron Resonance)

2.2.3.1. Le piège de Penning

La cellule de Penning est une cellule placée au coeur d'un champ magnétique intense et homogène à une pression de l'ordre de 10^{-9} Pa. L'emploi de pression très basse est requis pour augmenter la durée de vie des ions au cours de l'analyse.
A la différence de la cellule ICR, de structure cubique, parallélépipédique, cylindrique, rectangulaire, où il est possible de séparer la fonction d'excitation du mouvement cyclotronique de celle de la détection sur cette même fréquence, le piège de Penning admet la direction du champ magnétique comme axe de révolution et les électrodes sont disposées afin de réaliser au mieux une configuration électrostatique quadripolaire, avec l'obtention, à l'intérieur du piège, d'un ensemble d'équipotentielles paraboloïdaux.

Sous l'action de la composante défocalisante suivant l'axe x (ou y) et la force de Laplace due au champ magnétique sur l'ion en mouvement, celui-ci exécute un mouvement complexe.

fréquence cyclotronique et l'apparition d'une troisième fréquence propre des ions piégés, qui elle aussi est indépendante de la vitesse initiale des ions (Equation 7 et 8)

$$\nu_+ = \frac{\nu_c}{2} + \sqrt{\left(\frac{\nu_c}{2}\right)^2 - \frac{\nu_T^2}{2}} \quad \text{(Equation 7)} \qquad \nu_- = \frac{\nu_c}{2} - \sqrt{\left(\frac{\nu_c}{2}\right)^2 - \frac{\nu_T^2}{2}} \quad \text{(Equation 8)}$$

ν_+ étant la fréquence cyclotron réduite et ν_- la fréquence magnétron. En recombinants les deux fréquences nous obtenons l'égalité suivante (Equation 9).

$$\nu_c = \nu_+ + \nu_- \qquad \text{(Equation 9)}$$

Ainsi la fréquence cyclotronique ν_c, la fréquence cyclotron réduite ν_+ et la fréquence magnétron ν_-, nous permettent de reconstruire la trajectoire globale de la particule chargée au sein d'une cellule ICR (Figure II.21.).

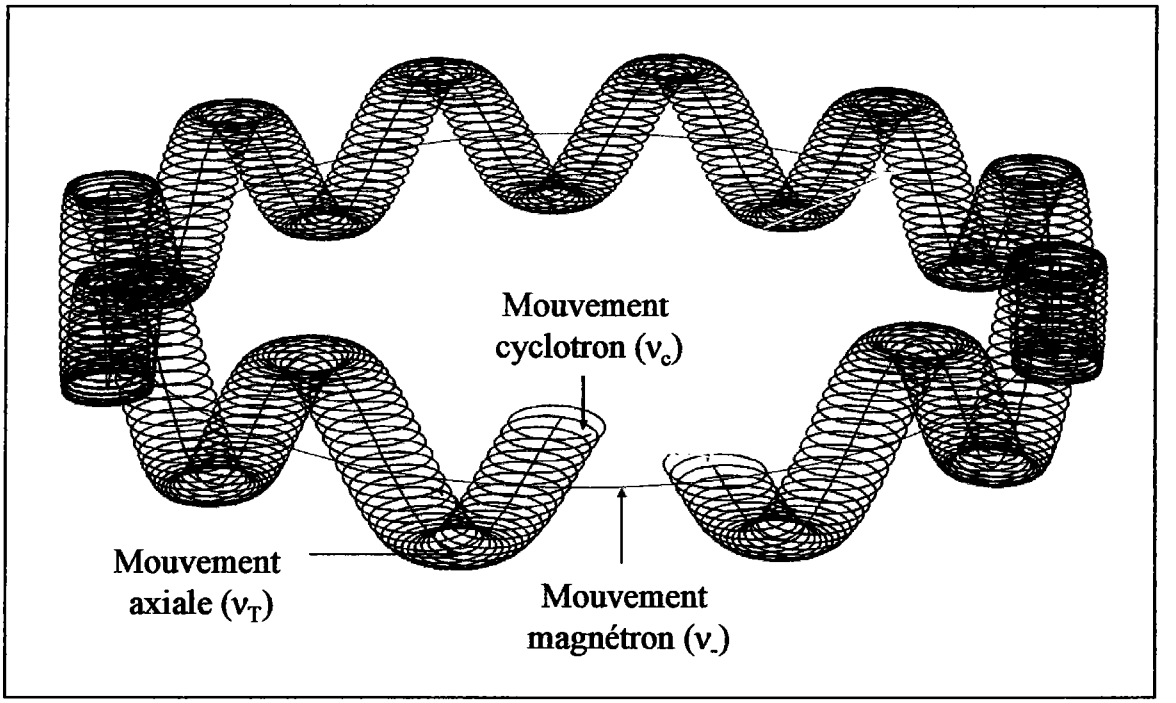


Figure II. 21. Mouvement d'une particule chargée au sein d'une cellule ICR. Le champ électrique impose à la particule un mouvement axial (fréquence de piégeage ν_T). Le champ magnétique génère le mouvement magnétron de fréquence ν_- ainsi que le mouvement cyclotron de fréquence ν_c[52].

[52] (50) M. Marie-Jeanne *Rapport de stage (3ème année) - Instrumentation Nucléaire* **2005**.

Il est à noter qu'aux basses masses $\nu_+ \approx \nu_c$, mais pour des masses plus élevées (ou des fréquences plus basses), il existe une région pour laquelle cette approximation n'est plus valable. Ce point sera atteint d'autant plus rapidement que le potentiel de piégeage est élevé, d'où l'intérêt d'utiliser un potentiel le plus faible possible (typiquement 0,5 à 2 V) même si l'efficacité de piégeage en est amoindrie.

2.2.3.2. La cellule d'analyse FT-ICR

Découlant du piège de Penning, le dispositif ICR a pour avantage qu'elle permet la détection des ions par excitation de la fréquence cyclotron par un jeu d'électrodes, et la détection d'un courant induit dans un autre jeu d'électrodes placées perpendiculairement. Notre cellule d'analyse est une cellule cylindrique (Figure II.22.), située au centre de l'aimant supraconducteur de 9,4 Tesla sous vide poussé (2.10^{-10} Pa). Les ions amenés par le guide d'ions sont piégés dans la cellule en diminuant brièvement puis en augmentant le potentiel des plaques de piégeages (quelques mV).

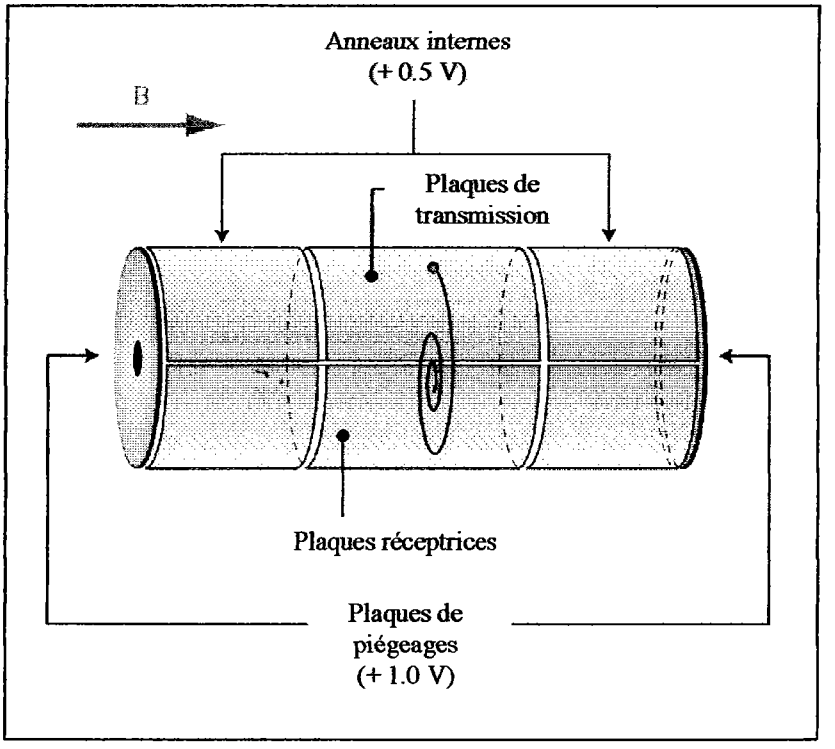


Figure II. 22. Cellule d'analyse cylindrique équipant notre FT-ICR/MS (9,4 Tesla)

Les cellule FT-ICR a pour spécificité les éléments suivants : elle est constituée de quatorze électrodes de cuivre plaquées or (Au) soutenues par des isolants en céramique donnant une longueur totale d'environ 17 cm. A l'extrémité de la cellule d'analyse se trouvent les plaques de piégeage, l'application d'une tension positive d'environ 0,5 V permettant de piéger les ions positifs, de même l'application de tensions négatives d'environ -0,5 V conduit à piéger les ions négatifs. Au centre de la cellule d'analyse on retrouve une paire de plaques réceptrices connectées à un amplificateur qui détecte le courant image permettant de mesurer la fréquence cyclotronique et conduisant à l'obtention du spectre de masse

2.2.4. Mesure de la fréquence cyclotronique

Une fois générée, la mesure directe de la fréquence cyclotronique des ions n'est pas possible. Ceux-ci ont en effet été produits à des temps différents et avec des énergies cinétiques variables, ce qui se traduit par une phase (position initiale sur l'orbite) et un rayon variable. Il sera donc nécessaire de faire passer la population d'ions de même rapport sur charge *m/z* d'un mouvement d'ensemble incohérent à un mouvement d'ensemble cohérent, c'est-à-dire placer le paquet d'ion sur une même orbite et avec une même phase. Ceci réalisé, les ions passant à proximité des plaques de réception vont induire un courant électrique qui nous permettra d'obtenir un interférogramme aboutissant un spectre de masse par transformée de Fourier (Figure II.22.).

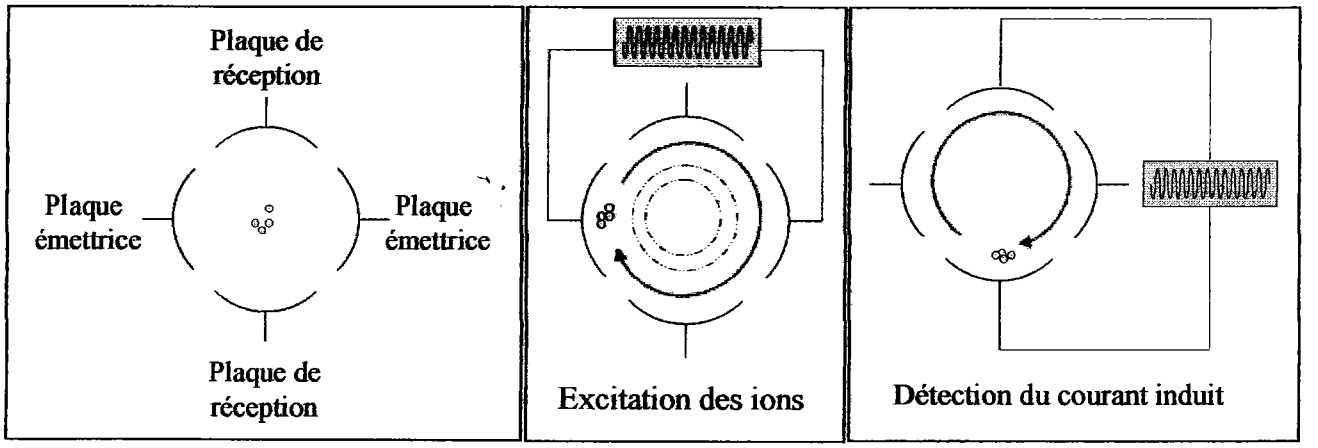


Figure II. 23. a) génération des ions, b) excitations conférant aux ions un mouvement cohérent, c) détection du signal.

Les étapes principales menant à un spectre de masse peuvent se décomposer comme suit:

i) La génération des ions

L'emploi d'une source externe d'ions telles que l'ESI ou le MALDI nécessite une ligne de transfert qui assure le passage des ions de la source d'ionisation au sein de la cellule d'analyse. Pour l'ionisation externe ESI, cette ligne de transfert est constituée d'un premier hexapôle (Q_1) permettant de transférer les ions du cône d'extraction vers le quadripôle (Q_2), intermédiaire pouvant faire office de filtre de masse dans le cas d'études de fragmentations. Dans le cas d'une acquisition "simple", les ions sont véhiculés du quadripôle (Q_2) vers l'hexapôle de stockage (Q_3, faisant également office de stockage) avant de parcourir le guide d'ion vers la cellule ICR. L'application d'un puit de potentiel adéquat permettant de les confiner au cœur même de cette dernière. Il est à noter que cette étape est critique car elle peut conduire à des discriminations au sein de la population d'ions. Pour l'ionisation externe MALDI, on s'affranchit d'une partie du système précédent. La plaque d'échantillonnage est placée à proximité de l'hexapôle (Q_3), les ions générés sont immédiatement stockés puis transférés via le guide d'ions vers la cellule ICR.

ii) L'étape d'excitation des ions :

Après leur introduction au sein de la cellule, les ions se trouvent sur une orbite basse. Leur rayon de giration est de l'ordre de quelques dixièmes de millimètres. Leur mouvement n'est pas cohérent. L'application sur la seconde paire de plaques dite d'excitation d'une radiofréquence permet par un phénomène de résonance, un transfert d'énergie aux différentes populations d'ions présentes de même masse dans la cellule d'analyse. Ce balayage en fréquence, très rapide couvre toutes les fréquences cyclotroniques des ions allant de quelques kHz à quelques MHz pour un champ magnétique de 9,4 Tesla. Le rayon de la trajectoire augmente alors, jusqu'à les porter au voisinage des plaques de détection. Cependant, cette orbite ne doit pas être trop grande, car l'inhomogénéité radiale du champ électrique peut conduire à l'éjection des ions.

Quand la fréquence appliquée est égale à la fréquence cyclotronique d'un ion de masse donnée, l'ion absorbe l'énergie. Son énergie cinétique augmente par un processus de transfert d'énergie :

$$E_C = \frac{1}{2}mv^2 = m\omega_C^2 R^2$$

(R, rayon de l'orbite circulaire de l'ion à la masse m)

Après un temps très court d'interaction avec la fréquence responsable de l'augmentation du rayon r de la trajectoire, le mouvement des ions de même masse est devenu cohérent et la détection est alors possible. Ce phénomène de transfert d'énergie est appelé résonance cyclotronique ionique (ICR), et est applicable à n'importe quelles particules chargées.
Seule une juste utilisation de la durée et de la tension d'excitation permet l'acquisition d'un bon spectre de masse. Il est à noter que dans le cas d'une durée d'irradiation plus importante, les ions sont amenés sur une orbite de rayon supérieur à celui de la cellule, ceci entraînant une éjection des ions par neutralisation sur les parois de la cellule.

iii) L'étape de la détection des ions :

Proches du troisième jeu de plaques de détection, les ions induisent par leur mouvement circulaire cohérent, après excitation, un courant alternatif ou courant image qui va amener le processus de détection et de formation du spectre (Figure II.24.).

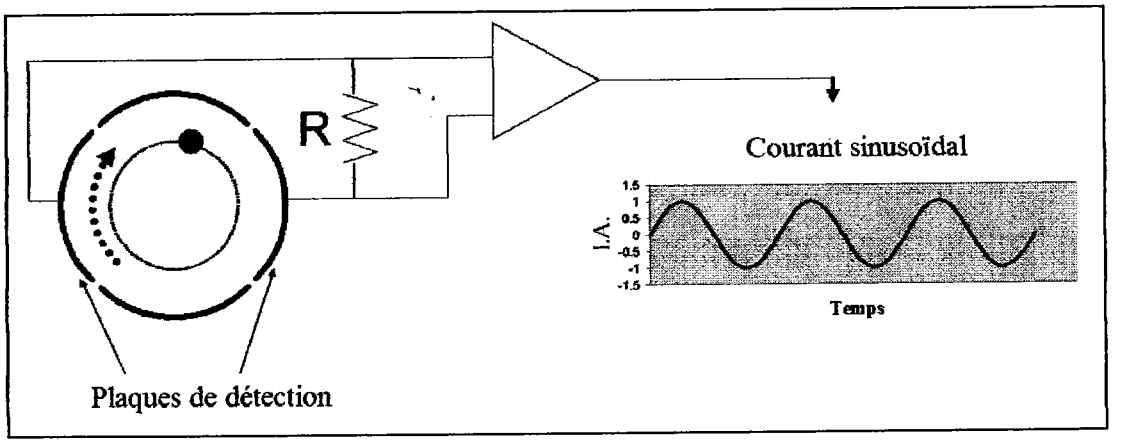


Figure II. 24. Principe de la détection des ions. Les deux plaques sont connectées à un circuit RLC qui génère un courant image sous forme temporelle.

Le courant alternatif détecté au travers d'un circuit RLC est converti en tension alternative V(t) selon :

$$V(t) = \frac{N.q.R}{d.C}.\cos(\omega_C t)$$

N : nombre d'ions de masse m détectés,

q : charge des ions en Coulombs,

R : rayon de l'orbite circulaire des ions (en mètre),

d : distance séparant les deux plaques de la capacité (en mètre),

C : valeur de la capacité,

ω_C : vitesse angulaire des ions ($rad.s^{-1}$),

t : temps de mesure (en seconde).

Pour chaque groupe d'ion de masse m donnée, une tension $V_m(t)$ est induite. La superposition des signaux associés à des ions de rapport m/z différent conduit à l'observation d'un signal composite résultant de la superposition de toutes les tensions images $V_m(t)$, appelé aussi "transient". Son expression est donné par :

$$V(t) = \sum_m V_m(t).\cos(\omega_C t)$$

Le signal obtenu subit un certain nombre de traitements mathématiques que sont :

i) l'apodization qui est une fonction mathématique par laquelle sont multipliés les données afin de minimiser les distorsions dans le spectre.

ii) le remplissage de la mémoire par des zéros (zéro-filling) dont l'impact est d'augmenter le rapport signal sur bruit du spectre. L'application d'un zéro-filling avant la transformation de Fourier augmente la précision d'un facteur de $2^{1/2}$.

iii) l'application de l'algorithme FFT (Fast Fourier Transform) pour traiter le spectre par conversion d'un signal V(t) appartenant au domaine de temps en un signal appartenant au domaine des fréquences.

iv) la correction de phase afin de corriger la symétrie des pics de masses.

Enfin, l'application de la relation liant la fréquence cyclotronique au rapport m/z assure l'obtention du spectre de masse (Figure II.25.).

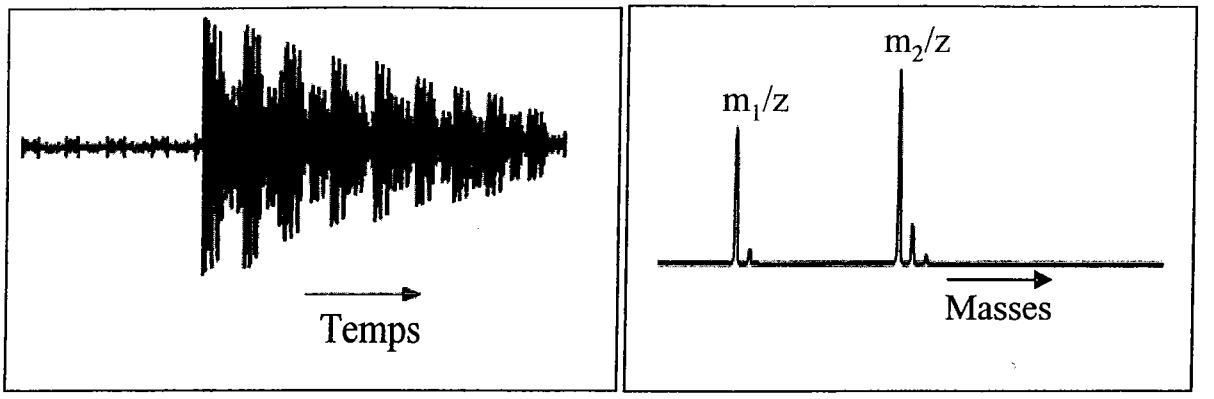


Figure II. 25. a) Transient d'une population d'ions de masses différentes, b) Spectre de masse obtenu après application de la transformée sur le transient précédent.

2.2.5. Performances et limitations de l'instrument ICR

2.2.5.1. Précision en masse et résolution

L'analyse FTICR permet la mesure de masse exacte. La précision en masse entre la masse mesurée et la masse théorique est de l'ordre du ppm. Cette précision pouvant être augmentée grâce à l'utilisation d'une calibration interne.

L'analyse par FT-ICR/MS est connue également pour être une technique permettant d'accéder à une analyse en très haute résolution, la résolution étant le degré de séparation des pics de masse. L'expression de la résolution à 50% de vallée ou FWHM (Full Width Half Maximum) est la suivante :

$$R = \frac{m}{\Delta m_{50\%}} = \frac{\nu}{\Delta \nu_{50\%}}$$

(m : masse de l'ion considéré, ν : fréquence de l'ion de masse m considéré)

Tous les ions qui sont présent au sein de la cellule ICR sont simultanément détectés diminuant d'autant le temps d'acquisition du spectre.

Le rapport signal sur bruit d'un instrument ICR est meilleur que celui de l'instrument plus conventionnel compte tenu de la possibilité importante de moyenner les spectres en un temps très rapide.

La mesure très précise de la fréquence de giration d'un ion au sein de la cellule FTICR est le paramètre principal responsable pour l'obtention d'une bonne résolution et d'une bonne précision de la mesure de masse. Ceci est obtenu lorsqu'il est possible d'échantillonner (d'analyser) longuement le transient.

Il est bon de noter que l'augmentation du champ B_0 a pour effet d'augmenter la résolution en masse mais surtout d'augmenter la gamme de masse accessible lors de l'analyse FT-ICR-MS.

Les limitations

Aussi, il est également ici important d'aborder les limitations ou contraintes inhérentes à l'emploi de la spectrométrie de masse ICR.

Malgré un vide élevé, au niveau de la cellule ICR, la quantité trop importante d'ions au coeur de la cellule peut provoquer l'apparition d'effets de charges d'espace et donc de perte de cohérence du mouvement cyclotronique des ions. Ces effets de charges d'espace[53] conduisent à une modification du positionnement des ions, initialement en paquet.

Les répulsions électrostatiques vont conduire à un étalement en demi lune, ce qui va notoirement diminuer la précision de la mesure de la fréquence. Ce processus peut également avoir lieu si le taux de collisions ions/molécules est trop important. De même, une non homogénéité du champ magnétique va nuire à l'observation sur un temps long du mouvement cohérent des ions.

L'analyse FT-ICR/MS demande la maîtrise de nombreux paramètres ayant une influence sur la formation et la détection des ions. Par exemple dans le cas d'une analyse ayant recours à une ionisation par ESI, nous devons non seulement optimiser les paramètres de l'analyseur source mais également ceux de la source. Concernant l'ESI nous devons prendre en compte la tension au niveau du capillaire, la tension du cône d'échantillonnage, la tension du cône d'extraction tandis que pour l'instrument, sont à considérer les voltages de la ligne de transfert (hexapôles et quadripôle), le temps de stockage des ions dans l'hexapôle Q_3, les tensions d'accélération au niveau du guide d'ion ainsi que les potentiels de piégeage de la cellule ICR.

La maintenance de l'aimant supraconducteur 9,4 Tesla nécessite l'utilisation de gaz cryogéniques (hélium et azote liquide) onéreux.

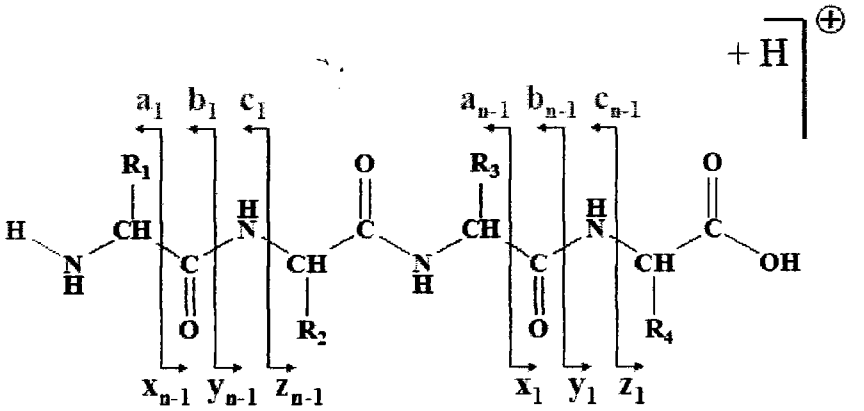
[53] (51) Taylor P. K.; Amster I. *J. Int. J. Mass Spec.* **2003**, *222*, 351-361.

2.2.5.2. Les modes de fragmentations

L'utilisation majeure de notre instrument FT-ICR/MS dans le cadre de nos études est consacrée à la caractérisation de protéines. Deux stratégies sont alors envisagées. La première consiste à pratiquer la digestion de protéines par la trypsine (Promega) durant une période de 14 à 16 heures puis d'analyser les différents peptides obtenus par spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions FT-ICR/MS. Il s'agit de la stratégie "Bottom-Up" qui permet, à partir de la séquence de peptides d'accéder à l'identification de la protéine initialement échantillonnée.

La seconde stratégie, "Top-Down" consiste à introduire directement la protéine au sein du spectromètre de masse et de procéder à sa fragmentation via l'utilisation de modes de dissociation directement applicables au niveau du spectromètre de masse. Suite à cette fragmentation, il y a obtention d'ions fragments qui peuvent être classées en deux catégories : ceux provenant du clivage d'une ou deux liaisons de la chaîne peptidique et les autres qui en plus subissent un clivage de la chaîne latérale de l'acide aminé.

La nomenclature proposée par Roepstorff et Fohlman[54] puis complété par Biemann[55] permet de caractériser les différents fragments obtenus à savoir trois types de fragments désignés respectivement a_n, b_n et c_n si la charge positive est retenue par le côté N-terminal et trois types de fragments désignés respectivement x_n,y_n et z_n si la charge positive est retenue par le côté C-terminal (Figure II.26.).



54 (52) Roepstorff et Fohlman *Biomed Mass Spectrom.* **1984**, *11*, 601.
55 (53) Biemann K. *method enzymol.* **1990**, *193*, 455-479.

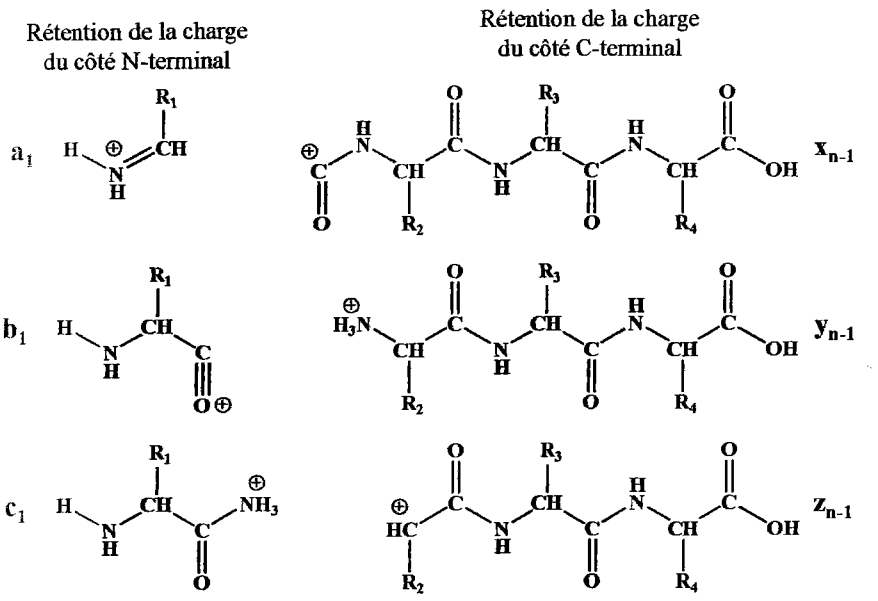


Figure II. 26. Nomenclature de la fragmentation peptidique

Ces fragments vont former ce que nous appèlerons une étiquette de séquence qui va nous permettre d'aboutir à l'identification de la protéine.

Pour ce faire nous avons trois modes de dissociation disponibles sur notre instrument FT-ICR/MS que sont :

- SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation Collision-Induced Dissociation), dissociation induite par collision.
- ECD (Electron Capture Dissociation), dissociation par capture d'électrons.
- IRMPD (InfraRed Multi Photon Dissociation) dissociation par photons infrarouges.

Le mode dissociation SORI :

Le mode dissociation SORI (Sustained off resonance irradiation) en spectrométrie de masse par résonance cyclotronique (FT-ICR/MS) montre un grand intérêt compte tenu de la faible énergie de fragmentation qui peut être appliquée aux ions préalablement sélectionnés au sein de la cellule ICR. Au cours de ce processus de fragmentation à faible énergie, une excitation de l'ion est conduite via l'application d'un champ électrique "off resonance" pour lequel la

fréquence est situé à 500 – 2000Hz en deçà de la fréquence cyclotronique de l'ion[56]. L'énergie minimale de translation (en absence de collision) de l'ion est décrite par :

$$E_{Tr(\max)} = \left[(E_{RF})^2 e^2 / \left(2m(\omega_1 - \omega_C)^2\right)\right] \sin^2(\omega_1 - \omega_C)t/2$$

Avec :

ω_1 : fréquence d'excitation ($rad.s^{-1}$),

ω_C : fréquence cyclotronique naturelle de l'ion ($rad.s^{-1}$),

$E_{TR(max)}$: énergie de translation de l'ion dans le référentiel laboratoire,

E_{RF} : amplitude du champ électrique appliqué ($V.m^{-1}$),

t : temps d'application du champ électrique (typiquement 500 – 2000 ms),

e : champ électrique élémentaire.

En conséquence, par l'emploi d'un champ électrique "off resonance" de telle sorte que $\Delta\omega = \omega_1 - \omega_c$ soit approprié et ce sur un laps de temps assez long, l'ion subit une série de cycles d'accélération et de décélération. En présence d'un gaz inerte tel que l'azote, les ions peuvent être activés légèrement suite à des collisions de faible énergie, avec toutefois une faible dispersion de leur localisation au sein de la cellule. L'énergie moyenne de collision est contrôlée via la variation de l'amplitude d'irradiation E_{RF} ou la différence de fréquence entre la fréquence cyclotronique effective et la fréquence d'irradiation ($\Delta\omega$)

Le mode de dissociation MS/MS "sustained off resonance irradiation" (SORI) peut être mis en œuvre sur notre instrument FT-ICR/MS. Pour cela, les ions précurseurs sont tout d'abord sélectionnés par le filtre de masse quadripolaire Q_2 et stockés dans la cellule de collision de faible énergie. Après un temps très court de stockage, ces ions sont éjectés de la cellule de collision et envoyés au sein de la cellule d'analyse.

La dissociation SORI est initiée par l'ouverture d'une vanne pulsée qui permet l'arrivée d'un jet de diazote à $1{,}3.10^{-4}$ Pa. Puis une application d'une radiofréquence RF (2000Hz plus importante que la fréquence cyclotronique des ions) en un temps de 0,5s est effectuée sur les plaques d'excitation afin d'accélérer les ions précurseurs. Cette condition "off resonance" cause une périodicité d'accélération et de décélération 2000 fois par seconde. L'énergie gagnée via de multiples collisions aboutit à la fragmentation.

---

[56] (54) S. A. Hofstadler *J. Am. Soc. Mass Spectrom* **1994**, *5*, 894-899.

Une limitation de cette technique de dissociation est l'éjection possible non intentionnelle des fragments produits et le temps assez long d'entrée et de sortie ($\approx$2s) du gaz inerte de collision au niveau de la cellule d'analyse.

Le mode de dissociation par Capture d'Electrons (ECD):

La dissociation par capture d'électrons a émergé comme une stratégie MS/MS robuste, particulièrement dans le domaine d'analyse de peptides et de protéines[57]. Ce mode de dissociation est basé sur la recombinaison dissociative de molécules polypeptidiques à charges multiples (protonées) avec le recours d'électrons de faible énergie. Le mécanisme ECD n'est pas encore bien élucidé. Il est admis cependant qu'il y a capture d'un électron sur la plus haute orbitale du polypeptide "polycationisé". Il y a alors neutralisation de la charge aboutissant à la formation d'une espèce radicalaire en un laps de temps de l'ordre de 10^{-11}s qui conduit à un clivage spécifique de la molécule polypeptidique (Figure www).

$$[M + 4H^+] + e^- \rightarrow [M + H + 3H^+]^* \rightarrow \textbf{Fragments}^+$$

(Énergie interne excessive)

La réaction de recombinaison ion-électron $H^+ + e^- \rightarrow H^\bullet$ est très exothermique (>400 kJ/mol) et la fragmentation s'opère rapidement avant que l'énergie ait le temps de se redistribuer au sein de la molécule faisant de l'ECD un processus non ergodique. (Un processus est ergodique lorsque la variation d'un seul processus sur une longue gamme de temps est égale à celle de beaucoup de processus simultanés. Dans le cas inverse, la réaction est dite non-ergodique)[58].

. Aussi, tous les acides aminés semblent présenter une même probabilité de rupture mais les protéines les plus grosses (>20000Da) capturent l'électron mais ne se cassent pas. La fragmentation des peptides est effective avec des énergies électroniques inférieures à 1 eV dans le cas de notre instrumentation. Cette dissociation se fait plutôt de manière homogène et est dominée par le clivage *N-Cα*, donnant préférentiellement des fragments de type c et z, ce qui diffère des méthodes à excitation vibrationnelle qui elles génèrent des ions de type b et y

---

57 (55) Zubarev, R. A. K., N. L.; McLafferty, F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3265-3266.

58 (56) McLafferty *J Am Soc Mass Spectrom* **2001**, *12*, 245–249.

(Figure II.27.). Il est à noter que dans le cas des ponts disulfures, ces derniers sont dissociés de façon préférentielle[59].

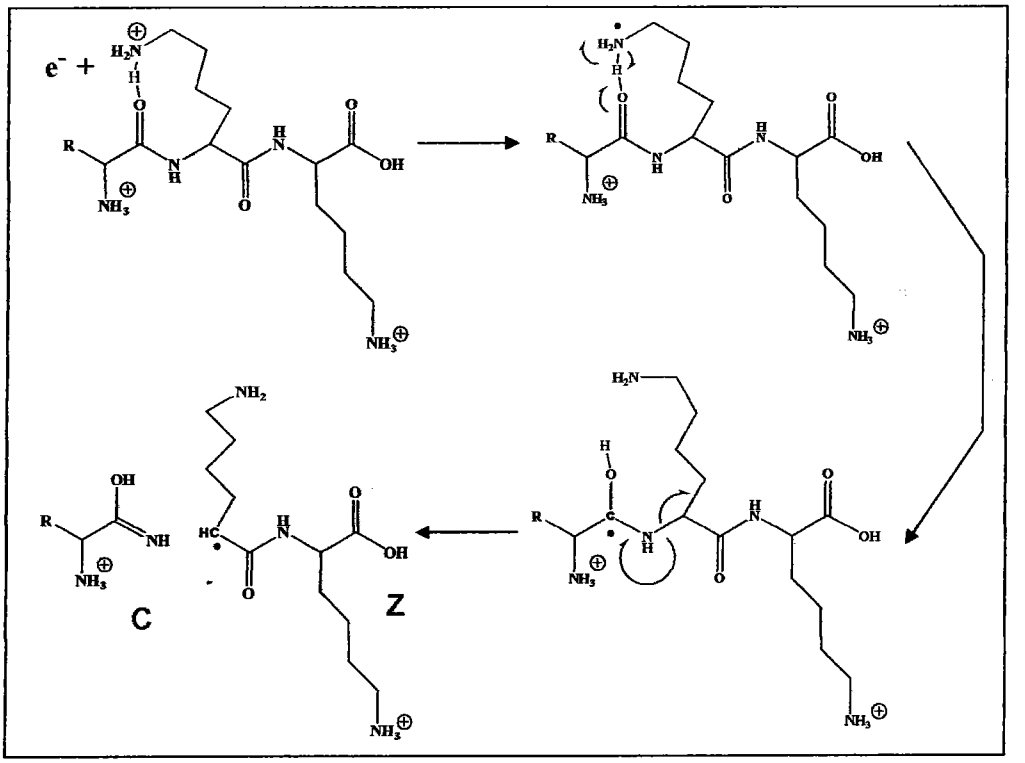


Figure II. 27. Mécanisme possible de la fragmentation des ions en type c et z par addition du radical H• au niveau de la fonction carboxyle d'un peptide.

Un des intérêts de la technique de dissociation par ECD tient au fait que les ions fragments "retiennent" les groupes labiles des modifications post-traductionnelle (PTM) telles que la sulfatation, le γ-carboxylation ou bien encore la O-glycosylation et la phosphorylation.

Le mode de dissociation par MultiPhotons InfraRouges (IRMPD)

Les fragmentations par IRPMD s'effectues à l'aide d'un laser continu au CO_2 de longueur d'onde $\lambda = 10{,}6\mu m$ (énergie du photon = $1{,}87.10^{-20}$J soit 11,3 kJ/mol) et de puissance = 70W en ce qui concerne notre instrument FT-ICR/MS. Cette longueur d'onde est très efficace car elle est fortement absorbée par les différents modes vibrationnels des ions. L'énergie est bien moins importante comparée à celle égale à 400 kJ/mol obtenu par les recombinaisons

[59] (57) Zubarev R. A.; Kruger N. A.; Fridriksson E. K.; Lewis M. A.; Horn D.M.; Carpenter B. K.; McLafferty F. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 2857- 2862.

ions/électrons lors de l'ECD. De ce fait de nombreux photons peuvent être absorbés ($n \approx 40$) sur une durée de plusieurs dixièmes de seconde pour que la fragmentation ait lieu.

$$[M + 4H^+] + n.h\upsilon \rightarrow [M + 4H^+]^* \rightarrow \mathbf{Fragments}^+ + \mathbf{neutres}$$

L'IRMPD produits exclusivement des ions fragments de type b et y (Figure II.28.). Ceci peut être expliqué par clivage des groupements amide protonés sur la chaîne principale. Ce mode a l'avantage de fournir un grand nombre de fragments car les premiers fragments issus de la molécule sélectionnée sont eux même irradiés.

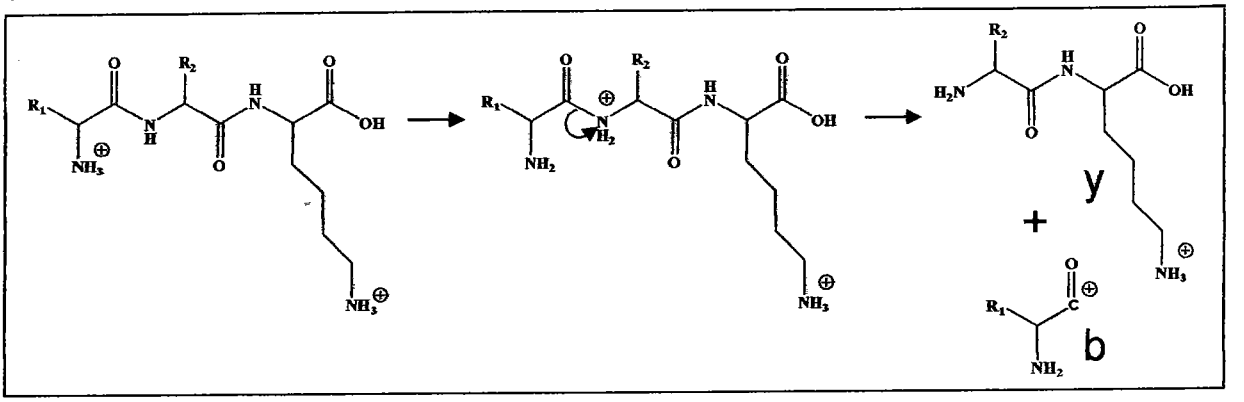


Figure II. 28. Mécanisme de formation des ions fragments de type b et y par IRMPD

Les avantages du mode de dissociation IRMPD en ce qui concerne les ions protonés tient au fait de sa facilité de mise en œuvre, du haut niveau de contrôle sur l'énergie laser appliquée à l'ion, du fait qu'il n'y a pas dans ce cas d'utilisation de gaz, de l'existence d'une faible discrimination en masse, et d'une fragmentation qui s'effectue dans l'axe permettant une ou plusieurs fragmentations supplémentaires des ions fils (MS^n)[60].

2.2.6. Transfert des ions de la source vers la cellule

L'utilisation de sources d'ionisation externe de type MALDI ou ESI, nécessite le transport de ions formés de la source vers la cellule ICR. Pour exemple nous pouvons prendre la génération d'ions par une source MALDI. Lors de l'acquisition du spectre de masse les ions formés sont recueillis et stockés dans l'hexapôle (Q_3) puis injectés dans le guide d'ion (quadripôle) ,après ouverture de la vanne de séparation, et transférés jusqu'au cœur de la cellule ICR (Figure I.29.)

---

[60] (58) Little, D. P. e. c. *Anal Chem* **1994**, *66*, 2809-2815.

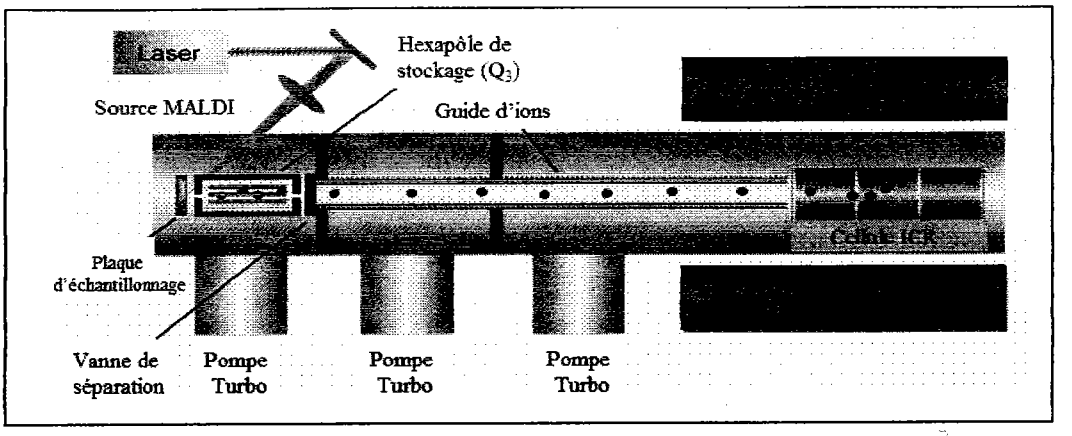


Figure II. 29. Schéma du spectromètre MALDI-FT-ICR/MS

Un guide d'ions basés uniquement sur des radios fréquences est utilisés pour transporter les ions formés dans la source, ou la pression est élevée, jusqu'à la cellule d'analyse, où une basse pression est nécessaire à la détection des ions. Quand cette pression est faible ($P < 10^{-7}$ Pa), le pouvoir de résolution peut être cent fois plus important qu'à haute pression car la fréquence de collisions entre les ions formés et le gaz présent est plus faible. C'est un des problèmes qui limitait les premiers appareils de type FT-ICR/MS, à cause de la difficulté de maintenir une pression aussi basse dans la cellule d'analyse en cours de manipulations.

Le fait que l'appareil utilisé possède une source d'ionisation externe permet un pompage et donc une mise en basse pression plus aisée, mais le problème se situe dans le moyen d'introductions des ions dans la cellule d'analyse. Il est bien connu en physique des plasmas que la présence d'un champ magnétique cause un effet dit "miroir magnétique", qui ralentit les ions qui pénètrent dans une région de fort champ magnétique. Le miroir magnétique est observé quand la vitesse axiale des ions diminue jusqu'à zéro et qu'elle devient négative, provoquant un renvoi des ions.

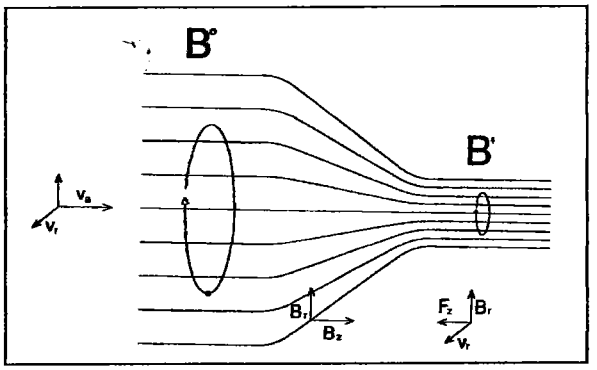


Figure II. 30. Représentation de l'effet miroir : le renvoi des ions s'effectue lors du passage d'un milieu de champ magnétique faible B° (guide d'ions) vers un milieu de champ magnétique fort B' (cellule d'analyse FT-ICR).

Sur la représentation ci-dessus (Figure II.30.) ont peut observer les principes fondamentaux de l'effet miroir. A la gauche de la figure, les lignes de champs sont relativement éloignées les unes des autres générant de ce fait un champ magnétique B° faible. La partie droite, correspondant à la cellule d'analyse FT-ICR, possède des lignes de champs resserrées ce qui induit un champ magnétique B° plus important. L'intensité du champ se répercute au niveau de l'orbite cyclotronique des ions. En effet, l'orbite cyclotronique initiale est large au niveau du guide d'ion mais lorsque le passage s'effectue vers la cellule possédant un champ magnétique plus intense le rayon de cette orbite diminue. Le diagramme de gauche représente les deux composantes de la vitesse d'un ion : sa vitesse axiale $\mathbf{v_a}$ et sa vitesse radiale $\mathbf{v_r}$. Cette dernière détermine la largeur du rayon de giration de l'ion et $\mathbf{v_a}$ correspond à la vitesse à laquelle l'ion traverse le champ magnétique. La région intermédiaire qui est inhomogène présente un intérêt particulier par la composante radiale du champ magnétique $\mathbf{B_r}$ créé à la convergence des lignes de champs. Le diagramme situé en bas à droite montre que $\mathbf{B_r}$ interagit avec la vitesse radiale de l'ion ce qui produit une force résultante $\mathbf{F_z}$ opposée à l'avancée de l'ion.

$$\mathbf{F_z = q(v_r * B_r)}$$

Comme $\mathbf{F_z}$ est directement opposée à la direction de l'ion, celui-ci ralentit quand il pénètre un champ magnétique important. Pour répondre aux lois de la conservation de l'énergie, la vitesse axiale diminue à cause de l'apparition de l'effet du miroir magnétique dû au mouvement cyclotronique.

Pour s'affranchir de cet effet de miroir magnétique, R.T. McIver utilise en 1983 un quadripôle à radios fréquences pour focaliser des ions en un faisceau étroit. L'idée est d'utiliser un champ électrique intense afin de focaliser les ions et de les injecter directement au centre du champ magnétique où la composante radiale $\mathbf{B_r}$ est faible. Cette méthode est efficace et permet une grande efficacité dans la transmission des ions. Ainsi, différents types de guides d'ions peuvent être utilisés tels que les quadripôles, les hexapôles et les octopôles. Sur la Figure II.31. est représenté un guide d'ion équipant notre instrument FT-ICR/MS de type hexapôle avec des tiges de métal (ϕ = 4 mm). Un signal sinusoïdal de type V.cos (ωt) est

sont à des pressions différentes et trois pompes turbomoléculaires sont nécessaires pour maintenir cet écart de pression.

3. Les techniques de spectrophotométrie et de microscopie

3.1. La spectrophotométrie d'absorption ultraviolet/visible

3.1.1. Le principe

Les spectroscopies ultraviolette et visible mettent en évidence des absorptions d'énergie liées à des transitions électroniques au sein de la molécule. Cette absorption énergétique correspond au passage des électrons d'orbitales moléculaires à un état excité. Sur les spectres obtenus figurent les variations, de l'absorbance (A) ou de la densité optique (D_O) ou du coefficient d'extinction molaire (ε), en fonction de la longueur d'onde des radiations. Suite à l'étape d'absorption, l'énergie absorbée sera restituée selon un processus non radiatif ou par un processus radiatif (émission de photons). Dans ce dernier cas, on parle de phosphorescence et de fluorescence, processus radiatifs qui sont exploités notamment par d'autres méthodes d'analyse comme la spectroscopie à émission électronique.
Il est à noter que la spectroscopie d'absorption UV-visible fait partie des techniques les plus fréquemment utilisées dans les laboratoires d'analyses chimiques. Elle est d'une facilité de mise en œuvre, d'une grande sensibilité et d'une bonne précision (les erreurs relatives à la concentration avoisinent 0,1%).

Deux applications peuvent être distinguées:

- L'application qualitative basée sur la caractérisation des groupements chromophores principaux de la molécule d'intérêt.
- L'application quantitative, basée sur la loi de Beer-Lambert qui constitue la base de l'analyse quantitative spectrophotométrique. Cette relation relie l'absorption d'une espèce absorbant la lumière et sa concentration selon :

$$\mathbf{A = \varepsilon.l.C}$$

A: Absorbance (sans unité),

l: Chemin optique, épaisseur de la solution traversée par le faisceau lumineux (cm)

C: Concentration molaire ($mol.L^{-1}$)

ε: coefficient d'absorption molaire ou d'extinction molaire ($L.mol^{-1}.cm^{-1}$)

ε est un coefficient intrinsèque au composé qui dépend de la longueur d'onde, de la température et du milieu de solvatation. Cependant, son domaine de validité est restreint aux solutions faiblement concentrées, pour rester dans des conditions linéaires.

En spectroscopie liquide, la position, l'intensité et la forme des bandes d'absorption des composés en solution dépendent du solvant. Ces changements traduisent les interactions physiques solutés/solvant qui modifient la différence d'énergie entre l'état fondamental et l'état excité.

Lors d'une analyse, les bandes d'absorption peuvent être soumis à quatre types d'effets distincts:

Effet hyperchrome : l'intensité d'absorption du chromophore augmente (augmentation d'**ε**),

Effet hypochrome : l'intensité d'absorption du chromophore diminue (diminution d'**ε**),

Effet hypsochrome : déplacement du maximum d'absorption vers les courtes longueurs d'onde résultant d'un besoin énergétique plus important pour provoquer la transition électronique,

Effet bathochrome : déplacement vers les grandes longueurs d'ondes entraîné par une stabilisation de la forme excitée, ce qui favorise la transition électronique nécessitant moins d'énergie.

Le spectrophotomètre ultraviolet/visible employé lors de nos analyses d'absorption UV/visible est un modèle Lambda 14 (Perkin Elmer). Ce spectrophotomètre est constitué de trois parties distinctes : la source, le système dispersif (combiné à un monochromateur) et le détecteur basé sur un système de photodiodes. La gamme de longueur d'onde pour cet appareil s'étend de l'ultraviolet à 190 nm au proche infrarouge à 1100 nm. Pour couvrir cette gamme, deux sources sont utilisées, la première consiste en une lampe à incandescence halogène comportant un filament de tungstène et une enveloppe de verre de silice balaie la

partie visible permettant le balayage du spectre jusqu'à 350 nm. En dessous de cette longueur d'onde, l'utilisation d'une lampe à arc au deutérium permet d'accéder à un rayonnement couvrant la gamme 150 nm à 350 nm.

Les radiations émises par la source sont dispersées par un réseau comportant 1053 traits par mm. Ce réseau est intégré à un système appelé monochromateur qui permet la sélection des différentes longueurs d'onde provenant des sources lumineuses.
Notre dispositif est équipé d'un système à double faisceau. Lors d'une acquisition, le rayonnement sélectionné par le monochromateur est scindé en deux faisceaux de même intensité, dirigés au moyen de miroirs rotatifs sur deux cellules en quartz contenant d'une part une référence (solvant ou l'air) d'autre part l'analyte (analyte + solvant). En sortie des cuves, les faisceaux sont focalisés à l'aide de lentilles sur des photodiodes. Une fois digitalisé, le signal peut être lu en ligne et traité informatiquement.

Pour nos études, les solutions considérées ont une gamme de concentration allant de 10^{-4} à 10^{-6} $mol.L^{-1}$ et sont placées dans des cuves identiques en quartz Suprasil de volume variable (1 à 4 mL) mais de chemin optique constant égale à 0,95 cm. Afin de limiter les phénomènes d'évaporation, les cuves sont fermées à l'aide de bouchons en Téflon.
Lors de nos études, nous avons eu recours aux paramètres suivants (Tableau II.2.) :

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

Tableau II. 2. Paramètres d'acquisition du spectrophotomètre UV-Visible (Lambda 14 Perkin Elmer).

3.2. Le microscope à épifluorescence

La luminescence est un procédé qui peut se scinder en 2 grandes catégories : la fluorescence et la phosphorescence. Un objet éclairé émet de la lumière dans toutes les directions de l'espace à une longueur d'onde différente de la longueur d'onde excitatrice. Pour une substance donnée si l'émission de la lumière cesse dès l'arrêt de l'excitation alors on parle de fluorescente. Au contraire, si cette émission se poursuit alors la substance est

phosphorescente. La fluorescence est un processus d'émission qui s'observe lorsque des atomes ou des molécules excités par absorption d'un rayonnement électromagnétique, reviennent à leur état fondamental via un processus de désexcitation radiatif.

Cette technique est très sélective car un nombre restreint de molécules présente le phénomène de fluorescence. La plupart des molécules "absorbantes" ne fluorescent pas car leur structure est telle que la relaxation non radiative peut se produire plus rapidement que l'émission de fluorescence. L'utilisation d'une telle technique lorsque les molécules sont fluorescentes permet d'effectuer des dosages très sensibles par rapport à la méthode d'absorption car la sensibilité de la fluorométrie peut être accrue en augmentant la puissance du rayonnement d'excitation et en amplifiant le signal du détecteur. Les applications les plus importantes concernent l'analyse des composés fluorescents notamment dans le cadre de l'imagerie cellulaire ou encore le suivi de dégradations de médicaments.

Un microscope à épifluorescence est un microscope photonique équipé de plusieurs sources lumineuses, une lampe halogène pour une observation classique par transmission et d'une lampe d'halogène et de mercure pour la fluorescence. Des filtres d'excitation permettent de choisir la longueur d'onde incidente et des filtres d'émission (ou d'arrêt) permettent de sélectionner les radiations émises par l'objet excité.

Un microscope équipé en épifluorescence est pourvu de plusieurs jeux de filtres ("Bloc") correspondant aux fluorochromes les plus habituellement utilisés. Chaque bloc est constitué d'un filtre d'excitation, d'un miroir dichroïque et d'un filtre d'émission (Figure II.32.). Les fluorochromes les plus classiques sont la rhodamine et ses dérivés, la fluorescéine et ses dérivés et le DAPI (Diamidino-4',6-phénylindol-2-dichlorhydrate). Ils émettent respectivement dans le rouge, le vert et le bleu.

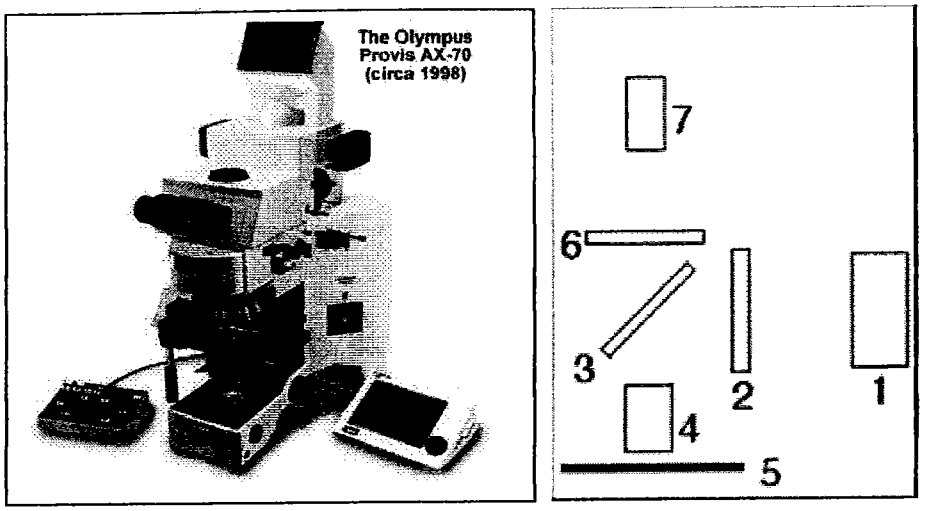


Figure II. 32. Représentation du microscope à épifluorescence Olympus AX 70 (Olympus America inc.)

Après une première visualisation de l'échantillon par le biais d'une lampe ordinaire, le système bascule en mode fluorescence. Des filtres correspondant aux caractéristiques du fluorochrome sont alors utilisés.

La visualisation du fluorochrome passe par trois étapes essentielles :
1-L'utilisation du filtre approprié d'excitation après basculement sur la lampe à arc permet la sélection en longueur d'onde des radiations absorbées par le fluorochrome (Figure II.33. (i)). On parle alors de longueur d'onde d'excitation $\lambda_{exc.}$.
2-Le miroir dichroïque du système va alors réfléchir les radiations vers l'échantillon et ne laissera passer que le rayonnement issu de l'échantillon ($\lambda > \lambda_{exc.}$) par transmission (Figure II.33. (ii)).
3-En final, un filtre d'émission laissera passer par transmission que les radiations propres du fluorochrome ($\lambda > \lambda_{exc.}$) par transmission (Figure II.33. (iii)).

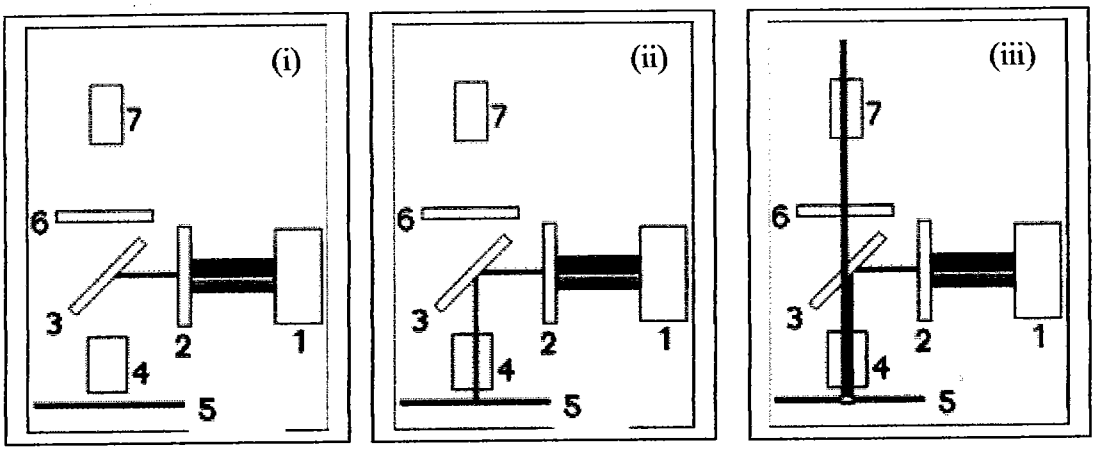


Figure II. 33. Représentation du mode fluorescence du microscope à épifluorescence. (i) sélection de λ_{exc}, (ii) réflexion et filtrage ($\lambda > \lambda_{exc}$), (iii) transmission ($\lambda > \lambda_{exc}$)

Notre appareil dispose des blocs (λ_{exc} / **filtre** / λ_{em}) suivants (Tableau II.3.) :

	Longueur d'onde (nm)		
Blocs	Excitation (λ_{exc})	Filtre	Transmission (λ_{em})
A	visible	aucun	visible
B	330-385	400	420-460
C	460-490	505	510-550
D	400-440	570	590

Tableau II. 3. Caractéristiques des blocs disponibles sur le microscope à épifluorescence Olympus AX 70 (Olympus America inc.)

Dans le cadre de nos travaux, ce dispositif nous permettra de mettre en évidence la signature fluorescente spécifique de nos composés au sein de cellules humaines adénocarcinomiales du colon et du sein (HT29 et MCF7) et amener ainsi des arguments quant à l'internalisation ou non de ces composés au niveau de ces deux lignées cellulaires

4. Echantillonnage et protocole d'irradiation laser

4.1. Echantillonnage

4.1.1. Les composés étudiés

Les composés qui font l'objet de nos travaux sont les suivants :

- Le photosensibilisateur, 5,10,15,20-méso(tetrahydroxyphenyl) chlorine (m-THPC) ou encore appelé Foscan®, de masse moléculaire égale à 680 g/mol fournis par la société Biolitech Pharma Ltd. (Edimbourg, U.K.).
- La molécule, le 1,3 Diphénylisobenzofurane (DPBF), de masse moléculaire égale à 270 g/mol (Sigma-Aldrich Co, Gillingham-Dorset, U.K.) qui est utilisé comme sonde spécifique à l'oxygène moléculaire singulet.
- Le produit issu de la réaction entre l'oxygène singulet et le DPBF, l'ortho-benzoylbenzène (o-BB), de masse moléculaire égale à 286 g/mol. (Interchim, Montluçon, France) qui résulte de la réaction entre l'oxygène moléculaire singulet e la molécule DPBF.

4.1.2. Mise en solution des échantillons

Le photosensibilisateur que nous utilisons a la particularité d'être insoluble dans l'eau. C'est pourquoi, nous devons préparer une solution mère dans laquelle nous solubilisons le composé en milieu éthanoïque. Cette solution dont la concentration est de 2.10^{-3} mol/L, nous permet d'obtenir les solutions diluées finales à une concentration de 10^{-5} mol/L.
Les solutions mères DPBF et o-BB ont également un milieu de solvatation éthanoïque et présente des concentrations soit de 2.10^{-2} mol/L soit 2.10^{-3} mol/L, permettant l'obtention de solutions finales à des concentrations à 10^{-4} mol/L et 10^{-5} mol/L.

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 de pollutions ou de contaminants. La préparation des solutions s'effectue en diluant cent fois les solutions mères ou dans de l'eau Ultrapure afin d'obtenir un mélange éthanol/eau (1/99) (v/v). Toute cette opération s'effectue à l'abri de la lumière afin d'éviter une photodégradation du produit étudié.

4.1.3. Le milieu cellulaire

Sachant que la PDT employant le Foscan® a déjà été réalisée sur des cancers de colon et de poumon humain, les études nécessitant le milieu cellulaire ont été réalisées avec des cellules HT29 (adénocarcinome de côlon humain) et MCF7 (adénocarcinome de poumon humain), fournies par le Centre Alexis Vautrin de Vandoeuvre les Nancy (54) (Equipe du Pr. F. Guillemin). La solution d'incubation est composée de 97 % de RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute), de 2 % de sérum de veau fœtal (SVF), préalablement conservé au congélateur à -18°C, (Dominique Dutscher SA, Brumath, France) et 1 % d'éthanol pouvant contenir de la m-THPC (10^{-5} mol/L), du DPBF (10^{-4} mol/L) de l'o-BB (10^{-4} mol/L). La solution d'incubation est préparée 30 minutes avant d'être mise en contact avec les cellules afin que l'équilibre dans la solution soit atteint. Les détails de la préparation des solutions contenant le photosensibilisateur ainsi que la sonde spécifique à l'oxygène singulet seront abordés dans le chapitre III et IV.

4.2. Protocole d'illumination

L'objectif principal de notre travail est de mettre en évidence l'action de notre agent photosensible (Foscan®) au niveau des cellules cancéreuses lors du traitement photodynamique. Pour remplir cet objectif, nous nous sommes particulièrement intéressé la mise en évidence de la génération d'oxygène *in situ* ainsi que son impacte sur la distribution de protéines cellulaires. Cette approche s'est faite dans un premier temps en solution aqueux pour aboutir au final à des recherches en milieu cellulaire. Pour y parvenir, nous avons mis au point différents protocoles expérimentaux basés sur des techniques de spectrométrie de masse et de spectrophotométrie. Lors des études en solution aqueuse et *in situ*, nous avons eu recours aux dispositifs expérimentaux mis en œuvre lors des travaux de Marc Angotti[61] et de Natacha Lourette[62].

Les protocoles d'illumination que nous allons détailler se décompose en trois parties : la première correspondant aux études menées en solution aqueuse, la seconde est relative aux analyses sur monocouches cellulaires et la troisième est basée sur les travaux correspondant à l'approche protéomique.

---

61 (28) Angotti M. *Thèse de l'Université Paul Verlaine, Metz, France* **2001**.

62 (29) Lourette N. *Thèse de l'Université Paul Verlaine, Metz, France* **2004**.

4.2.1. Protocole d'illumination de solution aqueuse

Les premières études menées en solution visait à mettre en évidence la production de l'oxygène moléculaire singulet à partir du Foscan® activée à une longueur d'onde adéquate à savoir 652 nm. Ces irradiations laser ont été effectuées au sein de notre laboratoire, dans une cuve en quartz (volume = 3,4 mL, trajet optique = 0,95 cm), cuve qui permet également d'effectuer des analyses par spectrophotométrie UV-visible. Lors de l'illumination laser, cette cuve a été équipée d'un système d'agitation magnétique afin d'avoir une homogénéisation constante de la solution. De plus, lors des études en milieu aqueux, la cuve a été fermée à l'aide d'un bouchon de téflon. Toutefois, le dispositif n'étant pas totalement hermétique, l'apport en oxygène était possible à la surface du liquide (Figure II.34.).

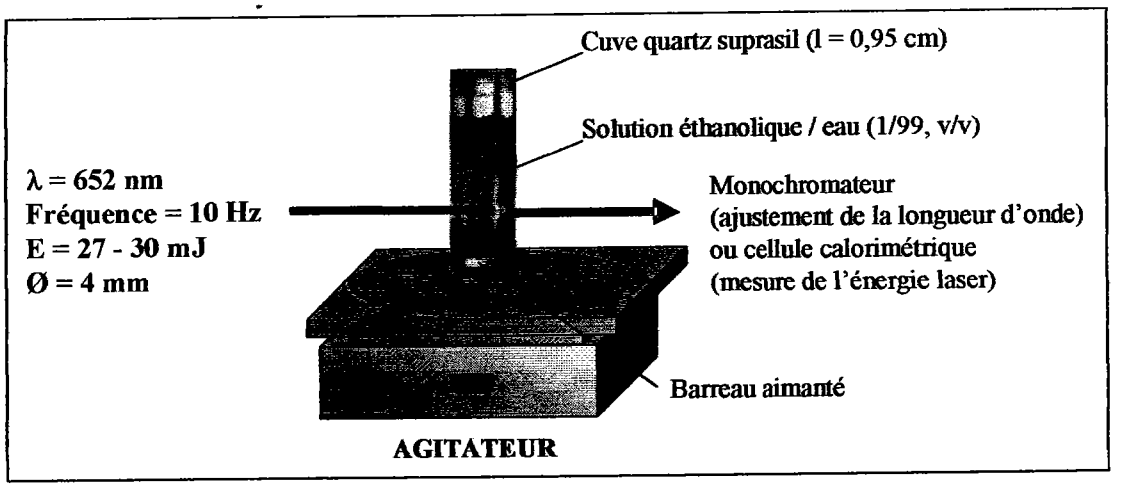


Figure II. 34. Montage expérimenta concernant l'illumination laser des solutions de Foscan® et/ou de DPBF (éthanol/eau, 1/99, v/v)

La source de lumière utilisée est un laser pulsé à colorant, TDL 50 (Quantel, Les Ulis, France), dont le pompage est effectué par la seconde harmonique λ = 532 nm (durée d'impulsion = 10 ns, énergie de sortie = 400 mJ) d'un laser Nd-YAG (λ = 1064 nm). Ce laser fonctionne avec un colorant organique, le DCM (4-dicyanométhylène-2-méthyl-6-(p-diméthyl-aminostyryl)-4H-pyrane), afin de générer un rayonnement ayant pour longueurs d'onde 652 nm (Exciton, Optilas, France). Les solutions de photosensibilisateurs ont été irradiées à une puissance laser de 270 et 300 mW et à une fréquence de 10 Hz ce qui correspond à une énergie de 27 et 30 mJ, correspondant aux valeurs d'irradiance de 2. 10^{-7} et 3.10^{-7} W/cm².

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 mesurons la puissance laser à l'aide d'une cellule de mesure d'énergie et la longueur d'onde à l'aide d'un monochromateur.

4.2.2. Protocole d'illumination laser des monocouches cellulaires

Afin d'effectuer un traitement photodynamique au niveau cellulaire, nous avons procéder dans un premier temps, à l'ensemencement de cellules HT29 et MCF7. Au bout de quatre jours, celles-ci se sont développées sous forme d'une monocouche (monocouche adhérente à un support de verre amovible destiné à être fixé sur notre plaque d'échantillonnage MALDI). A cet instant, nous avons procédé l'imprégnation de celles-ci à partir de solutions de nos composés (Foscan®, DPBF, o-BB) (Figure II.35.).

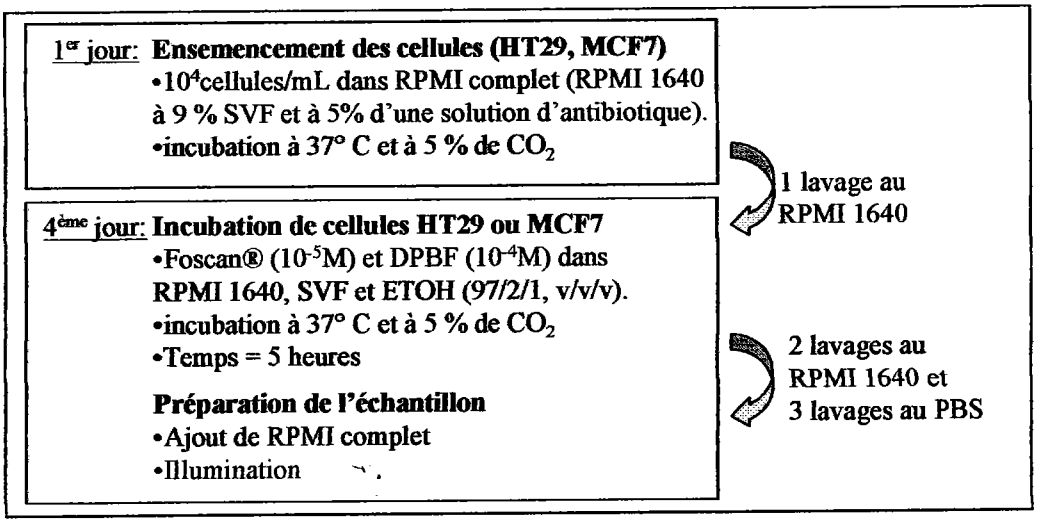


Figure II. 35. Etapes de la culture cellulaire conduisant à l'illumination laser des monocouches cellulaires de HT29 et MCF7.

Afin d'étudier les effets de la thérapie photodynamique sur la distribution des protéines cellulaires, nous avons eu recours à "plate-forme laser" constituée d'un laser ARGON continu, BEAM LOCK (Spectra-Physics), Puissance max 25W lumière en mode toute raies, agissant en tant que laser de pompe d'un colorant Kyton Red. Le colorant circule perpendiculairement à l'axe du faisceau laser Argon à l'entrée d'un boitier optique Dye Laser (Spectra-Physics) réglé à la longueur d'onde d'émission de 652 nm.

Une fibre optique silice/silice de diamètre de coeur de 200 micromètres (SEDI), longueur 15m, est montée en sortie du boîtier optique colorant et reliée à un diffuseur frontal (MEDLIGHT) qui distribue la lumière sur la surface à traiter de façon homogène selon le montage visible ci-dessous (Figure II.36.).

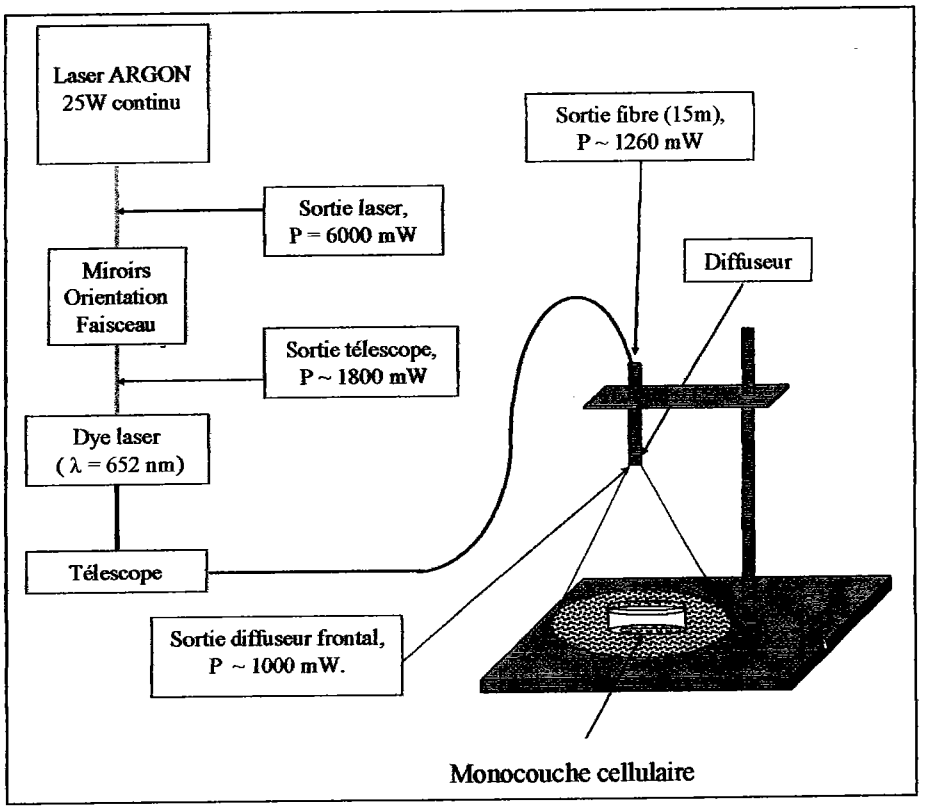


Figure II. 36. Schéma du montage permettant l'illumination de surfaces planes tel que les monocouches cellulaires

Ces irradiations ont été effectuées au sein du Centre Alexis Vautrin (Vandoeuvre-lès-nancy, 54). Le dispositif présenté ci-dessus (Figure II.36.) permet de faire varier l'aire d'irradiation et donc de traiter plusieurs échantillons à la fois. Dans le cadre des études menées sur les cellules, deux protocoles d'illumination ont été employés (Tableau II. 4.).

	Irradiance (mW/cm^2)	Temps d'irradiation (s)	Fluence (J/cm^2)
Illumination 1 (génération $^1O_2$)	4	2400	9,6
Illumination 2 (paramètres "cliniques")	2,12	45	0,095

Tableau II. 4. Protocoles d'illumination laser des monocouches cellulaires HT29et MCF7

Le premier dans le but de mettre en évidence la formation d'oxygène moléculaire singulet dans le milieu cellulaire ; le second est basé sur la dosimétrie "clinique" (dosimétrie du Centre Alexis Vautrin, conduisant à la mort complète des cellules au bout d'un délai de 10 jours) afin de mettre en évidence la réponse des cellules après traitement photodynamique. Le second protocole s'inscrivant dans le cadre des études protéomique développé dans le chapitre IV.

Chapitre III

- L'oxygène moléculaire singulet -
Etude par MALDI-TOF/MS de la production *in situ* d'oxygène moléculaire singulet en milieu aqueux et en milieu cellulaire

TABLE DES MATIERES

1. Oxygène moléculaire singulet – historique 141

2. Etats électronique de l'oxygène 142

3. Production et durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet 146

3.1. Formation de l'oxygène moléculaire singulet 146

3.1.1. La production d'oxygène moléculaire singulet par voie chimique 146

3.1.2. Production d'oxygène moléculaire singulet par décomposition de l'ozone 148

3.1.3. Production d'oxygène moléculaire singulet par décharge électrique 149

3.1.4. Production d'oxygène moléculaire singulet par excitation directe 149

3.2. Durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet. 150

4. Réactions caractéristiques de l'oxygène moléculaire singulet 153

4.1. Cycloaddition [2+4] : formation d'endoperoxyde 153

5. Techniques de mise en évidence de l'oxygène moléculaire singulet .. 156

6. Etude de la sonde 1,3-DiphénylisoBenzoFurane (DPBF) par MALDI-TOF/MS 161

7. Etude par microscopie à épifluorescence 176

8. Etude par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS de l'internalisation de la sonde DPBF au sein de cellules HT29 181

9. Mise en évidence de l'oxygène moléculaire singulet au sein de cellules intactes HT29 par spectrométrie de masse. 186

10. Conclusion 193

Chapitre III

L'oxygène moléculaire singulet
Etude par MALDI-TOF/MS de la production *in situ* d'oxygène moléculaire singulet en milieu aqueux et en milieu cellulaire

Dans la première partie de ce chapitre, nous allons aborder les propriétés physico-chimiques de l'oxygène moléculaire singulet et présenter les différentes techniques standard de formation et de détection de celui-ci. Puis, nous allons nous appuyer sur ces éléments afin d'établir une méthodologie dans l'optique de mettre en évidence cette espèce via la spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS. Cette étude étant mené dans le cadre de la thérapie photodynamique (PDT), le photosensibilisateur Foscan® sera utilisé comme générateur d'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$. La seconde partie de ce chapitre sera destinée quant à elle aux résultats concernant la mise en évidence de l'oxygène moléculaire singulet généré en solution.

Pour finir, nous développerons et discuterons les résultats relatifs à la détection in situ de l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ au sein de cellules entières directement analysées par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS

1. Oxygène moléculaire singulet – historique

Bien que les premiers rapports concernant les effets photodynamiques datent du début du siècle, l'oxygène moléculaire singulet n'a été mis en évidence qu'en 1924. Cette découverte a été faite par des astrophysiciens, l'espèce découverte fut considérée comme espèce excitée rare. Dès 1930, Kautsky[1] suggéra que l'intermédiaire réactif des photooxydations sensibilisées par Chlorophylle lors de la photosynthèse pourrait être une espèce activée métastable de l'oxygène moléculaire.

(1) H. Kautsky *Naturwiss.* **1931**, *19*, 1043.

En effet, la diffusion de l'espèce oxydante était nécessaire pour expliquer la photooxydation. Cette hypothèse fut rejetée par ses contemporains et on considéra que l'intermédiaire réactif était un complexe sensibilisateur-oxygène[2,3].

En 1963, les travaux de Khan et Kasha [4] sur la chimiluminescence de la réaction de l'eau oxygénée avec l'hypochlorite de sodium, permirent l'attribution des bandes d'émissions observée à l'oxygène moléculaire métastable. A la même époque, Foote et Wexler[4] montrèrent, que le système eau oxygénée / hypochlorite de sodium conduisait au même produits d'oxydation que la photooxydation sensibilisée. La même distribution de produit fut également observée après oxydation par l'oxygène excité à l'aide d'une décharge électrique. Ces travaux démontrèrent que la même espèce était responsable de ces réactions, et apportèrent d'importants arguments en faveur de l'oxygène moléculaire singulet au cours des photooxydations sensibilisées en solution.

Depuis des centaines de travaux sur l'oxygène moléculaire singulet sont annuellement publiés dans les domaines les plus divers : Chimie[5], polymères[6], biochimie[7], spectrométrie et photothérapie[8]. L'utilisation de l'oxygène moléculaire singulet comme agent de synthèse a également été introduit au stade industriel ; sa production atteignant actuellement plusieurs tonnes par an[9].

2. Etats électronique de l'oxygène

La configuration électronique obtenue pour l'atome d'oxygène est notée $1s^2\ 2s^2\ 2p^4$ correspondant à [He] $2s^2\ 2p^4$. A partir de cette configuration initiale, il est possible d'établir le diagramme des orbitales moléculaires de l'état fondamental (Etat triplet $^3\Sigma_g^-$) de l'oxygène (Figure III.1.). Cette configuration est la suivante $(1\sigma_g)^2\ (1\sigma_u)^2\ (2\sigma_g)^2\ (2\sigma_u)^2\ (3\sigma_g)^2\ (1\pi_u)^4\ (1\pi_g)^2$.

---

2 (2) A. Schönberg *Liebigs Ann. Chem.* **1935**, *518*, 299.
3 (3) G. O. Schenk *Naturwiss.* **1948**, *35*, 28.
4 (5) Foote et Wexler, a. *J. Amer. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3880.
5 (6) E. L. Clennan; A. Pace *Tetrahedron* **2005**, *61*, 6665-6691.
6 (7) R. D. Scurlock; M. Kristiansen *Polymer Degradation and Stability* **1998**, *60*, 145-159.
7 (8) Yu Wenli and Zhao Yaping *Biochimica et Biophysica Acta (BBA), General Subjects* **2005**, *1725*, 30-34.
8 (9) E. Zenkevich; E. Sagun; V. Knyukshto; A. Shulga; A. Mironov; O. Efremova; R. Bonnett; Songca, S. P.; Kassem, M. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **1996**, *33*, 171-180.
9 (10) G. Ohloff *conférence, VIIIème symposium IUPAC de Photochimie, Seefeld, Autriche* **1980**.

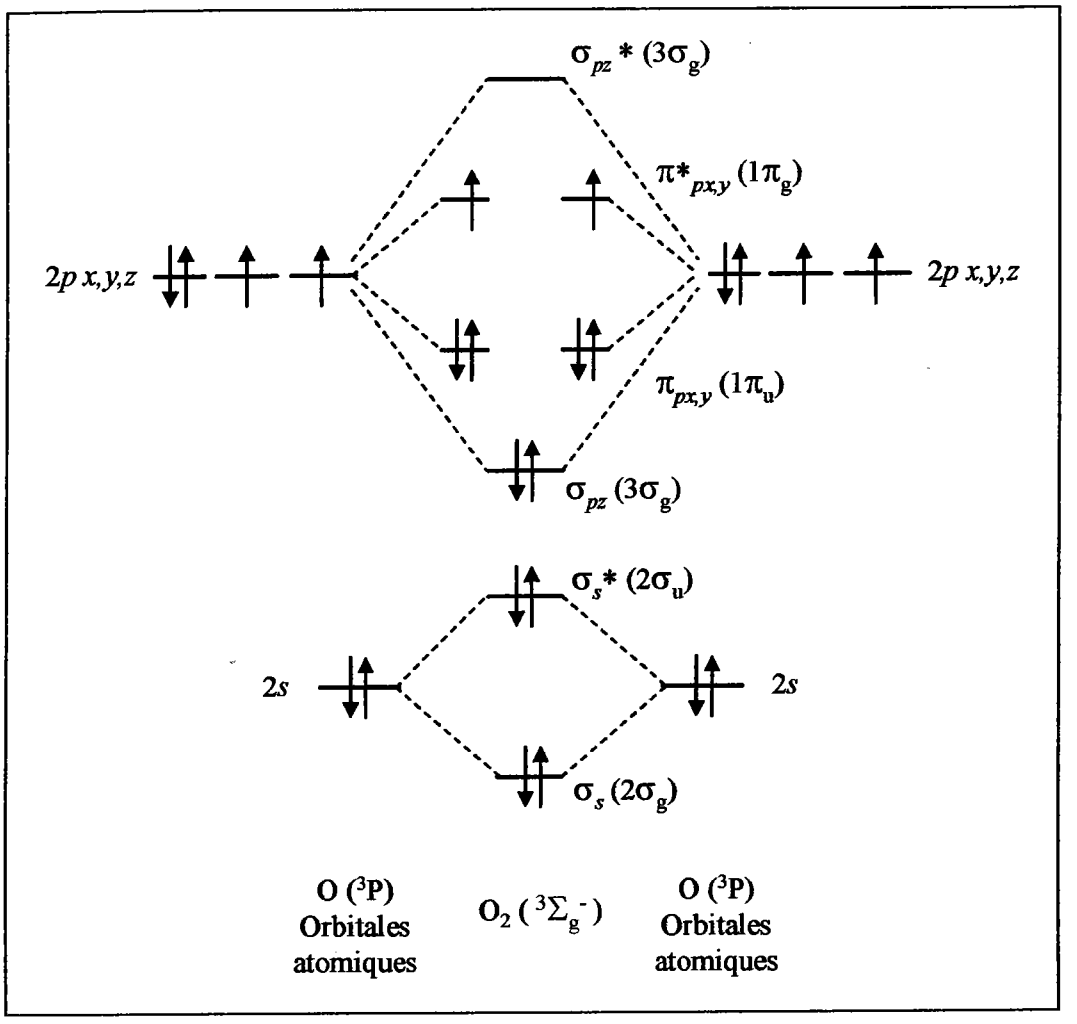


Figure III. 1. Configuration électronique des orbitales de l'oxygène moléculaire à l'état fondamental ($^3\Sigma_g^-$).

Les deux premiers états excités de l'oxygène moléculaire sont des états singulets (Figure III.2.), les deux électrons de l'orbitale $^1\pi_g$ ayant leurs spins opposés. La différence d'énergie entre l'état fondamental ($^3\Sigma_g^-$) et le premier état excité ($^1\Delta_g$) est de 94,2 kJ/mol. Les deux spins étant couplés, la représentation de cet état excité se traduit par un Δ. De plus cette configuration permet d'obtenir un niveau énergétique plus faible que le second état excité. En effet, la différence entre le second état singulet ($^1\Sigma_g^+$) et l'état triplet fondamental ($^3\Sigma_g^-$) est de 156,9 kJ/mol.

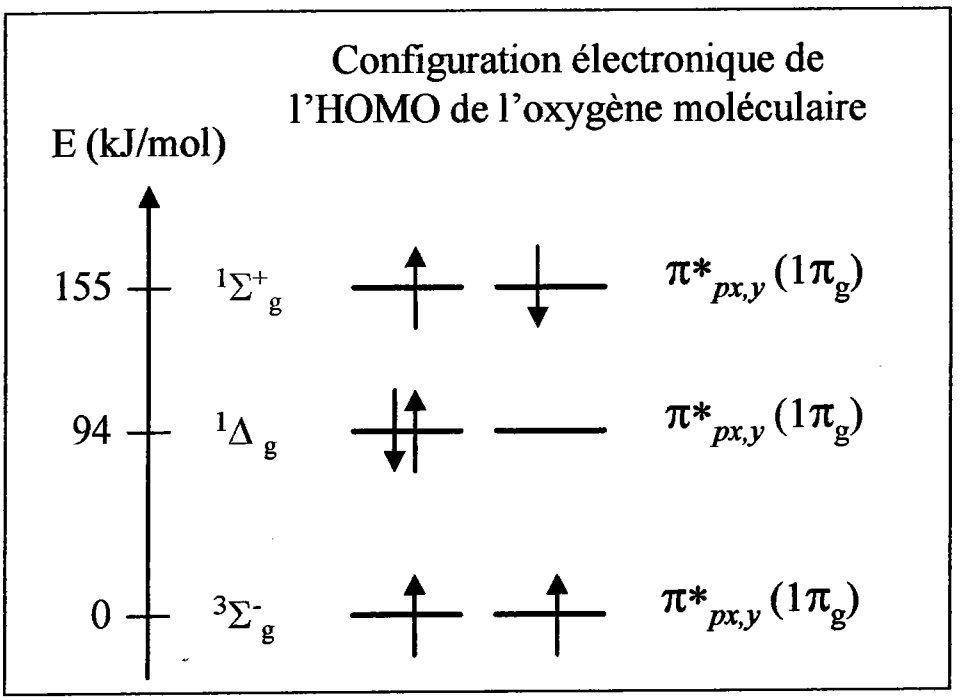


Figure III. 2. Représentation simplifiée de l'occupation électronique des orbitales $1\pi_g$ dans l'état fondamental ($^3\Sigma_g^-$) et dans les deux premiers états excités ($^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$) de l'oxygène moléculaire. Les électrons se situent sur la plus haute orbitale moléculaire occupée (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO)

La transition entre l'état fondamental triplet et les états excités singulets sont des transitions interdites en ce qui concerne le spin. Par conséquent, les coefficients d'absorption de l'oxygène sont très faibles et la production d'oxygène moléculaire singulet par excitation directe n'est possible que dans certaines conditions[10]. Les états excités singulets obtenus par cette voie directe sont $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$, mais il en existe bien d'autres. En effet, au début des années 70, les travaux menés par Khan et Kasha[11] relatent de nombreux états singulet de l'oxygène dont les transitions électroniques entre les états excités singulets et l'état fondamental triplet sont indiqués sur la figure III.3..

[10] (11) D.F. Evans; J.N. Tucker *J. Chem. Soc., Farad. Trans. II* **1976**, *9*, 1661.
[11] (12) A. U. Khan; M. Kasha *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3293.

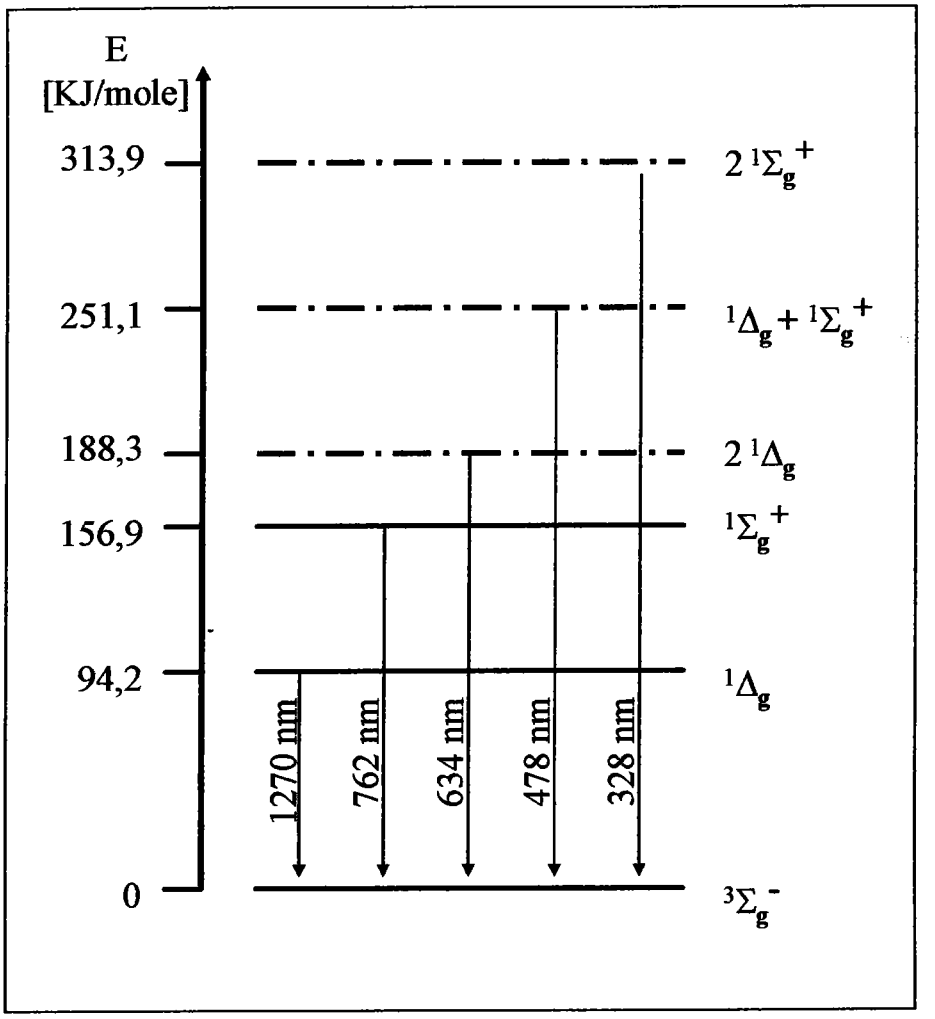


Figure III. 3. Transitions électroniques (émission) entre les états excités singulets et l'état fondamental triplet de l'oxygène moléculaire. Les niveaux vibrationnels pour chaque état sont égaux à 0.

Les émissions radiatives sont alors désignés selon deux critères :

- l'une qualifiée d'émission monomolaire (λ = 762 et 1270 nm), résultant de la transition de l'état singulet à l'état triplet. L'émission émise lors de cette transition étant considéré comme caractéristique de l'oxygène moléculaire singulet. Concernant la transmission de ($^1\Delta_g$) vers ($^3\Sigma_g^-$), la longueur d'onde caractéristique à 1270 nm fut observée pour la première fois par Krasnovsky, lors de l'étude spectroscopique d'une solution de protoporphyrine soumisse à une illumination. L'acquisition du spectre infrarouge s'étant faite à l'aide d'un arrangement de photomultiplicateurs modifiés[12].

[12] (13) Krasnovsky Jr. *Biofisika (Russie)* **1976**, *21*, 748.

- la seconde émission est désignée par émission dimolaire (λ =313,9, 478 et 634 nm). Elle résulte de deux transitions électroniques consécutives à la formation d'un complexe obtenu par collision entre deux molécules excitées O_2. Le processus mis en œuvre est un processus de désexcitation à un photon qui est représenté de la façon suivante pour λ = 634 nm :

$$(^1\Delta_g)\,(^1\Delta_g) \rightarrow (^3\Sigma_g^-)(^3\Sigma_g^-)$$

C'est le même type de processus pour λ =313,9 nm et λ = 478 nm.

3. Production et durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet

3.1. Formation de l'oxygène moléculaire singulet

3.1.1. La production d'oxygène moléculaire singulet par voie chimique

Parmi les diverses méthodes d'obtention de l'oxygène moléculaire singulet, la réaction de l'eau oxygéné H_2O_2 avec l'hypochlorite de sodium[13,14], a joué un rôle important dans le domaine de la chimie de l'oxygène moléculaire singulet.

$$H_2O_2 + NaOCl \xrightarrow{H_2O} {}^1O_2 + H_2O + NaCl$$

L'oxygène moléculaire singulet serait produit par décomposition de l'anion chlorohydroperoxy ($ClOO^-$) qui correspond à un composé intermédiaire de la réaction[14]. Le système eau oxygénée/hypochlorite de sodium permet d'effectuer des réactions à l'échelle préparative en phase aqueuse. Ainsi, par addition d'hypochlorite de sodium à des solutions alcalines d'alcools contenant le réactif à oxyder et l'eau oxygénées en excès, des rendements élevés en produits ont été obtenus (jusqu'à 80%)[15]. Cependant, des problèmes de solubilité peuvent se poser, particulièrement dans le cas de composés peu réactifs qui doivent être utilisés en concentration importante, et des réactions indésirables sont susceptibles de se produire avec l'eau oxygénée en milieu alcalin.

---

13 (4) Khan et Kasha *J. Chem. Phys.* **1963**, *39*, 2105.
14 (12) A. U. Khan; M. Kasha *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3293.
15 (5) Foote et Wexler, a. *J. Amer. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3880.

Les travaux de Foote et Wexler ont mis en avant l'oxygène moléculaire singulet comme étant un intermédiaire actif des phénomènes d'oxydations. La preuve de son intervention est apportée lors d'études menées sur des anthracènes, lesquels jouent un rôle de générateur et d'accepteur d'oxygène moléculaire singulet[16] (Figure III.4.).

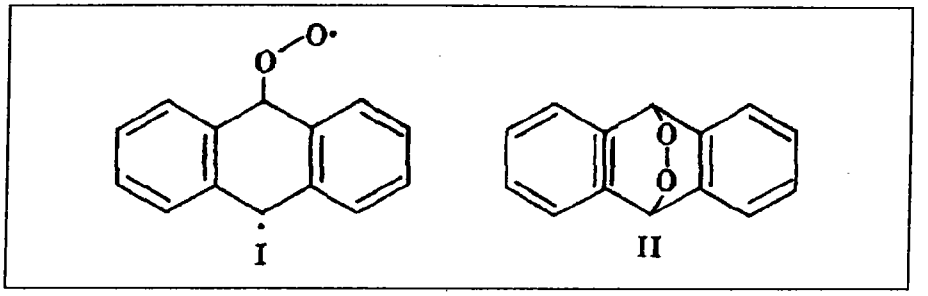
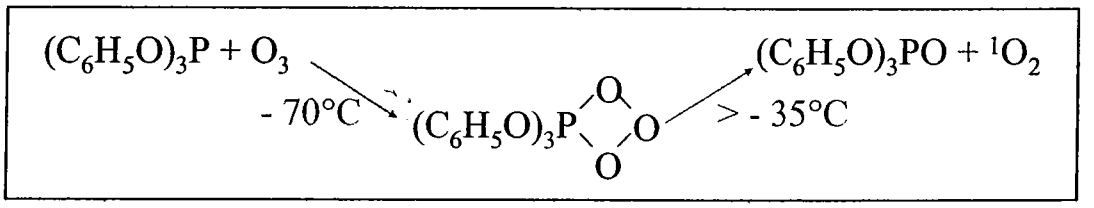


Figure III. 4. Anthracène destiné à la génération (I) et au piégeage d'oxygène moléculaire singulet (II)[17]

Les études cinétiques ont révélé que l'évolution du composé (I) vers le composé (II) n'était pas concevable, mais qu'une première molécule d'anthracène (I) doit réagir avec l'oxygène (après irradiation laser) afin de former un intermédiaire réactif permettant d'aboutir à la seconde structure endoperoxyde (II).

Les travaux de Murray et Kaplan ont fait apparaître que la décomposition thermique de phosphitozonides, préparée par réaction de triaryl ou trialkyl phosphites en présence d'ozone, à basse température, produit également de l'oxygène moléculaire singulet[18].



Un transfert direct d'oxygène entre le triphényl phosphitozonide et des composés très réactifs intervient parallèlement à la production d'oxygène moléculaire singulet[19], la difficulté de séparation du phosphate formé constituant un inconvénient à cette méthode.

---

16 (5) Foote et Wexler, a. *J. Amer. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3880.
17 (5) Foote et Wexler, a. *J. Amer. Chem. Soc.* **1964**, *86*, 3880.
18 (15) Murray; Kaplan *J. Chem. Phys.* **1968**, *90*.
19 (16) Bartlett; Mendenhall *J. Chem. Phys.* **1970**, *92*.

Fin des années 60, les travaux de Wassermann[20] ont mis en évidence la production d'oxygène moléculaire singulet par décomposition thermique.

En effet, La réaction de génération d'endoperoxydes par photooxydation sensibilisée est une réaction qui peut être réversible. Ainsi certains endoperoxydes, obtenus à basse température sont décomposés suite à un traitement thermique (Figure III.5.).

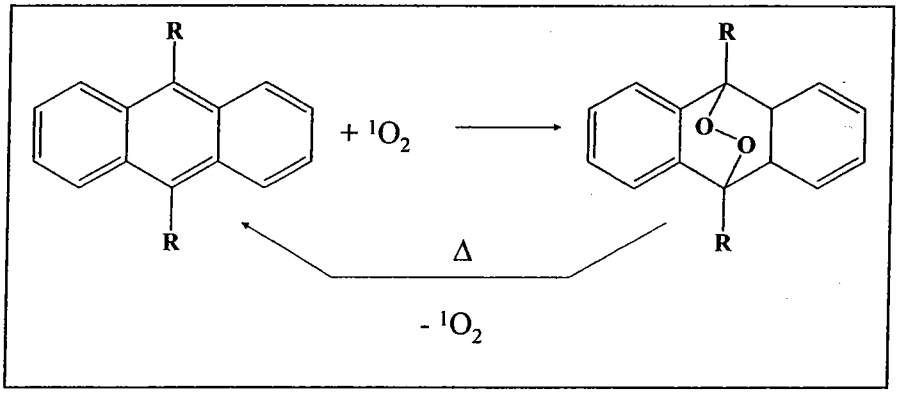


Figure III. 5. Génération d'oxygène moléculaire singulet par décomposition thermique d'endoperoxyde

Des études par chimiluminescence concernant la dégradation thermique de certains anthracènes ont révélé des productions en oxygène moléculaire singulet allant jusqu'à de 95%[21].

3.1.2. Production d'oxygène moléculaire singulet par décomposition de l'ozone

Une autre méthode d'obtention d'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$) est la photolyse de l'ozone. Cette réaction est basée sur la décomposition de l'ozone par irradiation ultraviolette (λ = à 253,7 nm). Cependant, en raison de la très grande réactivité de l'ozone avec de nombreuses molécules organiques, il faut utiliser avec beaucoup de prudence cette méthode comme source d'oxygène moléculaire singulet[22].

---

20 (17) Wassermann; Scheffer *J. Am. Chem.* **1967**, *89*.

21 (18) Turro; Chow; Rigaudy *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 1300-1302.

22 (19) Jones; Wayne *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, athematical and Physical Sciences* **1970**, *319*, 273-287.

3.1.3. Production d'oxygène moléculaire singulet par décharge électrique

Cette méthode physique de production d'oxygène moléculaire singulet consiste à produire un plasma d'oxygène, en envoyant un flux d'oxygène à pression réduite (quelques Torrs) dans une décharge électrique[23]. La pression de l'oxygène doit être faible afin d'éviter la formation d'ozone. Par ce procédé le rendement d'oxygène moléculaire singulet $^1\Delta_g$ est de 5 à 20%. De l'oxygène atomique est également produit à hauteur de 10 à 20%.

3.1.4. Production d'oxygène moléculaire singulet par excitation directe

L'oxygène sous forme gazeuse et liquide présente une série de bandes d'absorption que ce soit dans l'ultraviolet (λ = 382 et 478 nm), le visible (λ = 580, 634, 703, 762 et 770nm) ou l'infrarouge (λ = 865, 1070, 1270 et 1580nm)[24]. Il est possible de produire des états singulets ($^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g$) par excitation directe de l'oxygène, comme indiqué dans les travaux de Evans et Tucker[25]. A l'aide d'un laser Hélium-Néon délivrant une longueur d'onde de 632,8 nm, l'état excité singulet $^1\Delta_g$ fut obtenu dans du trichloro-1,1,2 trifluoro-1,2,2 éthane, la longueur d'onde 632,8 nm étant très proche de la bande d'absorption due à la transition : O_2 ($^3\Sigma_g^-$) $\rightarrow O_2\ 2(^1\Delta_g)$[26]. À l'identique l'utilisation d'un laser néodyme YAG (λ = 1064 nm) induisant la transition entre O_2 ($^3\Sigma_g^-$) et O_2 ($^1\Delta_g$) a permis d'aboutir au même état excité singulet ($^1\Delta_g$). De même l'utilisation d'une lampe à iode associé à des jeux de filtre a conduit à la sélection de longueurs d'ondes spécifiques (λ = 580, 760 et 1270 nm) conduisant à la formation d'état excité singulet $^1\Sigma_g^+$ et $^1\Delta_g$.

Récemment, une étude publiée en 2004 par A.A. Krasnovsky Jr[27] met en avant ce mode de génération directe dans le cadre d'études liées à la photooxydation d'une sonde spécifique à oxygène moléculaire singulet, le tétracène (Figure III.6.).

---

23 (20) J.L. Dumas; B. Garnier *J. Chem. Phys.* **1975**, *72*, 1045.
24 (12) A. U. Khan; M. Kasha *J. Am. Chem. Soc.* **1970**, *92*, 3293.
25 (11) D.F. Evans; J.N. Tucker *J. Chem. Soc., Farad. Trans. II* **1976**, *9*, 1661.
26 (21) I. B. C. Matheson; J. Lee *Chemical Physics Letters* **1974**, *27*, 355-358.
27 (22) A.A. Krasnovsky *Chemical Physics Letters* **2004**, *400*, 531–535.

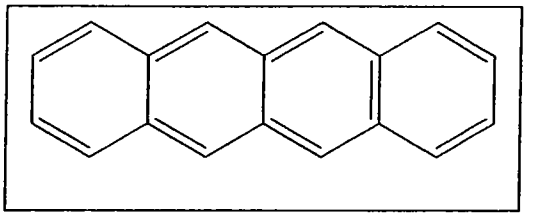


Figure III. 6. Structure du tétracène

3.2. Durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet.

Les durées de vie des états $1\Sigma^+_g$ et $1\Delta_g$ sont relativement longues car les transitions électroniques qui provoquent la désactivation des états excités singulets de l'oxygène sont des transitions interdites en ce qui concerne le spin.

En phase gazeuse (P < 1 atmosphère), la durée de vie de l'état $^1\Delta_g$ avoisine les 45 - 64 minutes[28], celle de l'état $1\Sigma^+_g$, 7 à 12 secondes. La durée de vie plus courte de $^1\Sigma^+_g$, en comparaison à $^1\Delta_g$, est due à l'existence d'une transition permise (avec conversion du spin) de $^1\Sigma^+_g$ vers $^1\Delta_g$.

En 2004, des travaux ont montré la formation de O_2 ($^1\Delta_g$) généré en phase gazeuse à pression atmosphérique par illumination laser (1065 nm, transition O_2 ($^3\Sigma_g^-$, niveau vibrationnel $v = 0$) → O_2 ($^1\Delta_g$, niveau vibrationnel $v = 1$). La durée de vie de l'état singulet est dans ce cas de 0.124 ± 0.012 s[29].

En solution, la durée de vie des états excités chute de manière drastique ; l'état $^1\Sigma^+_g$ subsiste durant 1 ns tandis que l'état $^1\Delta_g$ se maintient sur une gamme allant de 2 µs (pour l'eau) à 3600 µs (pour le chloroforme-d_1 deutéré) selon le solvant utilisé comme nous pouvons le voir dans le tableau ci-dessous (Tableau III.1.).

[28] (23) C. Schweitzer; R. Schmidt *Chem. Rev.* **2003**, *103*, 1685-1757.

[29] (24) W. C. Eisenberg; A.Snelson; R. Butler; K. Taylor; R. W. Murray *Journal of Photochemistry* **1984**, *25*, 439-448.

Solvant	Durée de vie (µs)	
eau	2 - 7	A. A. Krasnovsky Jr., Chem. Phys. Letter, Vol. 81, 1981
méthanol	7	A. A. Krasnovsky Jr., Chem. Phys. Letter, Vol. 81, 1981
éthanol	10 - 15	M. A. J. Rodgers, J. Am. Chem. Soc., Vol 105, 1983
acétone	34 - 65	P. R. Ogilby, C. R. Foote, J. Am. Chem. Soc., Vol 105, 1983
acétonitrile	54 - 69	P. R. Ogilby, C. R. Foote, J. Am. Chem. Soc., Vol 104, 1982
deutérium	20 - 70	M. A. J. Rodgers, J. Am. Chem. Soc., Vol 104, 1982
Chloroforme	60 - 165	T. A. Jenny, N. J. Turro, Tetrahedron Lett., No. 29, 1982
Chloroforme-d_1	340 – 600	T. A. Jenny, N. J. Turro, Tetrahedron Lett., No. 29, 1982
Trichloro-trifluoroéthane	42000	T. A. Jenny, N. J. Turro, Tetrahedron Lett., No. 29, 1982

Tableau III. 1. Durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) selon le solvant

De récents travaux suggèrent la désactivation de O_2 à l'état $^1\Sigma^+_g$ par collision avec les molécules du solvant pour donner $^1\Delta_g$ [30]. Au vue de la durée de vie de $^1\Sigma^+_g$ (de l'ordre de 1 ns), seul l'état excités singulet $^1\Delta_g$ peur être considéré comme étant l'intermédiaire réactif dans la photooxydation des composés organiques en solution.

Comme nous avons pu le voir, la durée de vie de l'état singulet ($^1\Delta_g$) était fortement influencée par le solvant employé. En effet, ($^1\Delta_g$) voit sa durée d'existence augmentée notamment dans les solvants deutérés et plus particulièrement ceux perfluorés[31]. Ce n'est qu'en 1971, que Merkel et Kearns[32] mirent en évidence la relation entre la durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet et l'absorption infrarouge du milieu de solvatation. Hélas, celle-ci n'étant pas applicable à tous les solvants, il a fallu attendre les travaux de Rodgers[33] afin d'obtenir une formulation permettant d'aboutir des valeurs calculées en accords avec les valeurs expérimentales.

Ces travaux ont reposés sur la mesure des constantes de vitesse de désactivation de l'oxygène moléculaire singulet (K_d) dans une série d'alcanes et d'alcool linéaires. L'hypothèse émise était que la désactivation non radiative de l'oxygène moléculaire singulet est provoquée par des collisions avec les molécules du solvant. La relation qui émane de cette réflexion se traduit par :

30 (25) R. Schmidt; M. Bodesheim *J. Phys. Chem. A,* **1998**, *102*, 4769 -4774.
31 (26) T. A. Jenny; N. J. Turro *Tetrahedron Lett.* **1982**, *23*, 2923-2926.
32 (27) Merkel; Kearns *J, Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 7244.
33 (28) M. A. J. Rodgers *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*.

$$K_d = \frac{10^6}{\tau} = K_\Delta[solvant]$$

Avec :

K_d : constante de vitesse de désactivation de l'oxygène moléculaire singulet,

τ : durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$) dans le solvant considéré (μs),

K_Δ : constante de vitesse de bimoléculaire de désactivation par les molécules du solvant ($mole^{-1}.L.s^{-1}$)

[solvant] : molarité du solvant ($mole^{-1}.L$)

Une corrélation additive a pu être établie entre la valeur de K_Δ et les groupements tels que CH, CH_2, CH_3, OH des molécules de solvant aboutissant à des τ calculés en accord avec les τ expérimentaux (Tableau III.2.).

solvent	experiment k_Δ $(\tau_\Delta)^{a,b}$	calculated k_Δ $(\tau_\Delta)^{a,b}$
2-propanol	3480 (22.1)	
2-butanol	4710 (19.7)	4290 (21.4)
2-methyl-1-propanol	4340 (21.1)	4290 (21.4)
2-methyl-2-propanol	3040 (30.8)	3940 (23.7)
2,4,4-trimethylpentanol	6550 (24.2)	6200 (25.6)
cyclohexanol	6890 (15.1)	6450 (16.1)
ethylene glycol	7410 (7.5)	6210 (9.0)
methanol	3890 (10.4)	2840 (14.3)
1,4-dioxane	3210 (26.7)	3252 (26.3)
diethyl ether	3430 (30.4)	2730 (38.2)
tert-butyl methyl ether	3420 (34.8)	2200 (54.1)
isooctane	4360 (37.6)	3650 (44.9)
3-methylpentane	4010 (32.4)	3370 (38.5)
cyclohexane	4690 (23.0)	4880 (22.0)
methylene chloride	780 (82.9)	810 (79.1)
1,2-dichloroethane	1270 (63.2)	1630 (49.1)
acetone	1460 (50.5)	1200 (61.3)
acetonitrile	890 (58.3)	620 (84.0)
H_2O	4300 (4.2)	4580 (3.9)

[a] Units are M^{-1} s^{-1} (μs). [b] This work.

Tableau III. 2. Tableau récapitulatif des valeurs des durées de vie expérimentales et calculées de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$), tableau extrait des travaux de M.A.J. Rodgers[34])

[34] (28) M. A. J. Rodgers *J. Am. Chem. Soc.* **1982**, *104*.

Après cette discussion sur les différents modes de formation d'oxygène moléculaire singulet, nous allons à présent aborder les réactions caractéristiques de $^1O_2$ avec des "pièges" moléculaires spécifiques avant d'aborder les techniques standards de mise en évidence de $^1O_2$.

4. Réactions caractéristiques de l'oxygène moléculaire singulet

4.1. Cycloaddition [2+4] : formation d'endoperoxyde

Parmi les très nombreuses réactions de l'oxygène moléculaire singulet avec les composés organiques, les plus importantes sont les réactions avec les alcènes, les diènes et les composés aromatiques. En effet, les électrons de l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ ($^1\Delta_g$), qui est réactif en solution, sont appariés. En conséquence, la plupart des réactions de l'oxygène moléculaire singulet sont des réactions à deux électrons notamment la cycloaddition [4+2] de type Diels-Alder conduisant à la formation d'endoperoxydes[35] (Figure III.7.)

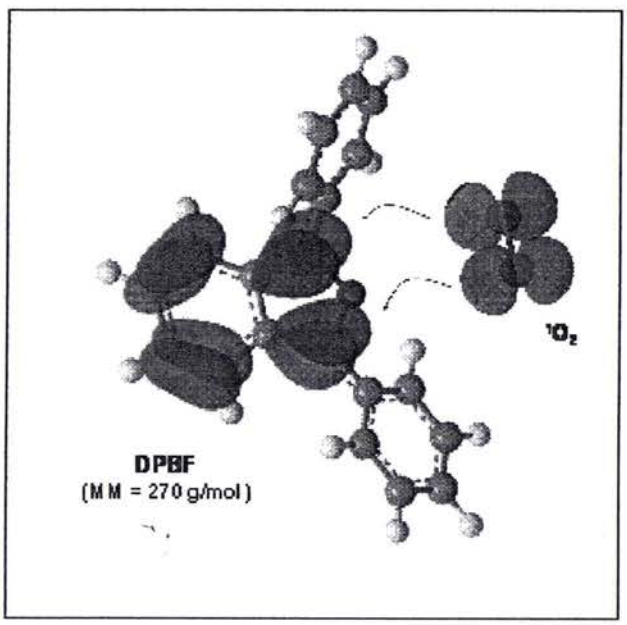


Figure III. 7. Représentation moléculaire du processus de cycloaddition [4+2] de type Diels-Alder entre le 1,3-diphénylisobenzofurane et l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ effectué à l'aide du logiciel Mopac MS.

[35] (29) A. M. Braun; M-T. Maurette; E. Oliveros *Ed. Presses Polytechniques Romandes, Suisse* **1986**, 429-443.

Un très grand nombre d'hétérocycles réagissent également selon ce type de réaction. En effet, plusieurs dérivés sont utilisés comme sondes spécifiques de l'oxygène moléculaire singulet. Dans le cas du 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF), le composé réagit avec l'oxygène moléculaire singulet pour former un endoperoxyde instable avant de donner ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) stable[36] (Figure III.8.).

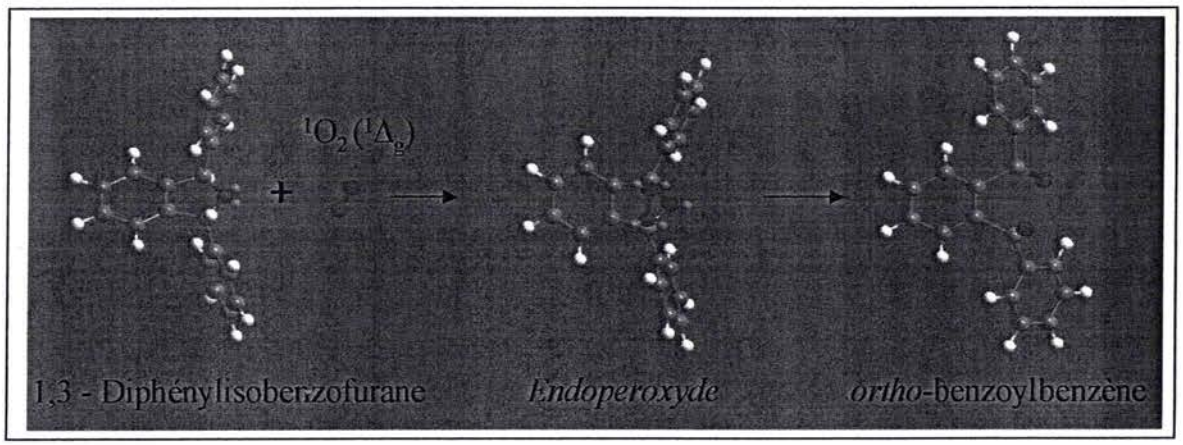


Figure III. 8. Formation d'ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) à partir de 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) ayant réagit avec de l'oxygène moléculaire singulet.

Dans la poursuite de nos travaux, nous aurons recours à ce composé afin de mettre en évidence l'oxygène moléculaire singulet *in situ* dans le milieu aqueux et cellulaire.

Les premiers essais effectués sur cellules basés sur la détection de l'oxygène moléculaire singulet au sein de cellules biologiques utilisant cette sonde spécifique comme "quencher" chimique de $^1O_2$ remonte à la fin des années 70. Lors de ces travaux, Dougherty[37] s'est intéressé au rôle de l'oxygène moléculaire singulet dans le cadre de l'inactivation *in vitro* de cellules TA-3 (cellules mammaires carcinomales de souris) après incorporation d'un agent photosensible (l'hematoporphyrin, 0,5 mg/ml) soumis à une illumination dans le rouge (λ = 610-630 nm, I = 1,3 mW/cm²). Son étude a révélé que l'incorporation concomitante de 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) préservait les cellules TA-3 de l'inactivation induite par PDT. Le suivi par spectrophotométrie mis en évidence la formation d'ortho-dibenzoylbenzène issu de la réaction entre le DPBF et l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$) indiquant que cet état excité singulet serait à l'origine de la toxicité dans le système biologique.

---

[36] (31) F. Amat-Guerri; E. Lempe; E. A. Lissi; F. J. Rodriguez; F. R. Trull *Journal of Photochem, and Photobiol. A: Chem.* **1996**, *93*, 49-56.

[37] (32) Weishaupt K.R.; Gomer C.J.; Dougherty T.J. *Cancer Research* **1976**, *36*, 2326-2329.

De plus fin des année 90, des travaux concernant la production d'oxygène moléculaire singulet par le Foscan® (5,10,15,20-tetrahydroxyphénylchlorine, m-THPC), ont 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[38]. Grâce à la mesure de l'absorbance du DPBF à 415 nm d'une solution éthanoïque 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 moléculaire singulet peut être généré à partir de la photosensibilisation de la *m*-THPC, la mise en évidence de l'oxygène moléculaire singulet s'étend faite au moyen d'un quencher physique, le 2,2,6,6-tétraméthyle-4-pipéridone (TEMP) combiné à la technique de la résonance paramagnétique électronique (EPR).

La haute sélectivité du DPBF envers l'oxygène moléculaire singulet (benzène à 25°C[39]: K_q = $7x10^8.M^{-1}.s^{-1}$; Méthanol[40] : K_q = $7x10^8.M^{-1}.s^{-1}$ à conduit certains chercheurs à développer des dérivés plus hydrophiles[41] afin de favoriser son emploi dans les milieux physiologiques.
De plus son rôle de "quencher" chimique est également utilisé dans l'évaluation de nouveaux photosensibilisateurs. Une étude publiée en mars 2006[42] montre son emploi dans l'évaluation de nouvelles porphyrines de synthèse dans le cadre la production d'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$). Lors d'un traitement PDT, le suivi de la transformation du DPBF permet d'estimer l'efficacité de chaque photosensibilisateur mettant en avant le choix de la meilleure structure synthétisée.

---

38 (33) C. Hadjur; N. Lange; J. Rebstein; P. Monnier; Bergh, H. v. d.; Wagnières, G. *Journal of Photoch. and Photobio. B: Bio.* **1998**, *45*, 170-178.

39 (34) B. Stevens *J, Am. Chem. Soc.* **1974**, *90*.

40 (27) Merkel; Kearns *J, Am. Chem. Soc.*, **1972**, *94*, 7244.

41 (31) F. Amat-Guerri; E. Lempe; E. A. Lissi; F. J. Rodriguez; F. R. Trull *Journal of Photochem, and Photobiol. A: Chem.* **1996**, *93*, 49-56.

42 (35) Q. Huang; Z. Pan; P. Wang; Z. Chen; X. Zhang; H. Xu *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2006**, *16*, 3030–3033.

5. Techniques de mise en évidence de l'oxygène moléculaire singulet

Diverses techniques sont employées pour détecter la présence de $^1O_2$, notamment:

1) La détection résolue dans le temps de la luminescence à 1270 nm de l'oxygène moléculaire singulet est une technique d'identification directe de celui-ci par chimiluminescence, établie en fin des années 1970[43]. L'étude est basée sur la détection du rayonnement infrarouge au moyen de photomultiplicateurs et d'une diode au germanium. Grâce à cette méthode $^1O_2$ a pu être détectée dans différents milieux tels que dans des solvants hydrocarbonés[44], à l'intérieur de membranes cellulaires, où l'oxygène $^1O_2$ fut obtenu par photosensibilisation[45] et depuis peu *in vivo* (souris)[46], notamment dans le cadre de la thérapie photodynamique afin d'établir une dosimétrie plus adéquate lors des traitements cliniques.

2) La résonance paramagnétique électronique (RPE)

L'électron a un mouvement de rotation sur lui-même caractérisé par le nombre quantique de spin ***S*** dont les valeurs propres ±1/2 correspondent aux deux orientations que peut prendre le spin dans un champ magnétique, l'une étant parallèle tandis que l'autre étant antiparallèle au champ. Deux niveaux énergétiques en résultent, niveaux entre lesquels des transitions peuvent être induites. Dans une molécule, les électrons s'apparient et leurs moments magnétiques s'annulent. Cependant, si le nombre d'électrons est impair, il existe un électron non apparié, c'est le cas des radicaux libres. Le but de la résonance paramagnétique électronique RPE est précisément d'étudier les transitions de cet électron.

Afin de détecter l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ par la résonance paramagnétique électronique l'utilisation de sondes spécifiques est recommandé (2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridinole (TMP-OH)).

Sur la figure III.9.[47] est représentée la formation de $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) à partir d'un dérivé du fullerène C60 se trouvant à l'état fondamental $^1S_0$. Le recours au 2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridinole (TMP-OH), composé diamagnétique capable de réagir avec $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) permet de donner un composé paramagnétique stable, le 2,2,6,6-4-pipéridone-N-oxyl (TEMPOL).

---

43 (13) Krasnovsky Jr. *Biofisika (Russie)* **1976**, *21*, 748.

44 (36) P. V. Nardello; S. Bogaert; P. L. Alsters; J.-M. Aubry *Tetrahedron Letters* **2002**, *43*, 8731-8734.

45 (37) I. Zebger; J.W. Snyder; L.K. Andersen *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*.

46 (38) M.J. Niedre *British Journal of Cancer* **2005**, *92*, 2292 - 2301.

47 (39) B. Vileno; A. Sienkiewicz; M. Lekka; A. J. Kulik ; L. Forro *Carbon 42* **2004**, 1195–1198.

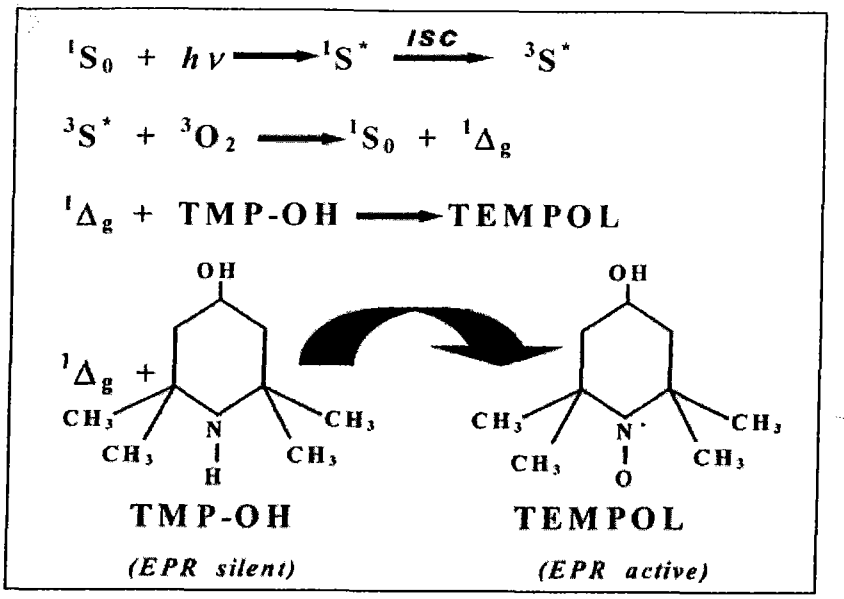


Figure III. 9. Génération de $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) à partir d'un fullerène, la réaction entre 2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridinole (TMP-OH) et $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) conduit à la formation d'un composé radicalaire le 2,2,6,6-4-pipéridone-N-oxyl (TEMPOL) détectable en RPE.

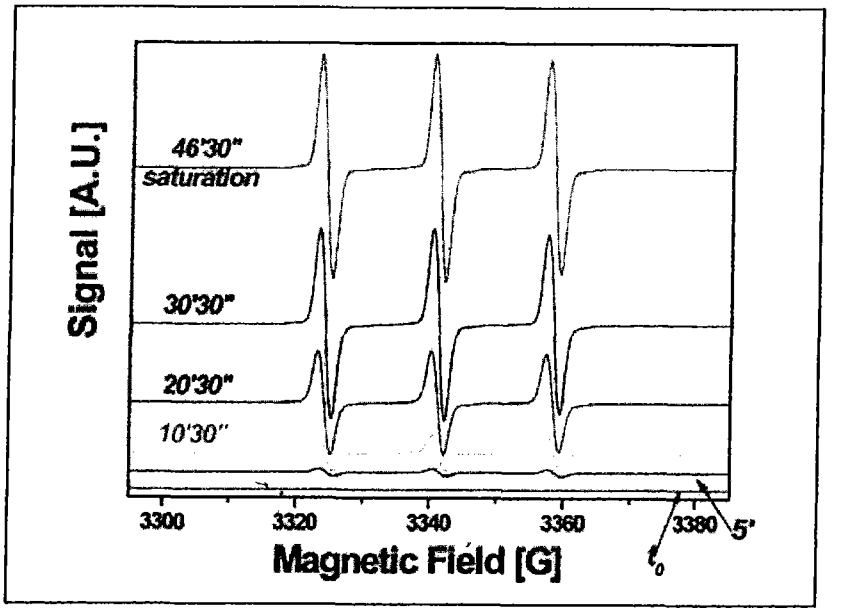


Figure III. 10. Spectre RPE, l'évolution du signal du TEMPOL (1 mM, dans D_2O) en fonction du temps de d'illumination du dérivée de fullerène C60 (axe des ordonnées). Le champ magnétique (axe des abscisses)est exprimé en gauss [G]

Comme nous pouvons le voir au niveau de la figure III.10., la technique RPE permet de visualiser l'augmentation du signal caractéristique du TEMPOL lors de l'illumination mettant en avant la génération de $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) suite à la réaction avec du dérivé de fullerène C60 (0,5mM) sur l'oxygène moléculaire fondamental $^3O_2$.

3) La méthode microcalorimétrique

Cette méthode repose sur la modification de l'enthalpie du milieu considéré. Schneider et Baptista[48] ont appliqué cette méthode pour la détection d'oxygène moléculaire singulet. La modification de l'enthalpie dans le système (Figure III.11.) repose sur la désactivation non radiative de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$). Lors de ce processus l'oxygène libère une certaine quantité de chaleur dans la phase aqueuse, ce gradient thermique conduisant à une modification de l'indice de réfraction dans la phase organique adjacente entraînant une déviation du faisceau laser qui la traverse.

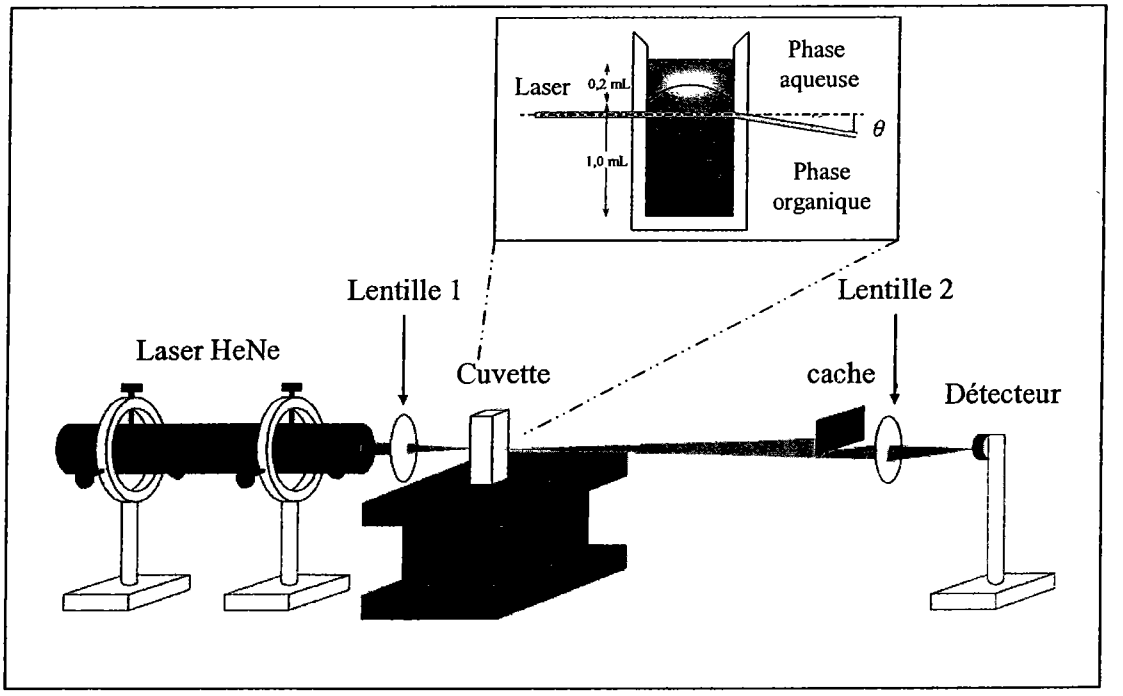


Figure III. 11. Méthode microcalorimétrique permettant de visualiser la désactivation non radiative de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$)[49]. Cette désactivation thermique (milieu aqueux) engendre une modification de l'indice de réflexion dans le milieu adjacent (organique) provoquant la déflexion du faisceau laser.

48 (40) Schneider T.; Gugliotti M.; Politi M.J.; Baptista M.S. *Analytical Letters* **2000**, *33*, 297-305.

49 (41) T. Schneider; M. J. Politi; M. S. Baptista *Journal of Chemical Education* **2002**, *79*.

Le montage est constitué d'un faisceau laser qui passe tout d'abord par une première lentille de focalisation puis par une cuve en quartz constitué de deux milieux l'un aqueux et l'autre organique au sein de laquelle la réaction a lieu. A la sortie de cette cuve, le laser rencontre un cache servant à "ajuster" l'énergie initiale détecté par le détecteur. Lors de la désactivation de $^1O_2$, l'indice des milieux va varié entraînant une déviation du le faisceau laser d'un angle θ, se traduisant par un déplacement du faisceau laser au niveau du cache. A l'aide de la seconde lentille le faisceau sera refocalisé. La mesure de l'énergie lors de la déviation permettant de mettre en évidence l'avancement de la réaction dans le milieu.

Afin de visualiser l'implication de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$) dans les différents milieux, le recours à certains composés est nécessaire. Ces composés sont connus sous le nom de "quencher" de l'anglais "quench" qui signifie éteindre. Ainsi le rôle de ces composés est d'éteindre, en d'autre terme d'inactiver la cible. Parmi les quenchers, ils en existent deux types ; les quenchers chimiques et les quenchers physiques. Le quenching chimique correspond à une interaction entre l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ et le quencher pour former un produit QO_2 tandis qu'un quencher physique conduit à la désactivation de $^1O_2$ en le ramenant à son état fondamental sans consommation de l'oxygène ou la formation de nouveaux produit. Le quenching par transfert d'énergie et le quenching par transfert de charge font partis des deux principaux mécanismes connus.

1) le quenching par transfert d'énergie est basé sur l'interaction de l'oxygène moléculaire à l'état singulet ($^1\Delta g$) et le quencher à l'état triplet, ces deux états devant être proches afin de permettre à l'oxygène moléculaire excité singulet de basculé vers sont état fondamental.

$$O_2\ (^1\Delta_g) + Q \rightarrow\ O_2\ (^3\Sigma^-_g) + {}^3Q$$

2) le quenching par transfert de charge correspond quant à lui à l'interaction avec $^1O_2$ déficient en électron avec un donneur d'électron (D)[50].

$$D + O_2\ (^1\Delta_g) \leftrightarrow {}^1[O_2\ (^1\Delta_g)\ ---\ D] \text{–C.I.S}\rightarrow\ {}^3[O_2\ (^3\Sigma^-_g)\ ---\ D] \leftrightarrow O_2\ (^3\Sigma^-_g) + D$$

(C.I.S. croissement intersystème)

[50] (42) R. L. Clough *Macromolecules* **1992**, *25*, 3399-3405.

Puisque O_2 ($^1\Delta_g$) agit en tant qu'accepteur d'électron les composés facilement oxydables s'avèrent être les meilleurs inhibiteurs.

Parmi ces sondes, certaines sont capables d'inhiber l'action de l'oxygène moléculaire singulet au sein des cellules comme par exemple l'azidure de sodium (NaN_3)[51], le β–carotène ou le 1.4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO)[52], l'acide 9-anthracènepropionique (APA, sonde chimique fluorescente)[53] ou le 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) qui réagit avec l'oxygène moléculaire singulet pour produire de l'ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) (Figure III.12.).

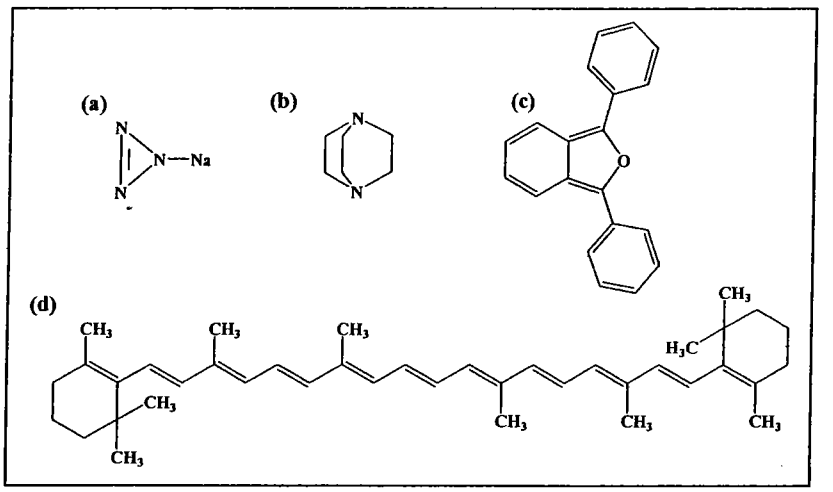


Figure III. 12. Structure des sonde spécifiques à l'oxygène moléculaire singulet : (a) l'azide de sodium (NaN_3) (b) le 1.4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), (c) le 1,3-diphényliso-benzofurane (DPBF) et (d) le β–carotène.

Afin d'étudier l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$) par spectrométrie de masse, notre choix s'est porté sur la sonde spécifique le 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF). En effet, la détection du processus de quenching chimique conduisant à la formation du composé ortho-benzoylbenzène (o-BB), composé stable pouvant être détecté par spectrométrie de masse, sera gage de la présence de $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) dans le milieu considéré.

---

[51] (43) Melnikova V.O.; Bezdetnaya L.N.; Potapenko A.Y.; Guillemin F. *Radiat. Res.* **1999**, *152*, 428-435.

[52] (44) C. S. Foote *ed. H. H. Wasserman and R. W. Murray, Academic Press, New York* **1979**.

[53] (45) A. Lavi; H. Weitman; R. T. Holmes; K. M. Smith; Ehrenberg, B. *Biophys J* **2002**, *82*, 2101-2110.

6. Etude de la sonde 1,3-DiphénylisoBenzoFurane (DPBF) par MALDI-TOF/MS

Comme nous l'allons déjà présenté, les premières études faisant intervenir le 1,3-DiPhényliso BenzoFurane dans le cadre de la détection d'oxygène moléculaire singulet dans le milieu cellulaire remonte aux années 70 par Dougherty[54] par la mise en évidence du rôle létal de $^1O_2$, étude menée par fluorescence sur la transformation de la sonde DPBF en produit final o-BB. Notre approche est similaire car elle se base également sur la détection directement par spectrométrie de masse à temps de vol TOF/MS de ce même produit o-BB issu de la réaction entre $^1O_2$ et le DPBF.

Nous nous sommes dans un premier temps intéressés aux effets potentiels du laser d'ionisation à azote utilisé classiquement en mode MALDI (λ = 337 nm) vis à vis de la sonde DPBF et du produit final o-BB. En effet il est important de connaître la répercussion de ces tirs lasers en terme de photodégradation de nos composés et/ou de formation intrinsèque d'oxygène moléculaire singulet ce qui dans ce cas rendrait l'utilisation de ces deux composés totalement inadéquat.

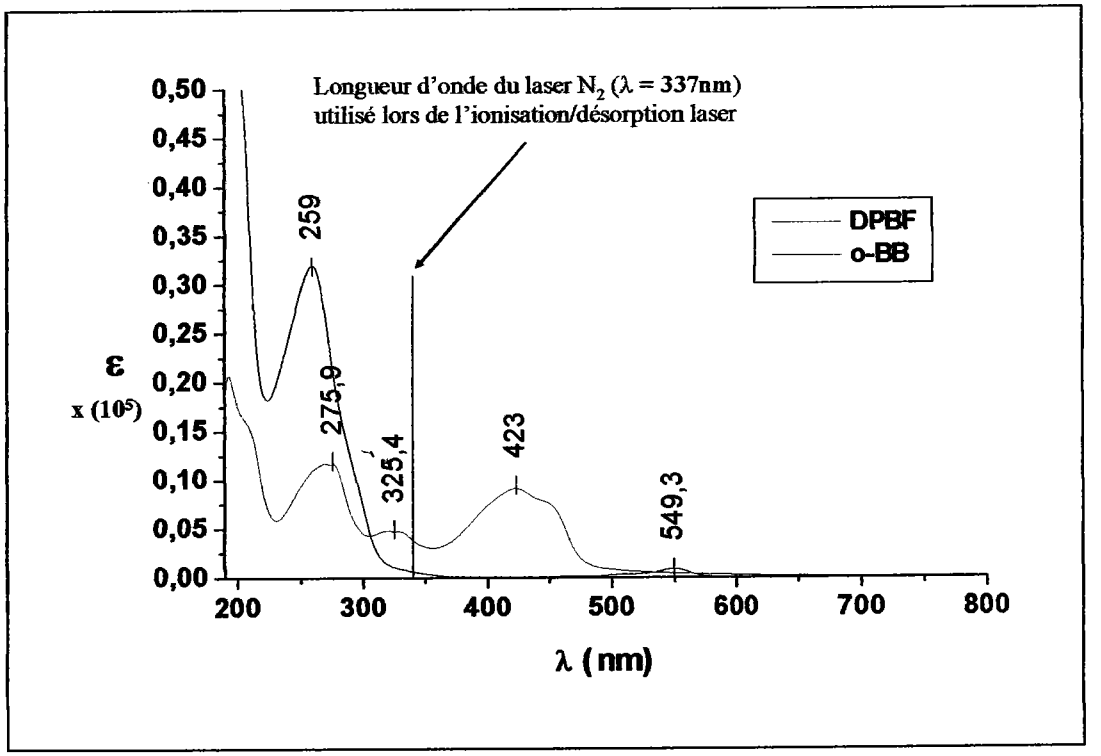


Figure III. 13. Spectre UV-visible du DPBF (en rouge) et de l'o-BB (en noir) en milieu éthanol/eau, 1/99, v/v

54 (32) Weishaupt K.R.; Gomer C.J.; Dougherty T.J. *Cancer Research* **1976**, *36*, 2326-2329.

Il apparaît clairement sur la figure III.14 que l'absorbance à λ = 337nm est inexistante pour l'o-BB et minimale pour la sonde DPBF. Ainsi nous pouvons avancé le fait comme quoi l'utilisation du laser λ = 337 nm n'aura pas d'effet photodynamique majeur sur les deux composés. Une première étude par spectrométrie de masse à été réalisée sur une solution de DPBF (10^{-5}M, éthanol/eau, 1/99, v/v) déposée directement sur notre plaque d'échantillonnage mode LD-TOF/MS. Pour ces acquisitions (20 tirs laser par spectre), nous avons travaillé à une énergie égale à 2,5 µJ correspondant à un régime d'ablation et d'ionisation du composé. Chaque acquisition s'est faite à proximité du point d'impact de l'acquisition précédente, soit 40 µm, afin de mettre en évidence les effets potentiels du laser sur le dépôt.

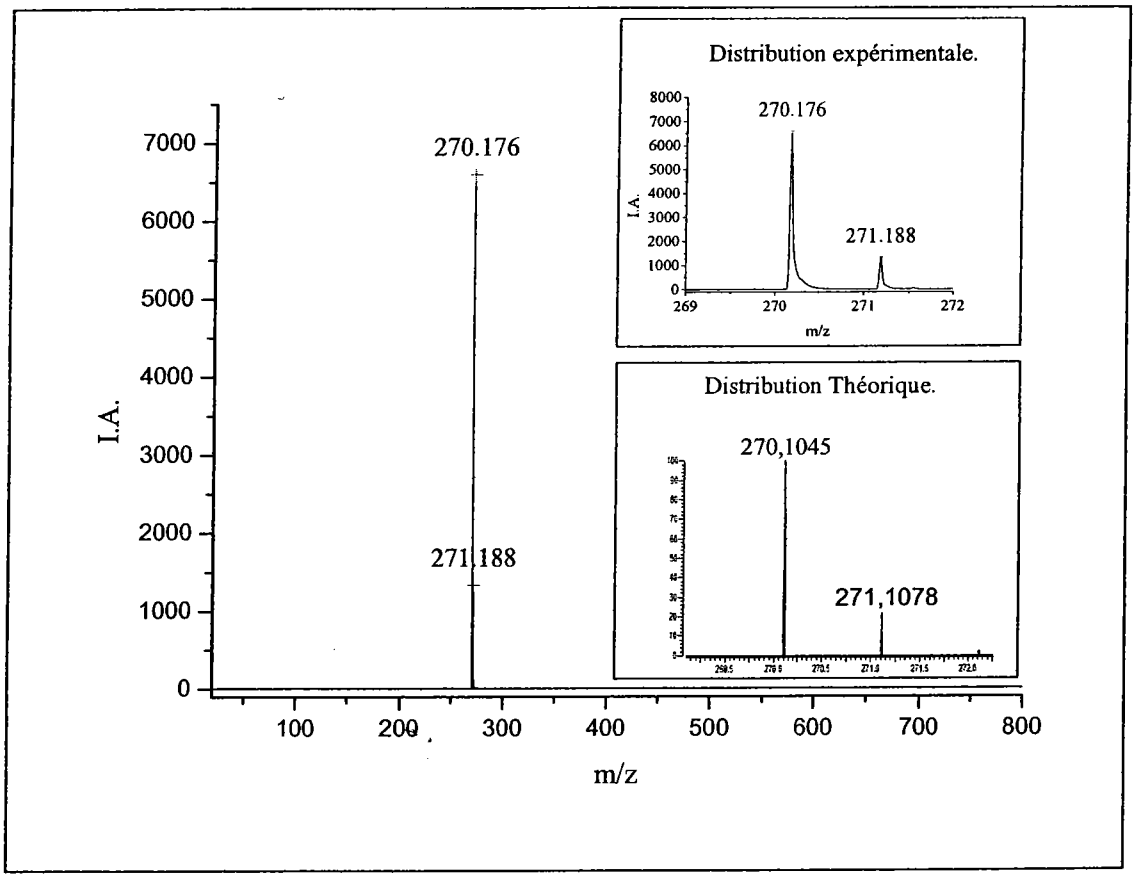


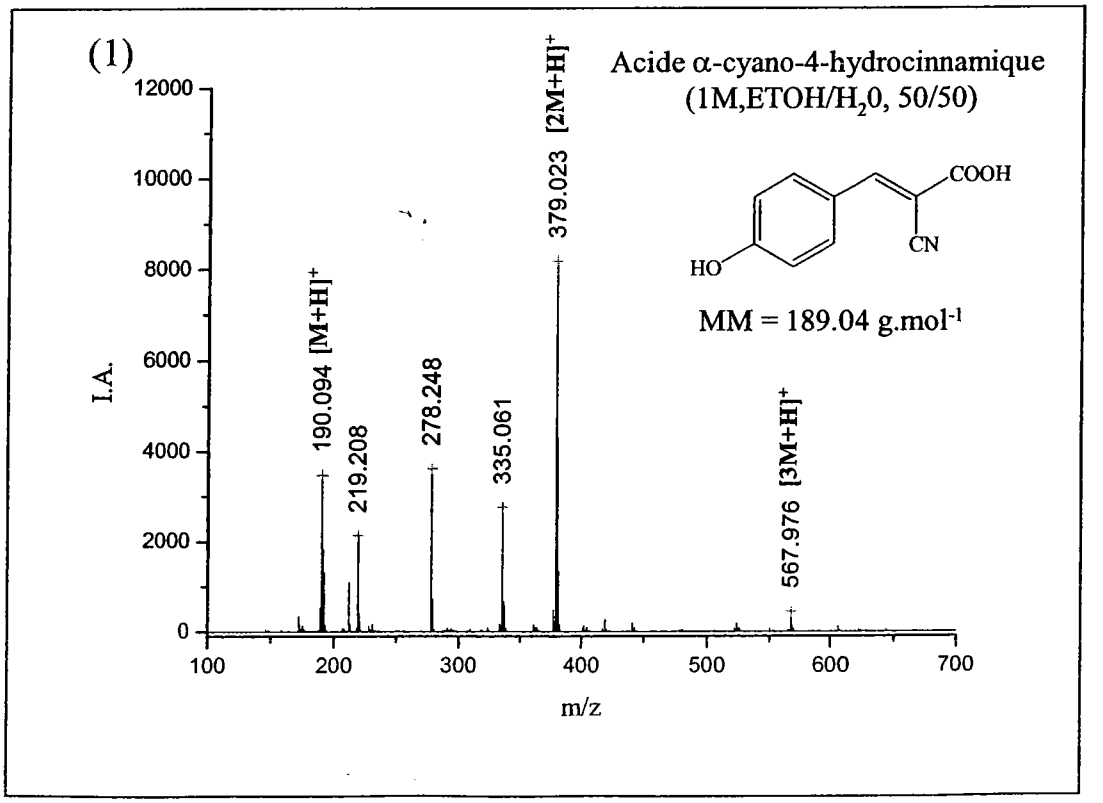
Figure III. 14. Spectre de masse LD-TOF/MS du DPBF solubilisé dans éthanol/eau (1/99, v/v) (Energie du laser = 2,5 µJ)

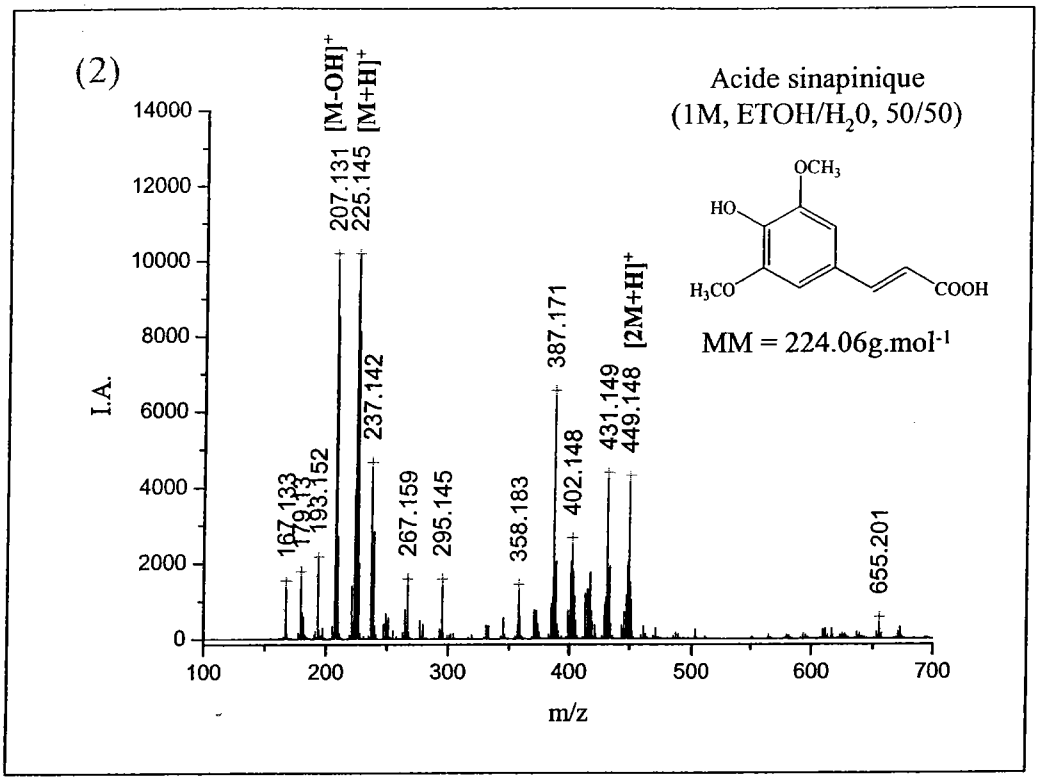
Le spectre de masse obtenu fait apparaître les masses m/z 270 et m/z 271 correspondant à la distribution isotopique du DPBF ($[DPBF]^{\bullet+}$) (Figure III.13.). Ainsi nous pouvons avancer que l'interaction du laser à azote (N_2) sur la molécule DPBF n'inflige pas de dégradation ou de la phototransformation de ce dernier.

Cette première analyse apporte une empreinte spectrale spécifique qui sera très utile par la suite pour détecter la présence ou non du composé DPBF en milieu complexe. De plus, le fait de n'avoir aucun pic de masse correspond à la formation de l'o-BB lors de l'analyse par LD-TOF/MS du DPBF nous indique, que d'une part, ce dernier ne libère aucune molécule de dioxygène lors de l'interaction laser et l'expansion du plasma, et d'autre part, que la probabilité que cette molécule DPBF réagisse avec de l'oxygène moléculaire résiduel est quasi-nulle.

Suite à ces premières études par LD-TOF/MS, des études similaires ont été menées en mode MALDI-TOF/MS. Un point important tenait au choix de la matrice afin de mener au mieux les études concernant la sonde DPBF et le produit final o-BB. La quasi-totalité des matrices standards sont des acides de faible poids moléculaires pouvant formés des adduits. Ces adduits peuvent être un avantage dans le cadre d'une calibration interne mais un inconvénient lorsqu'il s'agit d'analyse de composés de petites tailles.

Afin de visualiser la distribution de ces adduits sur la gamme de masse, nous avons procédé à une étude des trois matrices les plus usuelles à savoir l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (4-hydroxy-alpha-cyanocinnamic acid, HCCA), l'acide sinapinique (sinapinic acid, SA) et l'acide 2,5-hydroxybenzoique (2,5- dihydroxybenzoic acid,: 2,5 DHB) (Figure III.15.)





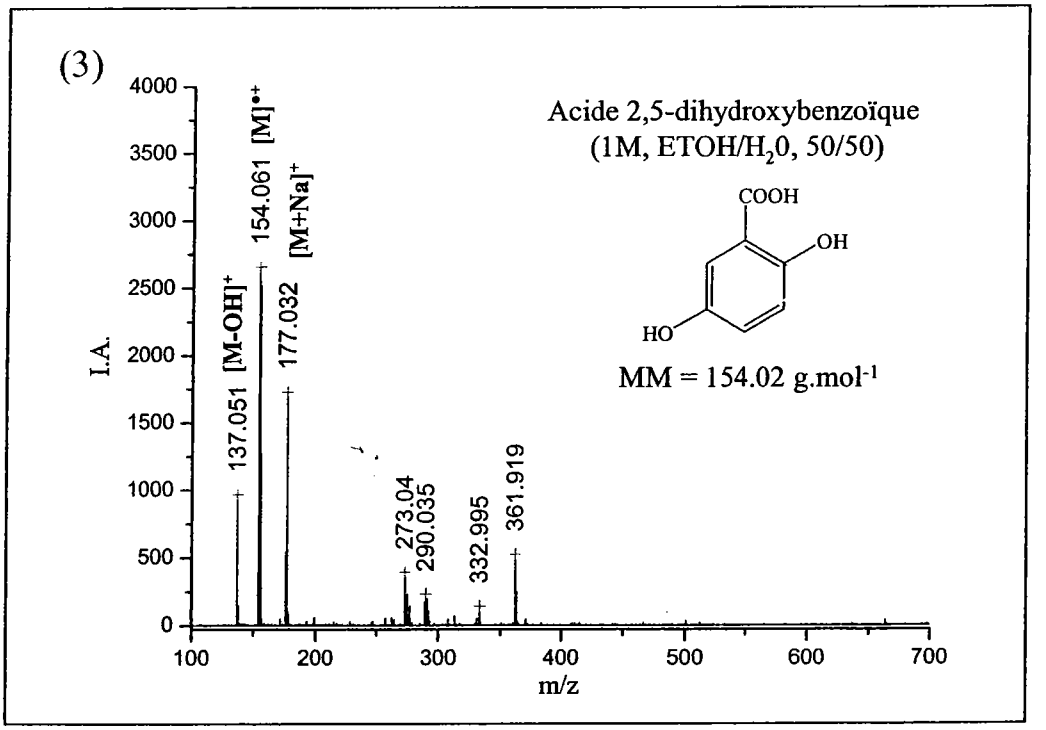


Figure III. 15. Spectres MALDI-TOF/MS de l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (1), de l'acide sinapinique (2) et de l'acide 2,5-hydroxybenzoique (3).

(1 M dans éthanol/eau, 1/1, v/v) (λ = 37nm)

Il ressort de ces études que la majorité des adduits de matrice se trouvent entre 150 et 450Da, rendant une identification d'analytes de faible poids moléculaires (< 300Da) complexe. L'acide sinapinique quant à lui, de part son nombre important d'adduit ne peut être retenu comme candidat pour l'analyse de nos échantillons.

L'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique et l'acide dihydroxybenzoïque présentent quant à eux un spectre clair, favorisant une identification plus aisée. Sachant que, dans le cas de l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique, le laser MALDI de l'instrument délivre une énergie minimale proche du seuil d'ionisation de cette dernière, conduisant à des pics intenses saturant le détecteur MCP. Ainsi, nous avons préconisé l'emploi de la 2,5DHB, le facteur énergie pouvant être modulé avec plus grande aisance dans ce cas. L'énergie déposée sur la plaque d'échantillonnage peut être également ajustée par le biais d'ouverture des iris qui compose le système optique mais afin de disposer d'une plus grande souplesse dans notre étude, il a été jugé préférable de maintenir les ouverture des iris à un diamètre de 5 mm.

Les premières études par MALDI-TOF/MS ont été effectuées en milieu aqueux (éthanol/eau, 1/99, v/v) sur une solution de DPBF (m/z = 270,105) et d'o-BB (m/z = 286,099) (Figure III.16.) à une concentration de 10^{-5} M.

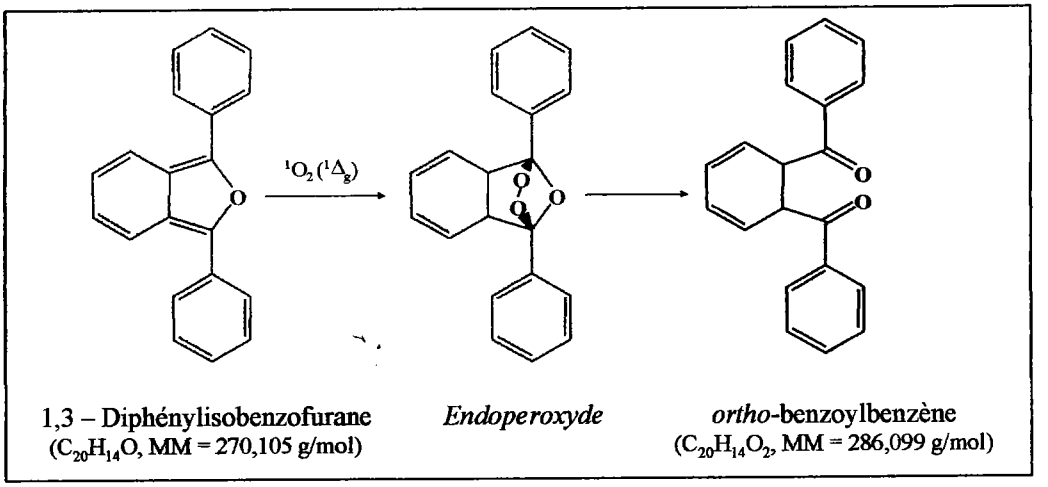


Figure III. 16. Formation de l'ortho-dibenzoylbenzène à partir du 1,3 Diphényliso benzofurane ayant réagit avec de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$).

Les échantillons ont été préparés en mélange intime. 0,5 µL d'analyte et 0,5 µL de matrice 2,5 DHB (éthanol/eau, 1 :1,v/v) ont été soigneusement mélangés dans un microtube puis déposé sur la plaque d'analyse MALDI-TOF/MS. Les analyses par spectrométrie de masse ont permis d'aboutir aux résultats indiqués sur les figures III.17. et Figure III.18..

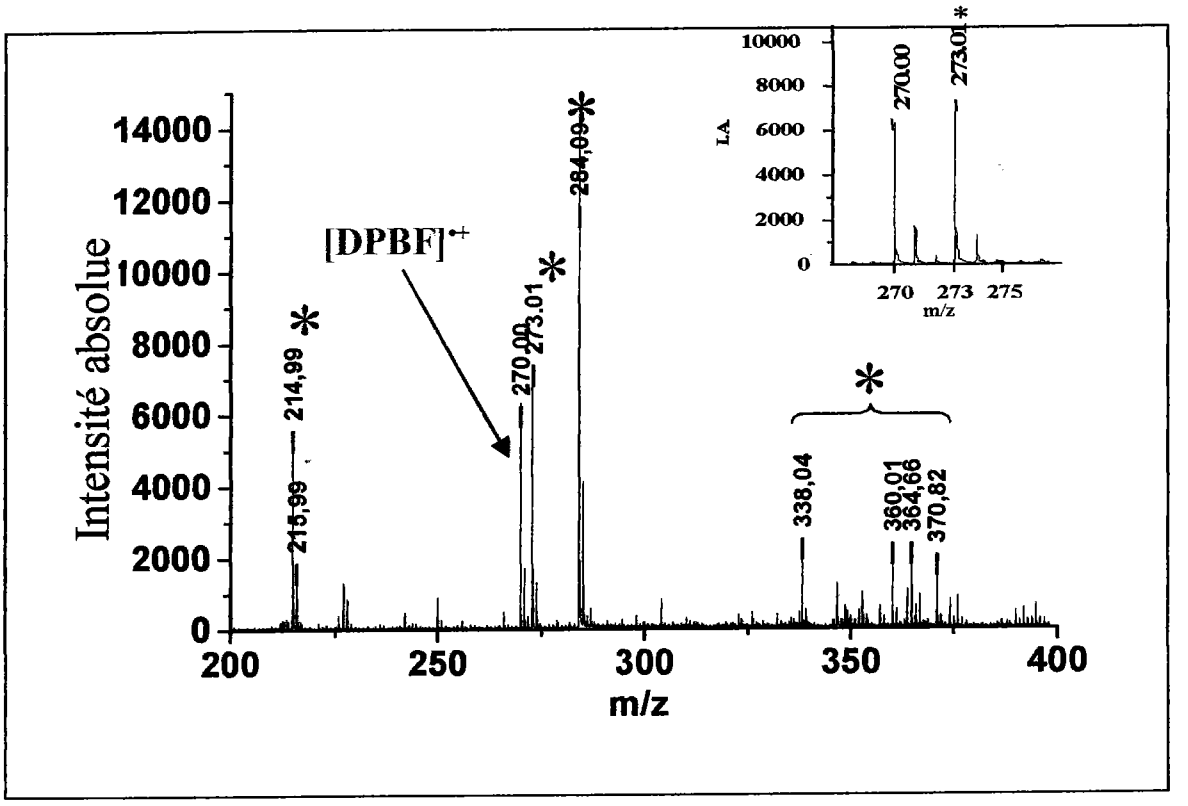


*Figure III. 17. Spectre de masse MALDI-TOF/MS de la sonde DPBF (10^{-5}M). Matrice 2,5 DHB (10^{-1} M, éthanol/eau, 1/1, v/v) * pics de la matrice 2,5DHB.*

L'analyte est détecté sous la forme $[DPBF]^{\bullet+}$ à la masse 270,00 Da, l'écart de masse par rapport à la masse moléculaire isotopique calculée est de 0,10 Da avec une résolution de 8500, nous permettant de faire la distinction entre le pic relatif à la sonde DPBF et les pics de masse relatifs à la matrice 2,5 DHB. Il est à noter qu'avant chaque analyse, un spectre de masse de la matrice est établit afin de référencer au préalable les pics de masse caractéristique de cette dernière.

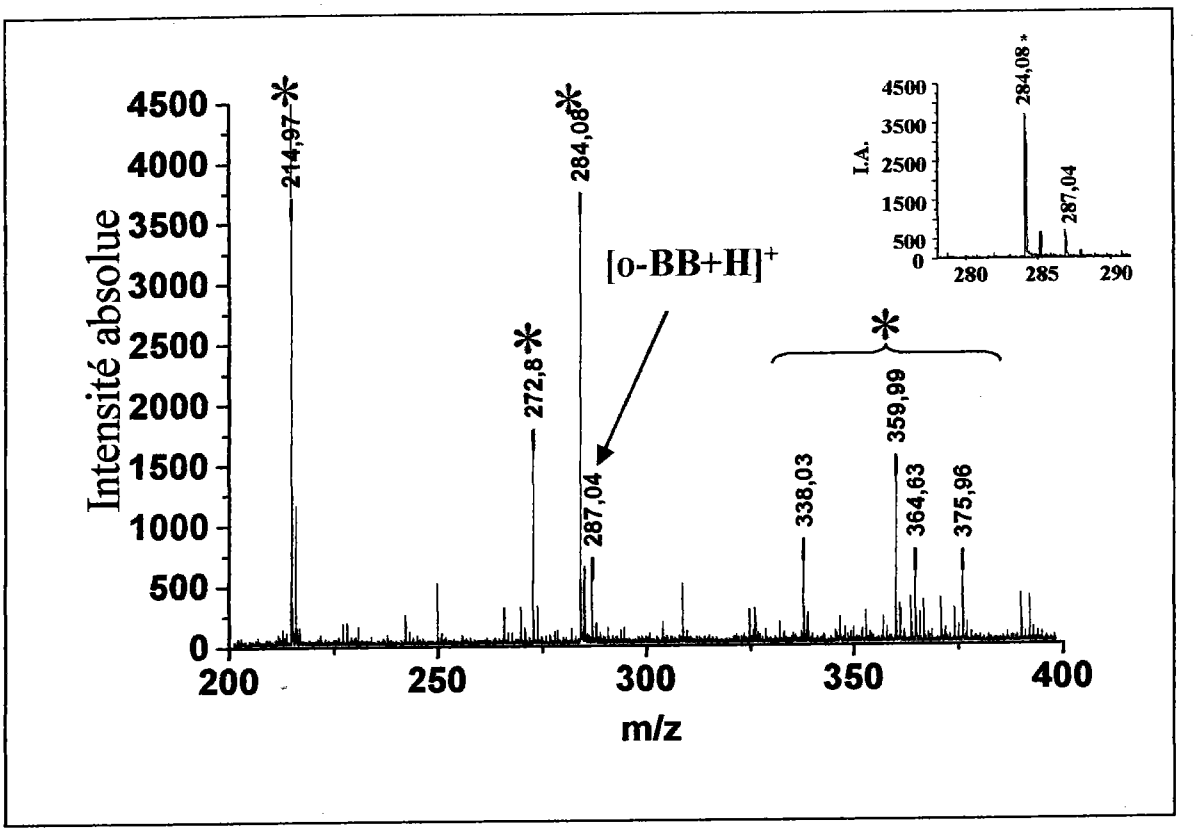


*Figure III. 18. Spectre de masse de l'o-BB (10^{-5}M). Matrice 2,5 DHB (10^{-1} M, éthanol/eau, 1/1, v/v) * pics de la matrice 2,5DHB.*

En nous appuyant sur le spectre de masse MALDI-TOF/MS de la matrice 2,5DHB, sur la résolution du pic à m/z 287,04 Da (R = 8000), sur sa distribution isotopique et sur l'écart de masse obtenu par rapport à la masse moléculaire isotopique calculée pour l'ion $[o\text{-}BB+H]^+$ (Δm = 0,06 Da), nous pouvons affirmer que celui-ci correspond à la forme protonée de l'ortho-dibenzoylbenzène.

De plus, nous pouvons constater que le comportement des deux molécules DPBF et o-BB n'est pas le même vis-à-vis de l'ionisation par la méthode MALDI. En effet, en ce qui concerne la sonde DPBF, il s'avère que nous détectons l'ion radicalaire $M^{\bullet+}$ alors que pour le produit o-BB il s'avère que sommes en présence de l'ion $[M+H]^+$. Cet effet peut être expliqué par une affinité protonique de la sonde, qui en phase gazeuse serait proche de celle de la matrice 2,5DHB (AP = 852 kJ/mol).

Une autre explication possible consisterait à prendre en compte un processus d'auto ionisation ou "self-ionization". Deux approches ont été mise en avant afin d'expliquer ce phénomène[55,56]. La première préconise la formation du cation radicalaire suite à une ionisation multiphotonique qui s'illustre de la façon suivante :

$$Molécule + nh\nu \rightarrow Molécule^{+\bullet} + e^{-}$$

Mais étant donné que l'irradiance du laser en UV-MALDI est faible, ce processus ne peut avoir lieu que dans le cas où une ionisation à deux photons peut opérer. C'est pour cela qu'une seconde approche a été envisagée, basée sur la mise en commun de l'énergie interne de deux ou de plusieurs composés excités afin de produire un ion radicalaire :

$$MoléculeMolécule + nh\nu \rightarrow Molécule^{*}Molécule^{*} \rightarrow Molécule^{+\bullet} + e^{-}$$

Ainsi, en considérons ce type d'approche, la formation de l'ion radicalaire $[DPBF]^{+\bullet}$ peut être envisagé. Une observation supplémentaire révèle qu'il n'apparaît pas d'espèces relatif à $[DPBF+OH]^{+}$ à 287.107 Da sur le spectre de masse relatif à l'analyse de la sonde DPBF. Ainsi, dans la poursuite de nos analyses, tout massif à 287 Da sera attribué sans ambiguïté à présence de l'espèce o-BB ; et donc à la présence d'oxygène moléculaire singulet.

Nous avons par la suite étudié un mélange des composés purs DPBF/o-BB/ *m*-THPC (1/1/1, v/v/v) à 10^{-5} M solubilisés dans éthanol/eau (1/99). L'analyse MALDI-TOF/MS avec comme matrice 2,5 DHB (10^{-1}M, éthanol/eau, 1/1, v/v) présente un spectre de masse difficile à interpréter ne conduisant pas à un résultat facilement interprétable. Le point essentiel de ce déboire réside dans le fait que le dépôt n'est pas homogène. En effet, la présence des deux composés DPBF et *m*-THPC est effective au centre du dépôt alors que le composé l'o-BB est plus particulièrement distribué en périphérie.

---

55 (46) Bourcier S.; Hoppilliard Y. *International Journal of Mass Spectrometry* **2002**, *217*, 231-244.

56 (47) Karas *ASMS* **2006**.

Aussi, afin d'amener une solution à ce problème, nous avons développé un protocole spécifique d'échantillonnage MALDI notamment en ce qui concerne le milieu de solvatation de la matrice. Nos recherches se sont portées plus précisément sur deux mélanges de solvants: le premier constitué d'éthanol et d'eau et le second constitué d'acétonitrile et d'eau en différentes proportions.

En parallèle à l'étude en masse, nous avons effectué une approche morphologique des dépôts par microscopie optique afin d'avoir une information directe et précise sur l'homogénéité du dépôt, ainsi que sur sa répartition au niveau des puits d'échantillonnage de la plaque MALDI, sans oublier la qualité de la cocristallisation.

Nos premières études sur l'utilisation de la matrice 2,5 DHB (10^{-1} M) ont révélé que le milieu de solvatation eau/acétonitrile (30/70) a permis une meilleure détection des espèces (sensibilité, résolution des pics et clarté du spectre) que pour un milieu de solvatation eau/éthanol (30/70). De plus il s'est avéré qu'un mélange H_2O/ACN 80/20 ou 30/70 entraîne une inhomogénéité de la cristallisation telle que l'on peut le constater sur les figures III.19., (a) et (b).

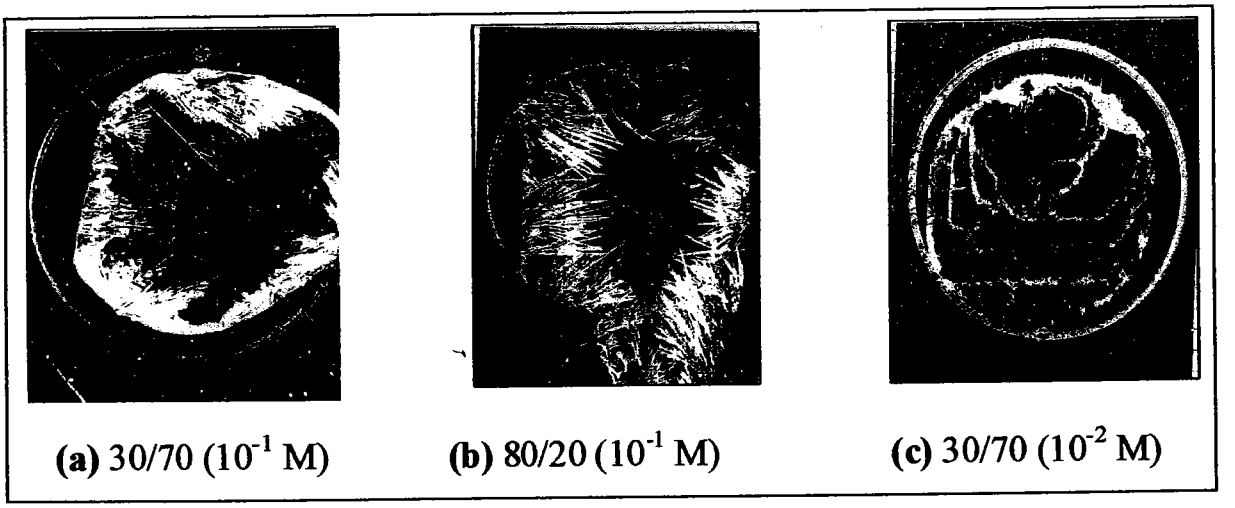


Figure III. 19. – Photographies de dépôts (ø = 2 mm) en mélange intime de l'analyte (m-THPC /DPBF/o-BB; ETOH/eau, 1/99) et de la matrice 2,5 DHB solubilisée dans (a) eau/acétonitrile (30/70) (10^{-1} M), (b) eau/acétonitrile (80/20) (10^{-1} M), (c) eau/acétonitrile (30/70) (10^{-2} M)

Comme nous pouvons le remarquer sur les photographies (a) et (b) de la figure ci-dessus, les dépôts ont une cristallisation périphérique prononcée avec toutefois des cristaux en forme d'aiguilles caractéristiques de la matrice 2,5-DHB. Ces cristaux ayant une certaine épaisseur vont modifier légèrement mais suffisamment la distance entre la source d'ionisation et le détecteur pour induire un faible décalage en masse.

Afin de diminuer la cristallisation en périphérie nous avons penché pour l'emploi d'une matrice 2,5-DHB de concentration plus faible à 10^{-2} M. Il en résulte une cristallisation plus faible mais permettant un dépôt bien plus homogène telle que nous pouvons le voir sur la photographie (c) de la figure III.18..

Compte tenu de ces résultats obtenus en microscopie optique, l'emploi de la matrice 2,5 DHB à 10^{-2} M solubilisé dans H_2O/ACN (30/70) a été retenu. Il nous fallait par la suite confirmer ce choix par rapport à l'analyse MALDI-TOF/MS de cette solution de matrice en présence du mélange des trois constituants DPBF, o-BB et Foscan® (Figure III.20.)

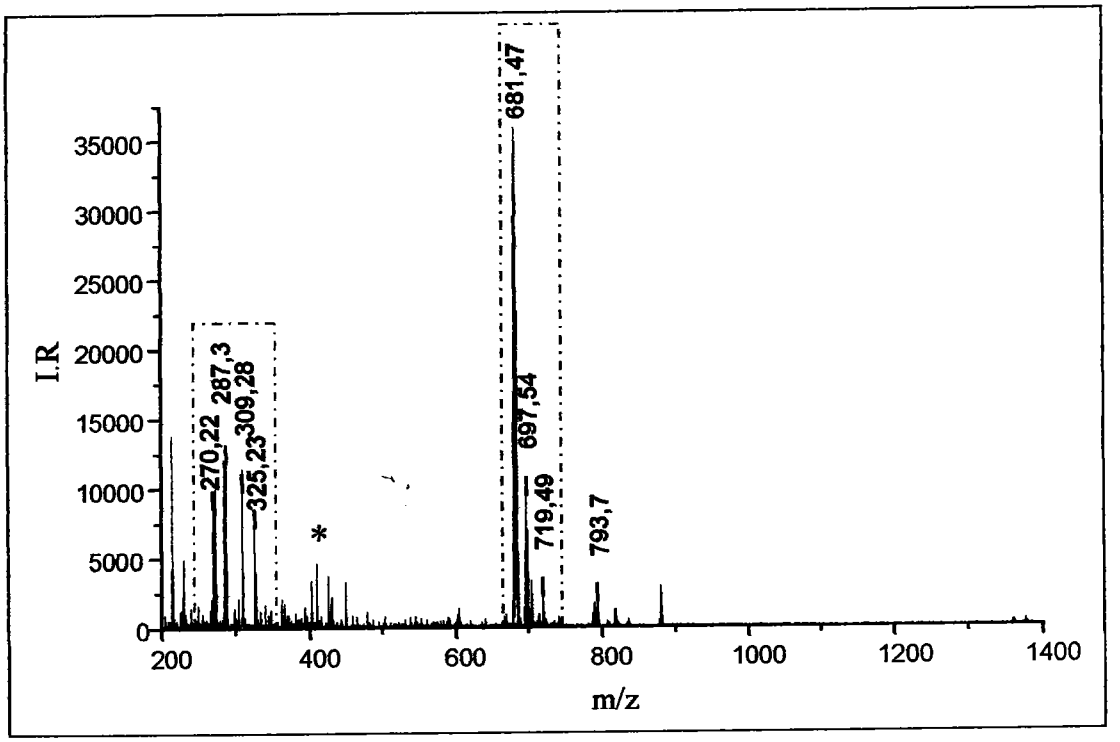


*Figure III. 20. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange DPBF, o-BB et m-THPC (10^{-5} M, éthanol/eau, 1/99). 2,5 DHB (10^{-2} M, eau/acétonitrile, 30/70). * pics de masse de la matrice 2,5DHB.*

Deux zones peuvent être précisément étudié à savoir celle relative à la sonde DPBF et au produit o-BB (Figure III.21.) et celle lié au photosensibilisateur Foscan® (Figure III.21.).

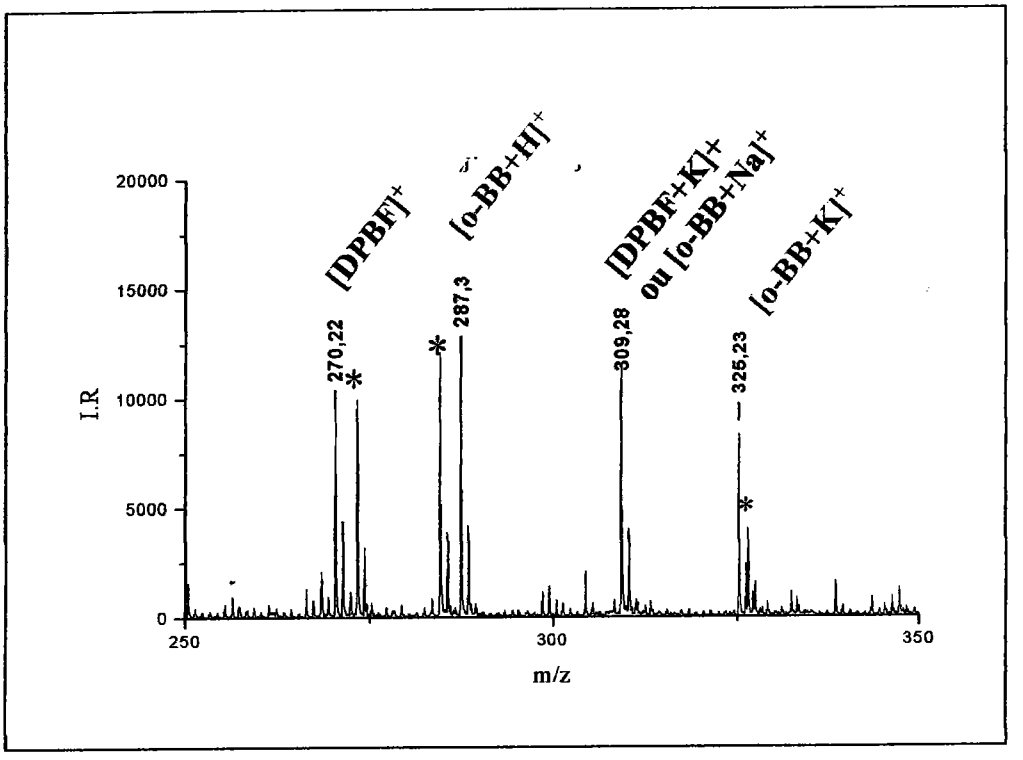


*Figure III. 21. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange (DPBF, o-BB, m-THPC; 1:1:1) en solution éthanol/eau (1/99) en mélange intime avec de la 2,5 DHB à 10^{-2}M (eau/acétonitrile, 30/70). Apparition simultanée des ions relatifs au DPBF et à l'o-BB. * pics de matrice 2,5DHB.*

Nous pouvons constater sur le spectre ci-dessus, les pics de masse relatifs aux ions $[DPBF]^{\bullet+}$ m/z = 270,22, $[o\text{-}BB+H]^+$ m/z = 287,3 et $[o\text{-}BB+K]^+$ m/z = 325,23. Néanmoins il existe une ambiguïté pour l'ion m/z = 309,28. En effet, il peut s'agir soit de $[DPBF+K]^+$ (M_{Th} = 309.06817), soit de $[o\text{-}BB+Na]^+$ (M_{Th} = 309.08915). Afin de lever cette indétermination une résolution minimale de 15000 serait requise, résolution que nous n'avons pas pu obtenir de façon systématique.

Sur le spectre de masse de la figure III.22. m/z = 680,52 Da, m/z = 681,47 Da, m/z = 697,54 Da, m/z = 703,56Da et m/z = 719,49Da correspondent respectivement aux espèces $[m\text{-}THPC]^{\bullet+}$, $[m\text{-}THPC+H]^+$, $[m\text{-}THPC+OH]^+$, $[m\text{-}THPC+Na]^+$ et $[m\text{-}THPC+K]^+$.

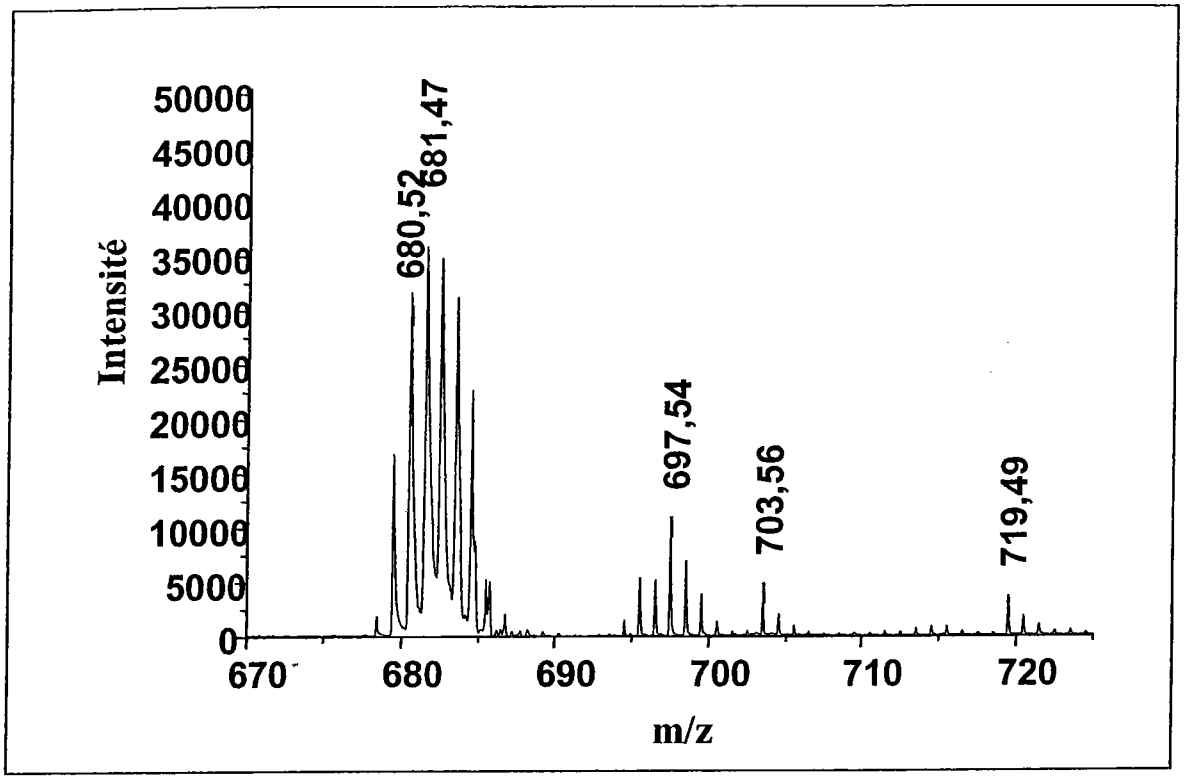


Figure III. 22. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange (DPBF, o-BB, m-THPC; 1:1:1) en solution éthanol/eau (1/99) en mélange intime avec de la 2,5 DHB à 10^{-2}M (eau/acétonitrile, 30/70).

La détection de ces trois espèces met en avant le bien fondé de notre protocole d'échantillonnage MALDI-TOF/MS qui permet simultanément d'avoir les informations sur la présence des composés DPBF, o-BB et *m*-THPC, le tout sur un seul et même spectre de masse.

Suite à ces études préliminaires sur la détection simultanée des composés d'intérêt, nous nous sommes focalisés sur la mise en évidence, par spectrométrie de masse, de la présence d'oxygène moléculaire singulet suite à l'illumination laser de l'agent photosensible *m*-THPC et de notre sonde moléculaire DPBF.

Pour cela nous avons effectué les expérience sur un mélanges *m*-THPC (10^{-5} M) / DPBF (10^{-5} M) solubilisés dans un mélange éthanol/eau (1/99, v/v). La solution ainsi préparée est soumise ensuite à une irradiation laser (λ = 655 nm, t_{max} = 120min, E = 30 mJ).

L'étude est effectuée d'une part par spectrophotométrie UV-visible afin de visualiser l'évolution des composés initiaux et d'autre part par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS afin de caractériser les composés présents dans le milieu.

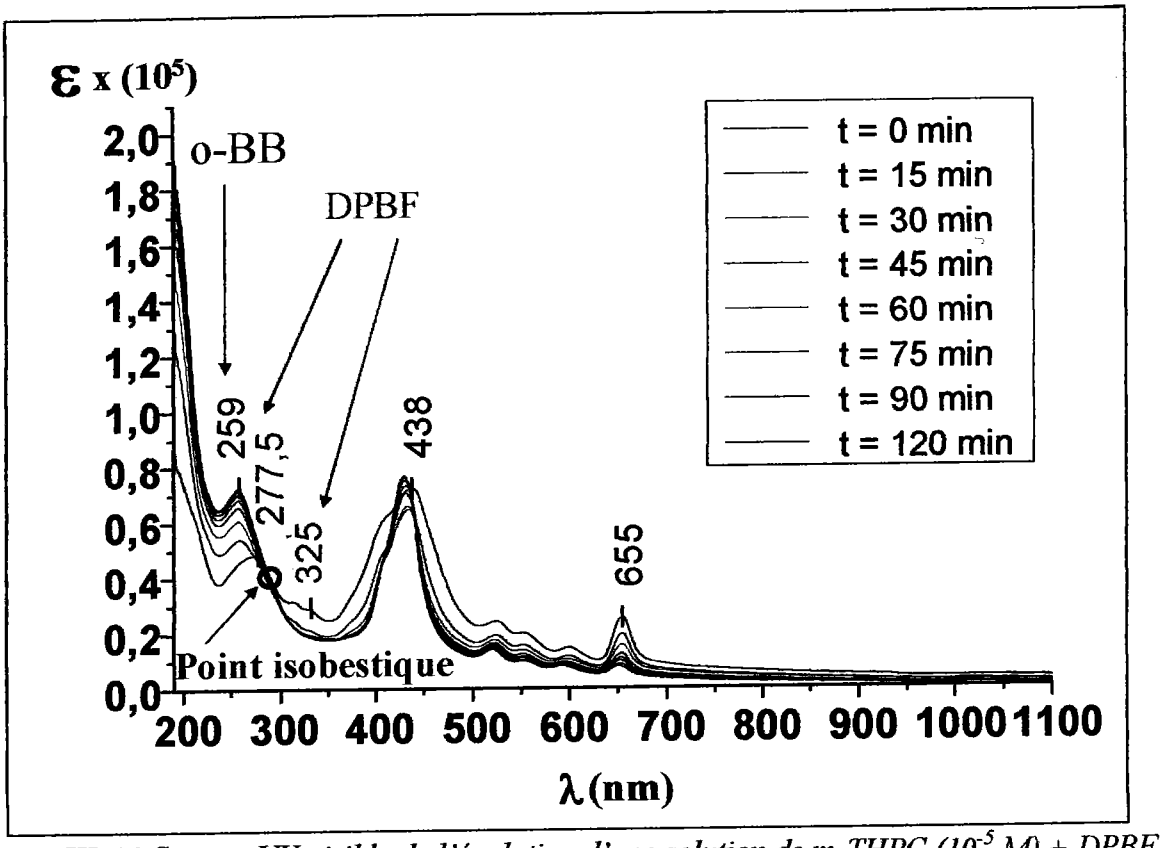


Figure III. 23 Spectre UV-visible de l'évolution d'une solution de m-THPC (10^{-5} M) + DPBF (10^{-5} M) en milieu éthanol/eau (1/99).

Suite à l'irradiation laser ((λ = 655 nm, E = 30 mJ), nous voyons clairement une évolution quant au profil spectral (Figure III.23.). Nous avons un effet hypsochrome en ce qui concerne la première Q-bande (λ = 655 nm) et bande de Soret du photosensibilisateur (λ = 435 nm). L'amincissement de la bande de Soret est concomitant à l'apparition de la bande à 259nm, bande caractéristique de l'espèce o-BB. L'apparition d'un point isobestique à 287nm laisserait supposer la transformation du DPBF en o-BB et cela suite à une irradiation égale à 120 min. Afin de valider cette supposition une analyse en MALDI-TOF/MS a été effectuée.

Le spectre de masse correspondant au mélange *m*-THPC/DPBF (10^{-5} M / 10^{-5} M ; éthanol/eau, 1/99, v/v) avant irradiation laser (Figure III.24.) fait apparaître un ion m/z = 681,30 relatif à l'espèce $[m\text{-THPC+H}]^+$. On notera également sur ce même spectre la présence de l'ion $[DPBF]^{\bullet+}$ à la masse 270,13 Da.

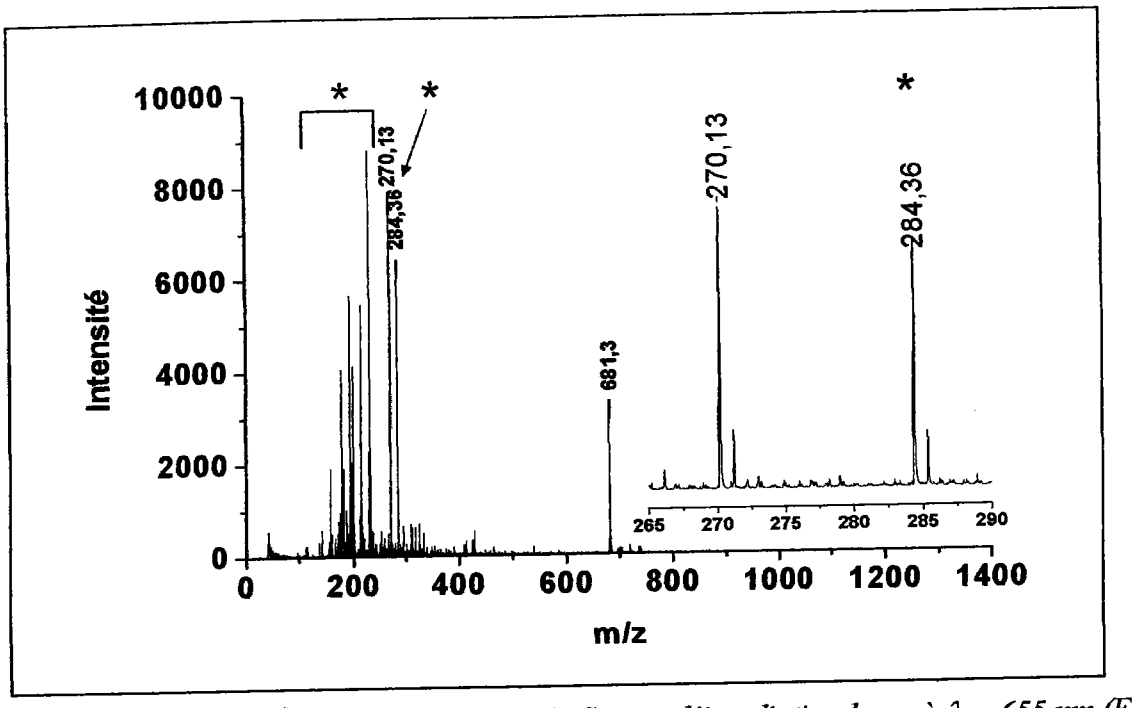


*Figure III. 24. Spectre de masse MALDI-TOF/MS avant l'irradiation laser à λ = 655 nm (E = 30 mJ) du mélange : m-THPC (10^{-5} M) + DPBF (10^{-5} M) en milieu éthanol/eau (1/99). * pics de matrice 2,5DHB.*

Nous avons effectué par la suite l'analyse par MALDI-TOF/MS du mélange après irradiation laser afin de caractériser les espèces en présence.

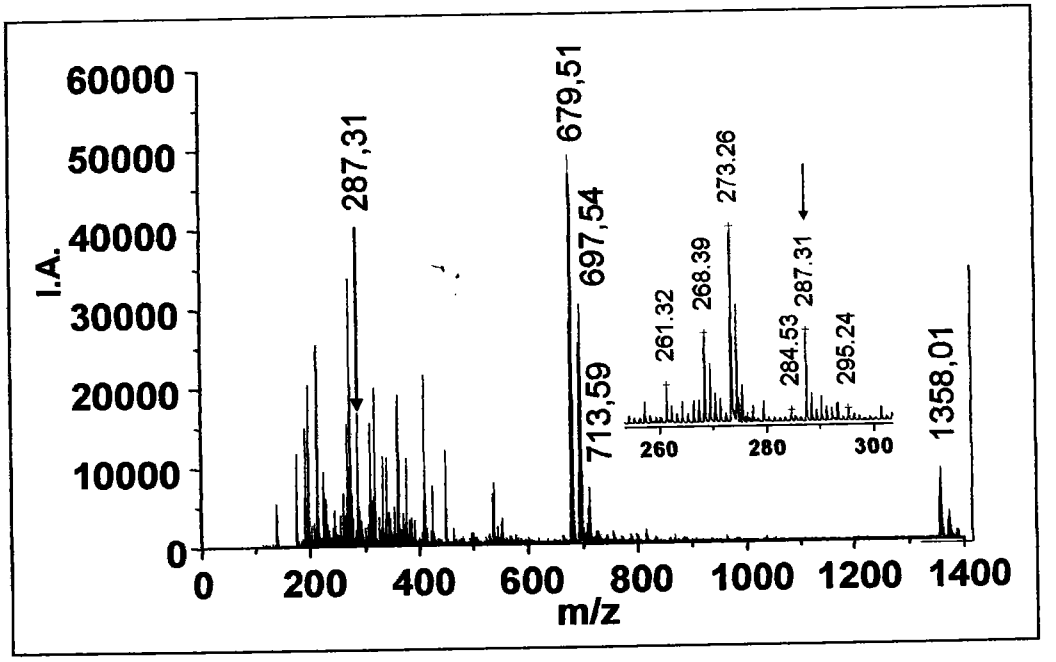


Figure III. 25. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange initial m-THPC (10^{-5} M) + DPBF (10^{-5} M) en milieu éthanol/eau (1/99), après irradiation laser à λ = 655 nm (E = 30 mJ, t = 120 min.)

Ainsi, suite à l'irradiation laser (Figure III.25.), l'ion relatif à l'espèce $[o\text{-}BB+H]^+$ à m/z 287,31Da est observé sur le spectre de masse. Il apparaît donc ici possible d'effectuer correctement la détection de l'$^1O_2$ par spectrométrie de masse grâce au quencher chimique DPBF. De plus, nous voyons apparaître après irradiation laser des ions caractérisés à m/z 697,54, m/z 679,51, m/z 713,59 et m/z 1358,01 correspondant respectivement aux structures $[m\text{-}THPP+H]^+$, $[m\text{-}THPC+OH]^+$, $[m\text{-}THPC+(OH)_2\text{-}H]^+$ et un dimère $[(m\text{-}THPC)_2\text{-}2H]^+$.

L'utilisation de la sonde DPBF, piégeuse de $^1O_2$, aurait laissé supposer une formation moindre des espèces hydroxylées du Foscan®. C'est pourquoi, l'obtention de ces ions est soit lié à une concentration insuffisante de DPBF ne pouvant prévenir la formation de ces espèces soit les ions obtenus requièrent des espèces réactives autre que $^1O_2$. Pour tenter de lever cette ambiguïté, l'augmentation de la concentration de DPBF (10^{-4} M) aurait été nécessaire.

Suite à ces premières études, nous avons transposé cette démarche à la détection *in situ* de l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ au sein de cellules entières de lignée HT29. Cependant contrairement aux illuminations effectuées en milieu aqueux (λ = 655nm, t = 120 min, E = 30 mJ), nous avons utilisé une source laser continue au sein du laboratoire d'oncologie du Centre Alexis Vautrin (Vandoeuvre-lès-Nancy).

Afin d'appuyer l'argumentation quant à la production d'$^1O_2$ *in situ* en milieu cellulaire par spectrométrie de masse, nous devions tout d'abord répondre à une question incontournable : la sonde DPBF est-elle correctement internalisée au sein des cellules cancéreuses. Pour ce faire, deux approches ont été utilisées : l'une basée des études par la microscopie à épifluorescence, l'autre faisant intervenir la digitonine utilisée comme perméabilisant membranaire suivie d'une analyse par spectrométrie de masse.

7. Etude par microscopie à épifluorescence

En ce qui concerne les études par microscopie à épifluorescence, les cellules ont été ensemencées dans des flacons de culture spécifiques (slideflask, NUNC) avec du milieu de croissance (RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v) comptant du Foscan® (10^{-5} M) et du DPBF (10^{-4} M). Au bout de 5 heures, les cellules ont été lavées par deux fois au RPMI et par trois fois au PBS (Figure III.26.). D'une part, l'utilisation de RPMI permet de rincer les cellules avec un milieu proche du milieu d'incubation employé initialement, supprimant l'excédant des composés exogènes non internalisés (DPBF et Foscan®) lors de l'imprégnation ; d'autre part, l'utilisation du PBS permet de retirer les composés nutritifs et les composés exogènes non internalisés restants sur la monocouche cellulaire.

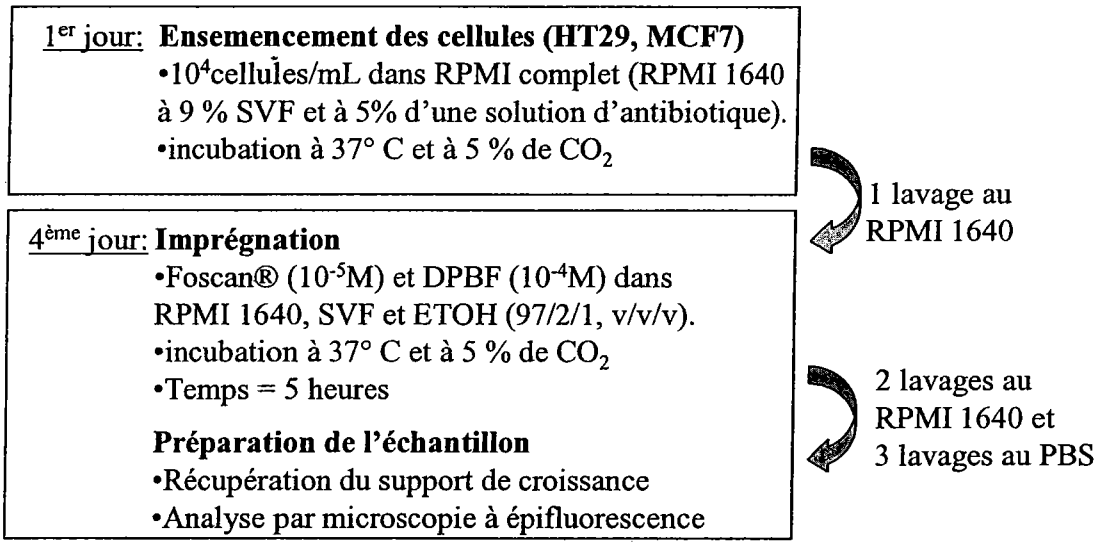


Figure III. 26. Préparation des cultures cellulaires dans les flacons de culture (slideflask, NUNC) pour l'analyse par microscopie à épifluorescence.

Les flacons utilisés à cet effet possèdent un support de croissance amovible semblable à une lame de microscopie (76 mm x 26 mm, surface de culture de 9 cm^2, stérilisée aux rayons Gamma).

Ainsi suite à l'incubation et aux lavages de nos cellules, la partie supérieure du flacon est retirée afin de ne garder que la partie inférieure destinée à l'utilisation en microscopie (Figure III.27.). Il est dès lors possible de recouvrir notre support d'une lame en verre (18 x 50 mm) pour préserver l'intégrité de nos cellules lors de l'observation en microscopie. Le dépôt de

cette lame de verre à la surface de la monocouche cellulaire se justifie surtout par l'utilisation d'optique nécessitant l'application de solution d'indice optique n ≈ 1,5 permettant un meilleur grossissement de l'image.

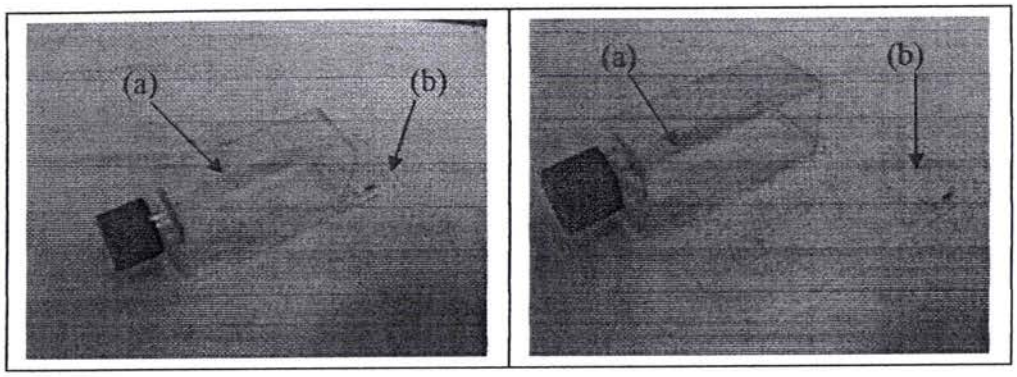


Figure III. 27. Flacons de culture (slideflask, NUNC) disposant d'une partie supérieure (a) et d'un support de croissance (b) amovibles. Le support de croissance est semblable à une lamelle et permet l'observation de monocouches cellulaires par microscopie à épifluorescence.

Dans un premier temps, nous avons procédé à l'analyse par fluorescence de nos composés DPBF et Foscan® en solution aqueuse (éthanol/eau, 1/99, v/v). Pour chacun des spectres de fluorescence obtenus, nous avons considéré la plaque d'émission accessible selon le bloc (jeux de filtres) utilisé (Figure III.28.).

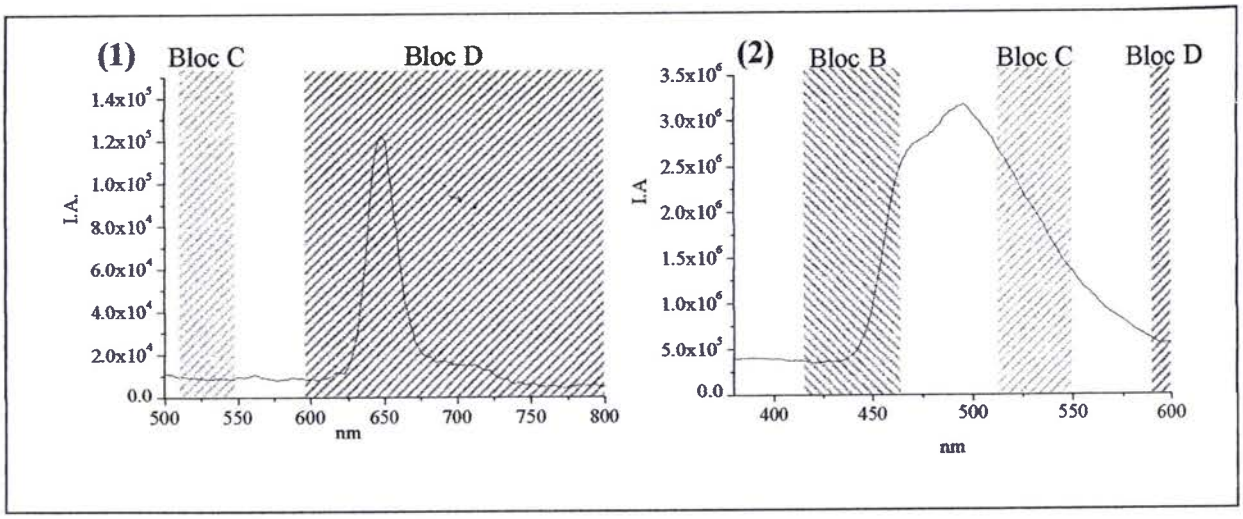


Figure III. 28. Spectre de fluorescence, plages d'émission du Foscan® (1) et du DPBF (2). Attribution des blocs (jeu de filtres) pour chaque composé.

Concernant le Foscan®, son pic d'émission étant à 650 nm, le bloc D a été retenu tandis que pour notre sonde, deux choix s'offrent à nous le bloc B et C permettant d'accéder à une gamme de 420 à 460 nm et 510 à 550 nm respectivement. Des essais, basés sur ces jeux de filtres, ont permis de retenir le bloc B comme le plus adéquat.

Ces analyses ont été effectuées sur deux lignées cellulaires : des cellules HT29 (cellules adénocarcinome du colon humain) et des cellules MCF7 (cellules adénocarcinome du sein humain). Ce dernier type de cellules possède une taille plus importante (environ 40 µm) que les HT29 (environ 10 µm) permettant une meilleure visualisation de l'internalisation des composés. Ainsi, dans un premier temps, nous avons procédé à une incubation cellulaire (t = 5 heures) HT29 et MCF7 avec à la fois l'agent photosensible Foscan® (5.10^{-6}M) et la sonde DPBF (10^{-4}M) dans un milieu (RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v) (Figure III.29.).

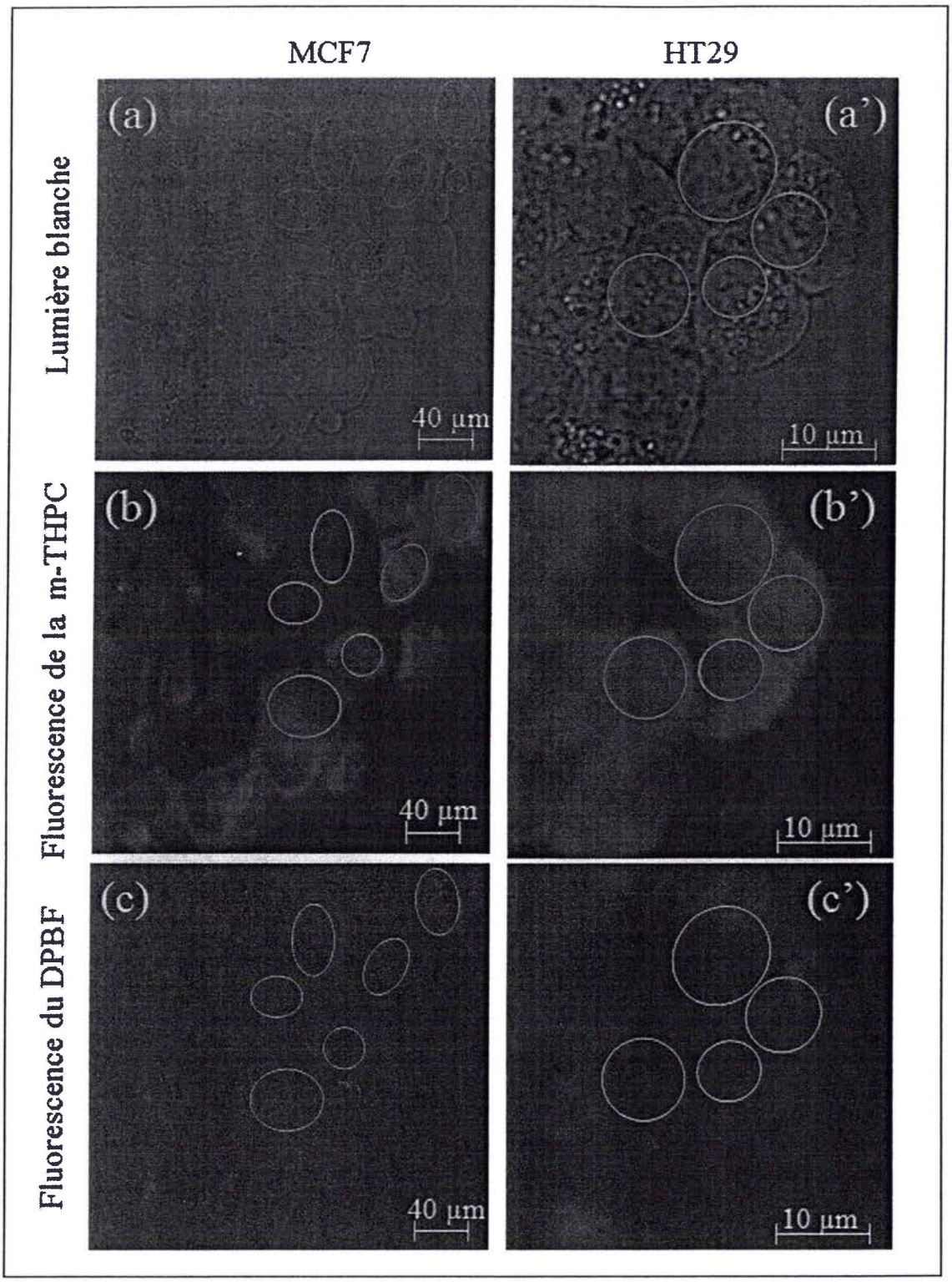


Figure III. 29. Images de microscopie à épifluorescence. Les Cellules MCF7 et HT29 incubées (t = 5 heures) avec un mélange m-THPC (5.10^{-6} M) / DPBF (10^{-4} M) (RPMI/SVF/ ETOH, 97/2/1). Observation des cellules MCF7 (a) et HT29 (a') par transmission (Lumière blanche), observation de la fluorescence de la m-THPC des cellules MCF7 (b) et HT29 (b') et observation de la fluorescence du DPBF des cellules MCF7 (c) et HT29 (c'). Les ellipses vertes correspondent à l'emplacement des cellules.

Pour les images relative à la fluorescence du Foscan®, les cellules sont photoirradiées par de la lumière bleu (λ_{exc} = 400-440 nm) à travers l'objectif du microscope. L'émission de fluorescence est recueillie à travers un filtre passe-haut (λ > 570 nm). La couleur rouge représente la fluorescence maximale de la *m*-THPC. L'image de Foscan® met en évidence une localisation préférentielle au niveau des membranes, laissant supposer qu'aux termes de l'incubation de 5 heures, le photosensibilisateur n'a eu le temps de diffuser qu'au niveau des bicouches phospholipidiques de la membrane cellulaire. Par ailleurs de récents travaux ont montré la migration du Foscan® vers les cibles privilégiées que sont l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique[57] mais cela au bout de 24 heures d'incubation.

Pour les images relatives au DPBF, les cellules sont photoirradiées par de la lumière bleu (λ_{exc} = 330-385 nm) à travers l'objectif du microscope. L'émission de fluorescence est recueillie à travers un filtre passe-haut (λ > 400 nm). La couleur bleue (λ_{em} = 420-460) représente la fluorescence maximale de la sonde DPBF. Nous pouvons discerner une localisation en périphérie de la cellule au niveau membranaire ainsi qu'une localisation plus diffuse dans la cellule sous forme granulaire. L'acquisition s'est faite en mode manuel car notre sonde était sujette à un rapide photoblanchiment, la perte de fluorescence se faisant en moins d'une seconde après photoirradiation en lumière bleue. Il est à noter qu'une modification des filtres influençant le contraste et l'intensité recueillie ne nous a pas permis d'améliorer de façon significative la netteté de l'image.

Ces premiers résultats par microscopie à épifluorescence laisse à penser que les deux composés à savoir le photosensibilisateur *m*-THPC et la sonde DPBF sont bien internalisés par les cellules HT29 et MCF7 après 5 heures d'incubation. Ces résultats sont d'autant plus fiables que l'on a effectué pour chaque échantillon un lavage au RPMIc et trois lavages au PBS et que les composés n'aient pas été retrouvés en solution suite à des études menées sur celle-ci par fluorescence et spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS.

Cependant alors que l'internalisation de la m-THPC est bien établie, le fait de distinguer, sur les images concernant la sonde DPBF, des granules et du fait du manque de contraste et d'intensité, nous avons émis des réserves sur la bonne internalisation de notre sonde DPBF. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude spécifique par spectrométrie de masse

[57] (48) Teiten M.H.; Bezdetnaya L.; Morliere P.; Santus R.; Guillemin F. *Br J Cancer* **2003**, *88*, 146-152.

Pour les images relative à la fluorescence du Foscan®, les cellules sont photoirradiées par de la lumière bleu (λ_{exc} = 400-440 nm) à travers l'objectif du microscope. L'émission de fluorescence est recueillie à travers un filtre passe-haut (λ > 570 nm). La couleur rouge représente la fluorescence maximale de la *m*-THPC. L'image de Foscan® met en évidence une localisation préférentielle au niveau des membranes, laissant supposer qu'aux termes de l'incubation de 5 heures, le photosensibilisateur n'a eu le temps de diffuser qu'au niveau des bicouches phospholipidiques de la membrane cellulaire. Par ailleurs de récents travaux ont montré la migration du Foscan® vers les cibles privilégiées que sont l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique[57] mais cela au bout de 24 heures d'incubation.

Pour les images relatives au DPBF, les cellules sont photoirradiées par de la lumière bleu (λ_{exc} = 330-385 nm) à travers l'objectif du microscope. L'émission de fluorescence est recueillie à travers un filtre passe-haut (λ > 400 nm). La couleur bleue (λ_{em} = 420-460) représente la fluorescence maximale de la sonde DPBF. Nous pouvons discerner une localisation en périphérie de la cellule au niveau membranaire ainsi qu'une localisation plus diffuse dans la cellule sous forme granulaire. L'acquisition s'est faite en mode manuel car notre sonde était sujette à un rapide photoblanchiment, la perte de fluorescence se faisant en moins d'une seconde après photoirradiation en lumière bleue. Il est à noter qu'une modification des filtres influençant le contraste et l'intensité recueillie ne nous a pas permis d'améliorer de façon significative la netteté de l'image.

Ces premiers résultats par microscopie à épifluorescence laisse à penser que les deux composés à savoir le photosensibilisateur *m*-THPC et la sonde DPBF sont bien internalisés par les cellules HT29 et MCF7 après 5 heures d'incubation. Ces résultats sont d'autant plus fiables que l'on a effectué pour chaque échantillon un lavage au RPMIc et trois lavages au PBS et que les composés n'aient pas été retrouvés en solution suite à des études menées sur celle-ci par fluorescence et spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS.

Cependant alors que l'internalisation de la m-THPC est bien établie, le fait de distinguer, sur les images concernant la sonde DPBF, des granules et du fait du manque de contraste et d'intensité, nous avons émis des réserves sur la bonne internalisation de notre sonde DPBF. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude spécifique par spectrométrie de masse

[57] (48) Teiten M.H.; Bezdetnaya L.; Morliere P.; Santus R.; Guillemin F. *Br J Cancer* **2003**, *88*, 146-152.

MALDI-TOF/MS sur la mise en évidence de l'internalisation de la sonde DPBF au sein de cellules HT29 en employant en particulier la digitonine comme "perméabilisant" de membranes cellulaires.

8. Etude par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS de l'internalisation de la sonde DPBF au sein de cellules HT29

Afin de confirmer ou d'infirmer l'internalisation de la sonde DPBF au sein des cellules HT29, nous avons utilisé la digitonine ($C_{56}H_{92}O_{29}$), composé appartenant à la famille des saponines, qui possèdent les propriétés détersives et la capacité de lyser des cellules (Figure III.30.). La digitonine est utilisée en outre pour perméabiliser des membranes cellulaires[58]. Cette perméabilisation favorise la formation de pores par complexation de la digitonine et du cholestérol de la membrane cellulaire[59], ayant pour conséquence de désordonner la structure de la bicouche lipidique. Les effets perméabilisant de la digitonine sont relativement spécifiques aux membranes plasmiques en raison de leur taux plus élevé de cholestérol (par rapport aux phospholipides), tandis que les membranes mitochondriales et du réticulum endoplasmique, ayant un taux de cholestérol inférieur par rapport aux phospholipides, sont moins sensibles au détergent.

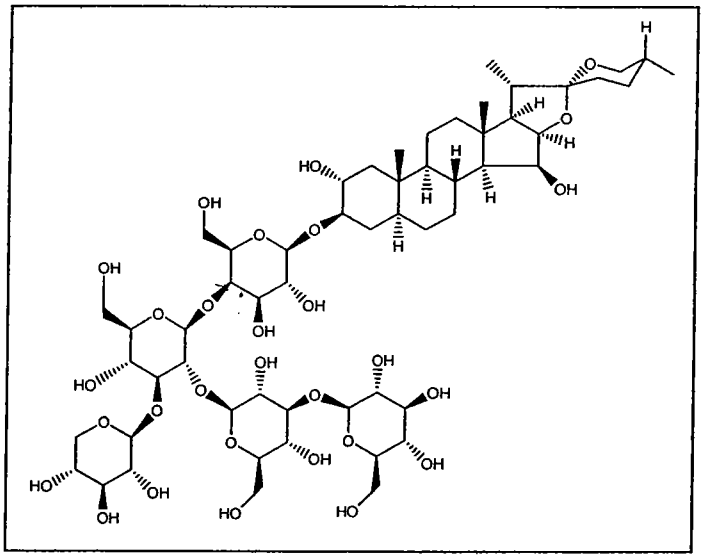


Figure III. 30. Structure de la digitonine ($C_{56}H_{92}O_{29}$), détergent non ionique permettant la perméabilisation des membranes cellulaires.

58 (49) L.A. Dunn; R.W. Holz *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 4989-4993.
59 (50) A. D. Bangham; R. W. Horne *Nature* **1962**, *196*, 952-953.

Nous avons utilisé une concentration égale à 6,875 ng/mL en digitonine afin de permettre la diffusion vers l'extérieur des cellules cancéreuses d'une partie du milieu cellulaire sans pour autant entraîner la mort cellulaire.
La mise en évidence de cette perméabilisation membranaire s'est effectuée au moyen d'un colorant, le bleu trypan (0,4%), l'ajout de cette solution permettant de visualiser par microscopie les cellules mortes ou les cellules dont la membrane cellulaire est lésée.

La question importante, nous le rappelons ici, était de savoir si la sonde DPBF (sonde moléculaire spécifique à la présence de l'oxygène moléculaire singulet), lors du temps d'incubation est bien internalisée au sein des cellules HT29. Pour essayer de répondre à cette question, nous avons procédé à une incubation (5h00) de la sonde DPBF (27 µg/mL), en milieu RPMI/SVF/ETOH (97/2/1) et en présence de cellules HT29 (Figure III.31.). Suite aux 5h00 d'imprégnation, le milieu de culture est recueilli (Solution S1) et analysé par MALDI-TOF/MS. Puis, nous avons procédé à 4 lavages au RPMI, chacune des solutions de lavages (S2, S3, S4 et S5) étant récupérées pour subir une analyse par spectrométrie de masse. A cet instant, la démarche va comporter deux lots de cellules.

- Le premier, celui de référence, va être mis en présence de RPMI pendant le temps de croissance des cellules. Lorsque ce temps est écoulé, nous récupérons le milieu (S6) pour analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS. Nous effectuons alors deux nouveaux lavages (S7 et S8) et soumettons également ces deux solutions de lavage à des analyses par TOF-MS.

- Le deuxième lot de cellules, quant à lui, est traité à la digitonine. Lorsque ce temps est écoulé, nous récupérons le milieu (S6*) pour analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS. Nous effectuons alors deux nouveaux lavages (S7* et S8*) et soumettons également ces deux solutions de lavage à des analyse par TOF-MS.

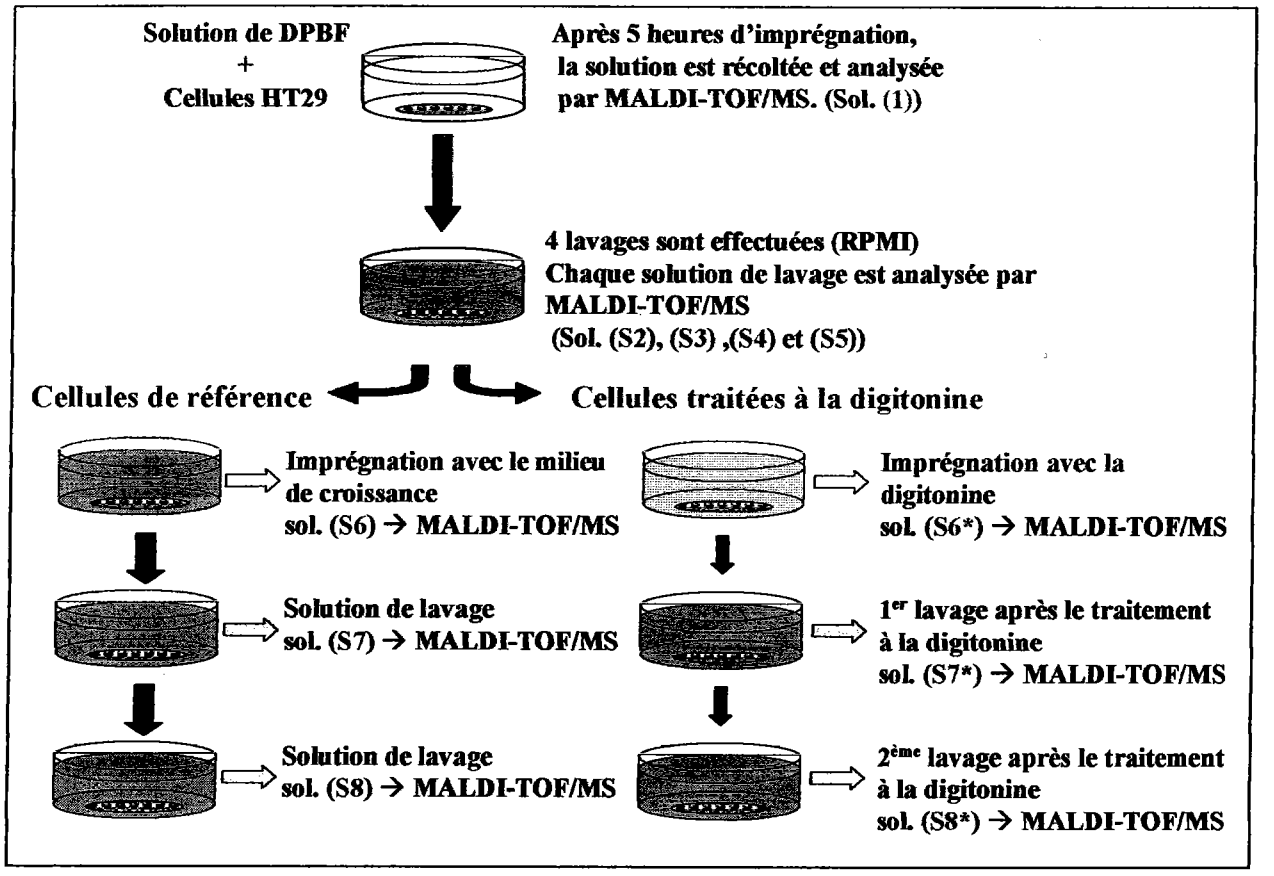


Figure III. 31. Protocole pour l'étude de l'internalisation de la sonde DPBF au sein des cellules HT 29

Pour cette étude, nous avons analysé la solution initiale d'incubation dans laquelle se trouve la sonde DPBF et les différentes solutions de lavages effectuées par les tampons RPMI et PBS (Figure III.31.). Un volume de 0,5 µL de chaque solution recueillie a été mélangée à 0,5µL de matrice 2,5 DHB (eau/acétonitrile, 30/70) à 10^{-2} M afin d'être déposée en mélange intime sur la plaque d'échantillonnage MALDI. Les dépôts obtenus, étaient d'une très grande homogénéité et l'énergie du laser d'ionisation fut maintenue constante tout au long des analyses.

En premier lieu, nous retrouvons lors de l'analyse de la solution d'incubation le profil de masse spécifique à la sonde DPBF à savoir l'ion m/z 270,22 relatif à l'espèce $[DPBF]^{\bullet+}$ et la distribution isotopique en carbone ^{13}C (Figure III.32.). Puis, après l'étape d'incubation de 5 heures, les analyses des solutions obtenues suites aux 4 lavages successifs des cellules par le tampon PBS révèlent une diminution des signaux au fur et à mesure du nombre croissant des

En ce qui concernent le lot ayant subit un traitement à la digitonine, nous avons analysé la solution initiale d'incubation dans laquelle la sonde DPBF était présente, la solution de perméabilisation (S6*) obtenue suite à l'ajout de digitonine dans le milieu de culture et les solutions de lavages (S2, S3, S4, S5, S7* et S8*) (Figure III.33.). Les analyses par MALDI-TOF/MS se sont effectuées selon le même mode opératoire que précédemment.

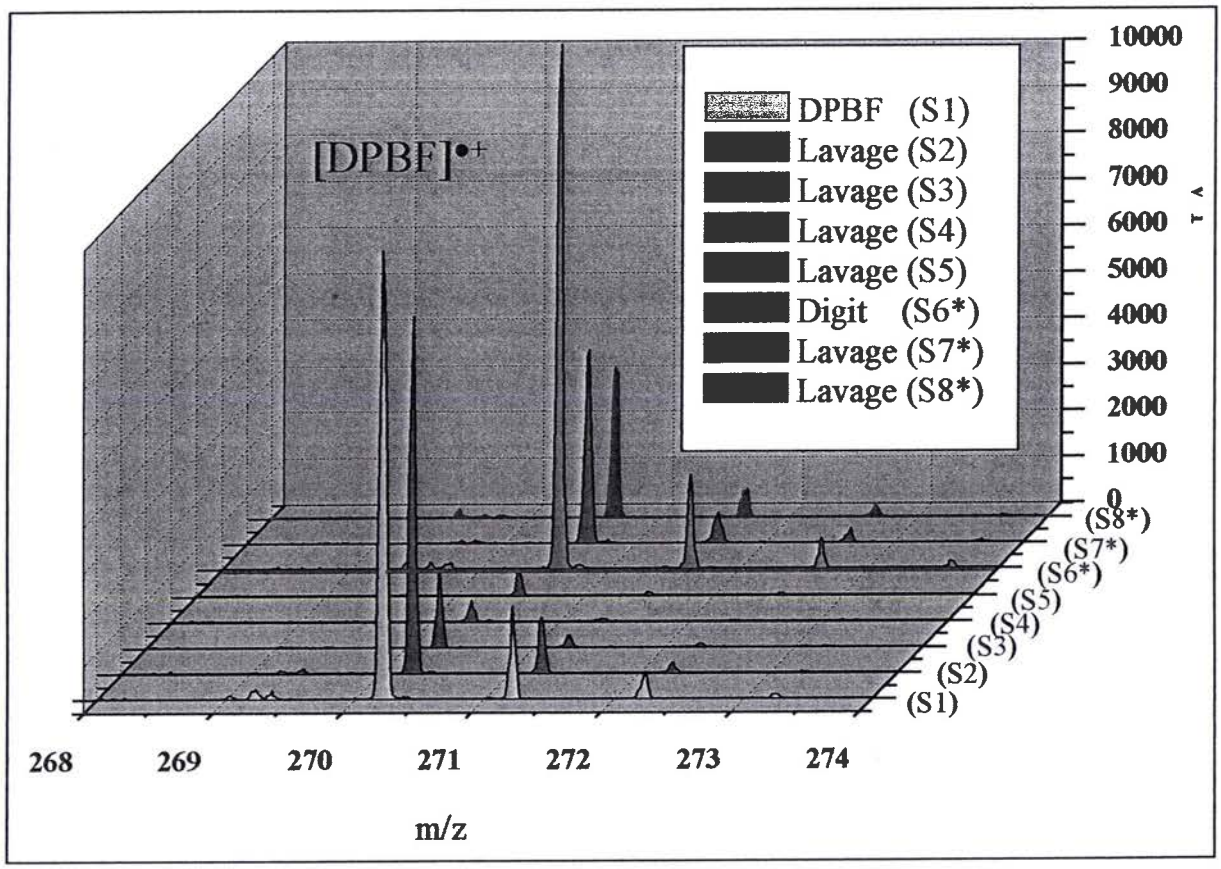


Figure III. 33. Cellules traitée à la digitonine. Spectres de masse MALDI-TOF/MS de la solution initiale d'incubation et des solutions de lavages avant et après le traitement par digitonine.

La solution d'incubation initiale laisse apparaître la présence de la sonde DPBF caractérisé par l'ion m/z 270,44 $[DPBF]^{\bullet+}$. Suite aux quatre lavages S2, S3, S4 et S5, la quantité en sonde DPBF dans le milieu de culture va en s'amenuisant pour atteindre une quantité est très faible suite au lavage S5.

Viennent ensuite les analyses effectuées sur la couche cellulaire HT29 après action de la digitonine. Dans un premier temps, après traitement à la digitonine, nous observons à nouveau le signal caractéristique de la sonde DPBF (Figure III.32., sol. S6*). Puis suite aux deux lavages par RPMI (sol. S7* et S8*), nous observons une décroissance du signal. Ainsi, nous pouvons affirmer grâce à cette étude, que la sonde DPBF est bien internalisée au sein des cellules HT29. L'utilisation de la spectrométrie de masse nous a aussi permis de lever l'ambiguïté et d'amener une réponse fiable et précise à un problème aussi complexe consistant à savoir si un composé est internalisé ou non dans le milieu intracellulaire.

Par conséquent, en nous basant sur la microscopie à épifluorescence et la spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS, il nous a été possible de valider la présence de la m-THPC et de la sonde DPBF au sein des cellules HT29. Aussi, tous les atouts sont réunis dorénavant afin d'appliquer la spectrométrie de masse quant à la détection *in situ* au sein des cellules intactes HT29 de l'oxygène moléculaire singulet en présence du photosensibilisateur m-THPC et de la sonde DPBF et ce avant et après illumination laser.

9. Mise en évidence de l'oxygène moléculaire singulet au sein de cellules intactes HT29 par spectrométrie de masse.

Suite aux études concernant la détermination de la localisation à la fois de la sonde DPBF et du photosensibilisateur m-THPC au niveau cellulaire, un point important de notre travail a été de savoir si nos composés internalisés étaient toxiques pour nos cellules. Pour répondre à cette question nous avons entrepris d'effectuer une étude de phototoxicité. Pour ce faire, nous avons effectué en étroite collaboration avec le Centre Alexis Vautrin un test MTT[60], cette acronyme correspondant au réactif utilisé : le sel de 3-[4,5-di**M**éthyl**T**hiazol-2-yl]-2,5-diphényl) **T**étrazolium bromide].

Le principe du test au MTT est basé sur la quantification indirecte du nombre de cellules viables à travers leur capacité métabolique à réduire, au niveau des mitochondries, le sel de tétrazolium en cristaux de formazan de couleur bleu-pourpre (Figure III.34.). La lecture par

[60] (51) Mosmann *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.

spectrophotométrie de la longueur d'onde relative au bleu de formazan (λ = 540 nm) permet la mesure rapide et précise de la réponse de cellules tumorales envers le traitement photodynamique[61].

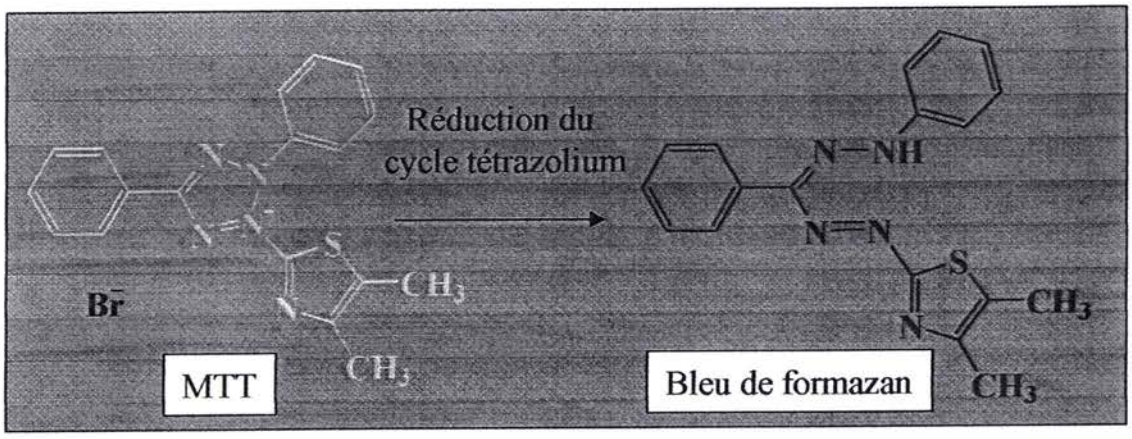


Figure III. 34. Métabolisation du MTT (couleur jaune) en formazan (couleur bleue) par les mitochondries des cellules vivantes actives.

Pour notre étude, des plaques 96 puits sont ensemencées à raison de 10^4 cellules/mL soit 2.10^3 cellules/puit. En phase exponentielle de croissance, les cellules sont incubées pendant 24 heures à 37°C sous 5% de CO_2, leur permettant d'adhérer au fond des puits (Figure III.35.).
A l'issu de cette incubation, les puits sont vidés et rincés, permettant l'incubation des cellules avec le photosensibilisateur *m*-THPC (10^{-5} M) et/ou le DPBF (10^{-4}M) solubilisés dans du milieu de croissance (RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v). L'efficacité photodynamique des composés ainsi sélectionnés a été évaluée avant et après illumination (λ = 655 nm) en utilisant le test au bromure de 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltétrazolium (MTT) (Sigma, St Quentin Fallavier, France).

61

(52) Merlin J. L.; Azzi S.; Lignon D.; Ramacci C.; Zeghari N.; Guillemin F. *Eur. J. Cancer* **1992**, *28A*, 1452-1458.

Outre les solutions *m*-THPC, DPBF et *m*-THPC/DPBF, il a été également étudié selon le même protocole, les solutions o-BB et o-BB/*m*-THPC ainsi que le milieu de croissance (RPMI/SVF, 91/9, v/v) et le milieu d'incubation seul (RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v). Chaque valeur de la figure (Figure III.36.) représente la moyenne de huit réplicats et l'écart-type entre ces réplicats est indiqué.

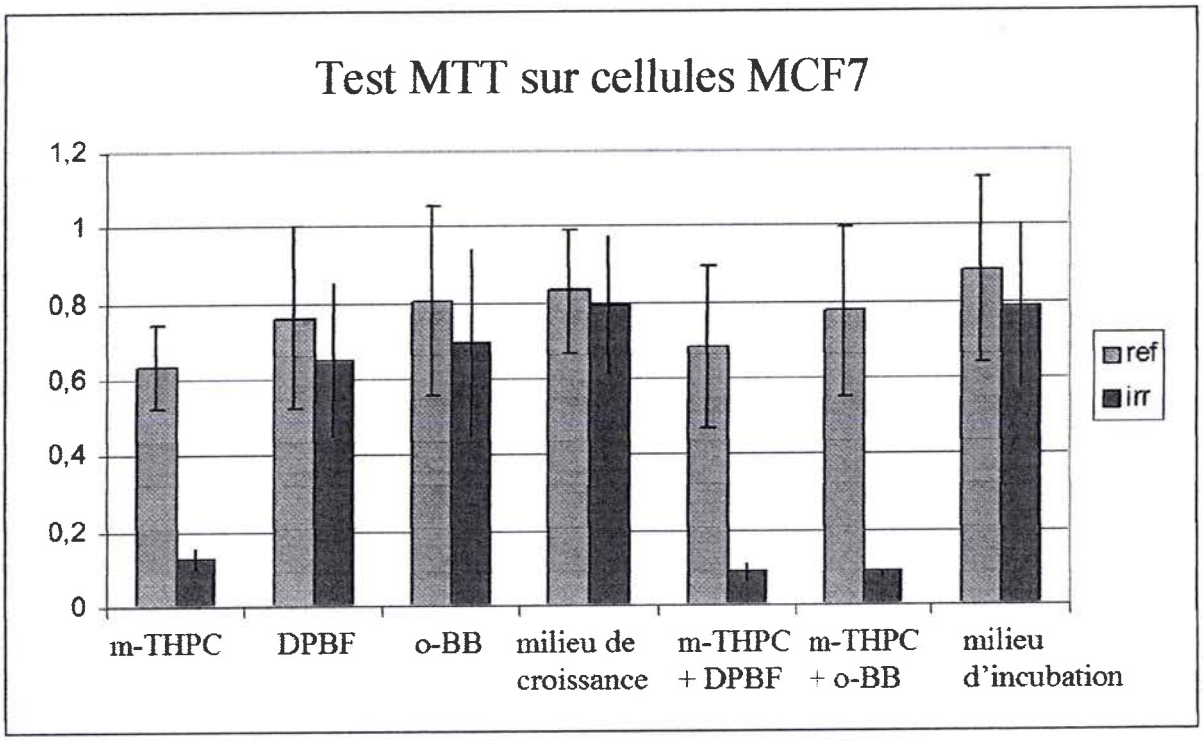


Figure III. 36. Test MTT effectué sur des cellules MCF7 incubées avant et après irradiation laser (λ = 655 nm).

Bien que les lavages (tampon PBS) de nos cellules aient été fait avec beaucoup de soins, il n'a été possible d'éviter une perte de matériel biologique qui se répercute sur les valeurs mesurées entraînant des valeurs notables d'écart type.

Nous pouvons constater sur l'histogramme relatif aux différents tests MTT que la phototoxicité avant et après illumination des composés DPBF et o-BB et des milieux de croissance et d'incubation est faible que ce soit avant ou après illumination laser avec toutefois une augmentation notable après illumination.

En ce qui concerne la phototoxicité du photosensibilisateur *m*-THPC, seul ou en présence de la sonde spécifique ou du produit o-BB, celle-ci est marquée avec une augmentation de la phototoxicité allant jusqu'à 80%. En ce qui concerne les deux derniers mélanges *m*-THPC / DPBF et m-THPC / o-BB, l'effet phototoxique est du exclusivement à la présence de photosensibilisateur *m*-THPC.

En conclusion, il s'avère que ni la sonde spécifique DPBF seul ni le composé o-BB seul ne sont phototoxique de manière significative suite à l'irradiation laser $\lambda = 655$ nm au niveau des cellules MCF7. De plus, le fait de mettre en présence à la fois la sonde DPBF et le photosensibilisateur Foscan® au sein de cellules MCF7 intactes ne change en rien le pouvoir phototoxique de l'agent photosensible. Aussi, dans le cas du mélange *m*-THPC/DPBF, la phototoxique est très importante bien que nous aurions pu espérer obtenir un effet moins prononcé dû à la présence de la sonde spécifique à oxygène moléculaire singulet DPBF. Bien que, au bout de 5 heures d'incubation, nous ayons observé la localisation de la *m*-THPC et du DPBF au niveau de la membrane cellulaire, il est envisageable que l'agent photosensible ait migré vers les mitochondries et que celles-ci aient subit des dégâts oxydatifs suffisant pour entraîner une inactivation lors de l'illumination laser à 655 nm[62].

Après ces travaux qui nous ont permis de déterminer d'une part que la sonde DPBF spécifique à l'oxygène moléculaire singulet est bien située à l'intérieur de la cellule et que d'autre part cette sonde ainsi que le produit o-BB ne possèdent pas de caractères phototoxiques au niveau cellulaire, nous avons logiquement procédé à l'analyse *in situ* de la sonde au sein de cellules intactes HT29 en présence du photosensibilisateur m-THPC, et ce avant illumination laser. Il s'est avéré dans un premier temps que le protocole d'échantillonnage standard n'a pas permis d'aboutir à une détection simultanée du photosensibilisateur Foscan® et de la sonde DPBF, ce dépôt par goutte sèche permet uniquement la détection du Foscan®. Le protocole d'échantillonnage par immersion a été ici utilisé avec comme matrice la 2,5DHB appliquée sur des lamelles recouvertes des cellules adhérentes HT29 ou MCF7.

---

[62] (53) V. O. Melnikova; L. N. Bezdetnaya; C. Bour; E. Festor; M. -P. Gramain; J. -L. Merlin; Potapenko, A. Y.; Guillemin, F. *J. Photochem. Photobiol. B/ Biol.* **1999**, *49*, 96-103.

Suite à ce protocole d'échantillonnage MALDI-TOF, l'analyse *in situ* de cellules intactes HT29 en présence du photosensibilisateur m-THPC et de la sonde spécifique DPBF, et ce avant illumination laser a permis d'obtenir le spectre de masse suivant (Figure III.36.):

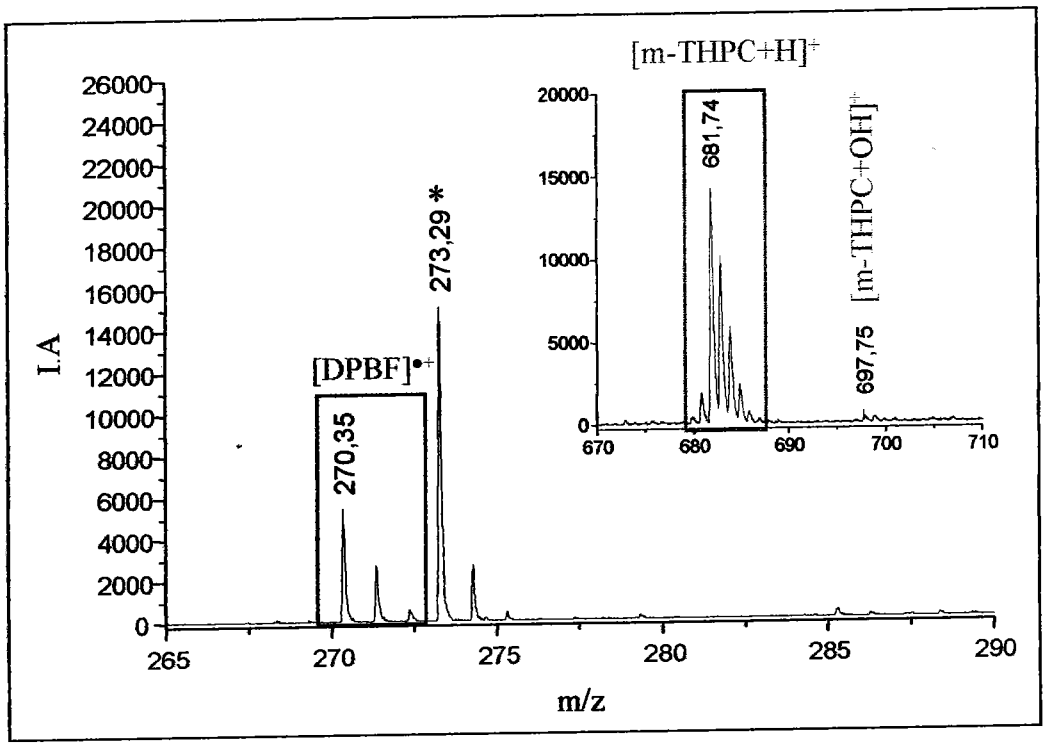


Figure III. 37. Analyses par MALDI-TOF/MS de cellules intactes HT29 en présence de m-THPC et DPBF avant illumination laser. (L'astérisque correspond à un adduit de la matrice 2,5 DHB (ACN/H2O, 7/3, v/v; 0,1 TFA) déposé en mode coulé)

La figure II.37. indique la présence des pic de masse m/z 270,35 et 681,74 qui sont respectivement caractéristiques de la sonde DPBF et du photosensibilisateur Foscan®. Notre technique MALDI-TOF/MS nous offre ici la possibilité de "visionner" en une seule fois sur un même spectre de masse la sonde et le photosensibilisateur et ce sans aucune ambiguïté.

Suite à l'illumination laser (λ= 652 nm, F= 10 J) de cellules issues du même lot, le spectre de masse obtenu (Figure III.38.) indique la présence du pic de masse 287,35 qui est la signature de la formation du produit o-BB, qui est issu de la réaction de l'oxygène moléculaire singulet avec la sonde DPBF.

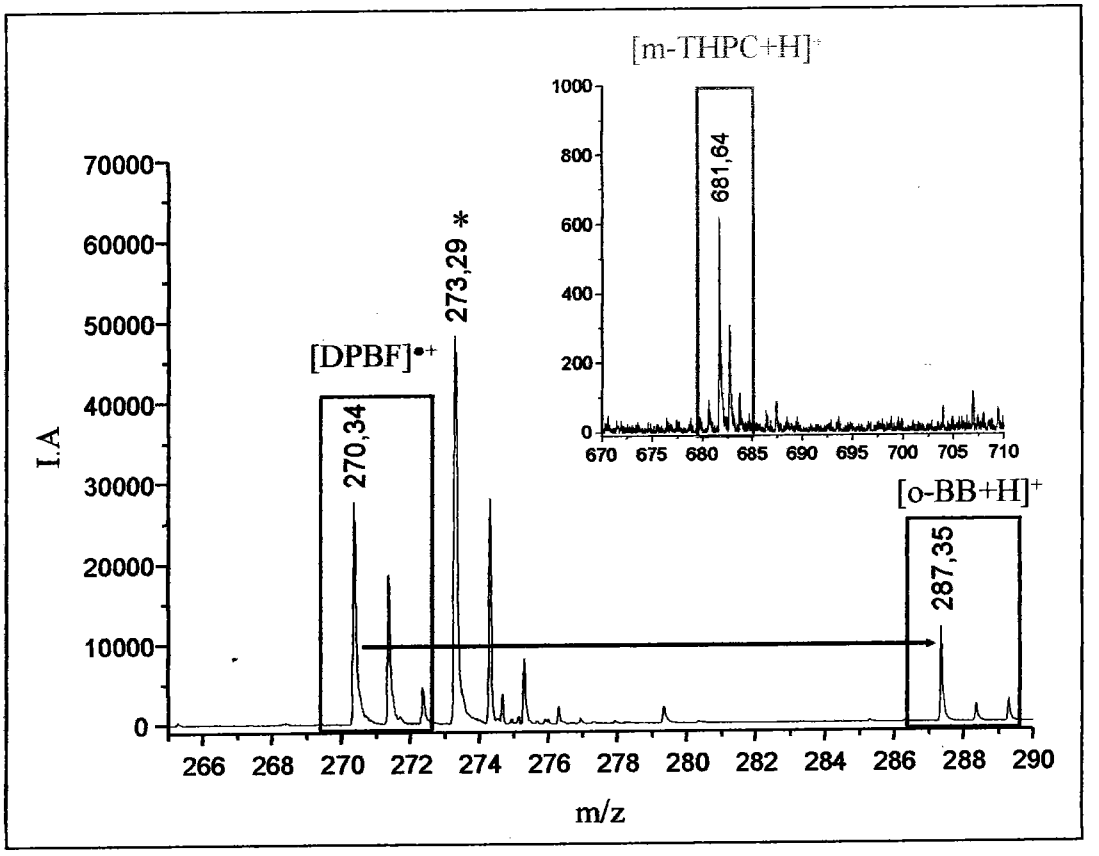


Figure III. 38. Analyses par MALDI-TOF/MS de cellules intactes en présence de m-THPC et DPBF après illumination laser (λ=652 nm, F = 10 J, temps illumination 40 min) L'astérisque correspond à l'adduit [Ma+K]+ de matrice 2,5 DHB (ACN/H2O, 7/3, v/v; 0,1 TFA) déposé en mode coulé.

Ainsi, ce protocole nous permet de déterminer in situ et sans aucune étape intermédiaire (lyse cellulaire, purification et mise en solution) la formation d'oxygène moléculaire singulet suite à l'illumination laser de l'agent photosensible m-THPC directement au sein de cellules intactes. A l'issu de cette étude par MALDI-TOF/MS, le Foscan®, le DPBF et de l'o-BB ont pu être mis en évidence simultanément sur un même spectre suite à une analyse de cellules entières après illumination laser, la détection de l'o-BB par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS mettent en évidence la génération in situ de d'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$.

Conclusion

Notre étude par spectrométrie de masse MALDI-TOF a non seulement permis de mettre en évidence la génération de l'oxygène moléculaire singulet en solution aqueuse mais également in situ au niveau de cellules intacte via la détection du produit issu de la réaction entre l'oxygène moléculaire singulet et notre sonde spécifique le DPBF. Ceci a pu être démontré sans ambiguïté à la fois par microscopie à épifluorescence et par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS avec l'utilisation de la digitonine comme perméabilisant membranaire.

La contribution de la spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS est indéniable et de tout premier ordre à ce niveau car elle permet de mettre en évidence des processus au sein même de cellules par le biais de composés internalisés. Cependant, comme nous l'avons vu, une démarche pointue et spécifique sur l'optimisation de l'échantillonnage MALDI (milieu de solvatation de la matrice, mode de dépôt) est incontournable.

Ces études effectuées sur les cellules intactes concernant la détection des composés DPBF et Foscan® nous ont conduit à poursuivre sur le suivi de la distribution en protéines par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS. Cette démarche s'articule sur deux axes :

1. L'étude de la distribution en protéines par analyse directe sur cellules intactes HT29 par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS avant et après illumination laser.

2. L'étude de la distribution en protéines après l'obtention d'un gel 2D effectué sur la lignée cellulaire HT29 suite à une illumination laser. Il s'agit ici d'effectuer une première approche protéomique concernant le ciblage des protéines susceptibles d'être sollicitées lors des processus de la thérapie photodynamique.

Chapitre IV

Etude par spectrométrie de masse de l'empreinte protéique dans le cadre de la thérapie photodynamique

- Approche protéomique -

TABLE DES MATIERES

1. Etude par MALDI-TOF/MS de la distribution des protéines directement sur cellules intactes 197

1.1.Etudes de monocouches cellulaires. 197

2. Etude par MALDI-FT-ICR/MS de la distribution de protéines - approche protéomique 209

2.1. la protéomique – définition 209

2.2. Les stratégies d'identification 209

2.2.1. Utilisation du mode de fragmentation ECD dans le cadre de l'étude protéomique Top-Down de la mélittine 212

2.2.2. Utilisation du mode de fragmentation IRMPD dans le cadre de l'étude protéomique Top-Down de la mélittine 214

2.3. La stratégie Bottom-Up 217

2.3.1. Les principes de la protéomique 217

2.3.1.1. Historique 217

2.3.1.2. Le gel d'électrophorèse bidimensionnel 218

2.3.1.3. Principe du gel 2D 219

2.3.1.4. Coloration des protéines 227

2.3.1.5. Analyse des gels 229

2.4. Stratégie d'identification des protéines 231

2.4.1. Les banques de données 231

2.4.2. Le moteur de recherche Mascot 232

2.4.3. Identification 237

2.4.4. Calibration des spectres de masses liées aux analyses en protéomiques 240

2.5. Analyses protéomiques appliquées à la thérapie photodynamique 245

2.6. Analyses protéomiques par spectrométrie de masse 251

2.6.1. Résultats de l'analyse 251

Chapitre IV

Etude par spectrométrie de masse de l'empreinte protéique dans le cadre de la thérapie photodynamique, Approche protéomique.

L'objectif de ce chapitre est de présenter les étapes qui nous ont conduis à l'observation d'empreinte protéique de cellules HT29 intactes suite à un traitement photodynamique d'une part et l'obtention des premiers résultats protéomiques acquis par spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions.

La première partie d ces recherches sur la distribution des protéines découle des travaux menés sur les composés internalisés à savoir le photosensibilisateur, le Foscan®, et la sonde DPBF spécifique à l'oxygène moléculaire singulet. Nous présenterons ici les résultats concernant les effets observés sur la distribution en protéines d'une illumination laser sur monocouche cellulaire HT29 en présence de Foscan® et/ou de la DPBF. Il est à noter ici, que les analyses sont effectuées par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS et directement sur cellules intactes.

La seconde partie de ces travaux concerne plutôt une approche protéomique, réalisée par spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions FT-ICR/MS après échantillonnage des protéines par gels dimensionnels. Ces derniers ainsi que toutes les étapes d'extraction et d'échantillonnage de la protéine on été effectuées au sein du Laboratoire de Spectrométrie de masse Bio-organique (ECPM-LSMBO) à Strasbourg du le Pr. Alain Van Dorsselaer

Ces études s'inscrivent dans la recherche de l'identification des protéines impliqués dans les processus photodynamiques et ainsi permettre de cibler efficacement la ou les organites cellulaires impliqués dans la mort cellulaire.

1. Etude par MALDI-TOF/MS de la distribution des protéines directement sur cellules intactes

Ces recherches s'insèrent dans la continuité des travaux initiés lors de l thèse de Mademoiselle Natacha Lourette concernant l'utilisation de la spectrométrie de masse afin de différencier plusieurs types de lignées cellulaires[1]. L'objectif de nos travaux est d'observer la distribution des protéines suite à l'analyse de cellules intactes ayant subit un traitement PDT, avec le Foscan® comme photosensibilisateur. Nos premières observations concernant la distribution des protéines cellulaires se sont portées sur une plage de masse de 4 à 20 kDa. Pour renforcer la précision en masse de nos analyses, nous avons eu recours à une calibration externe basée sur un mélange de trois protéines que sont l'insuline bovine (MM = 5729,6 $g.mol^{-1}$), d'ubiquitine (MM = 8560 $g.mol^{-1}$) et de cytochrome C de bœuf (MM = 12327 $g.mol^{-1}$).

Une des difficultés apparaissant lors des analyses d'échantillons biologiques par spectrométrie de masse MALDI-TOF est la présence excessive de sels. A trop forte concentration, ceux-ci gênent la cristallisation du dépôt MALDI, entraînant une perte du signal et conduisant la formation d'adduits de matrice. Afin de parer à ce problème, il a été décidé de pratiquer à un lavage des monocouches cellulaires à l'eau froide. En ce qui concerne les analyses préliminaires concernant la calibration, celle-ci s'est faite en échantillonnant les calibrants sur la lamelle de verre, support utilisé pour l'analyse des monocouches cellulaires. L'insuline bovine et d'ubiquitine à 2g/mL et le cytochrome C de bœuf à 10g/mL ont été solubilisés dans de l'eau ultrapure donnant lieu à des solutions d'insuline bovine, d'ubiquitine et de cytochrome C de $3,5.10^{-4}$ M, $2,3.10^{-4}$ M et $8,1.10^{-4}$ M respectivement.

[1] (1) N. Lourette *Thèse de l'université Paul Verlaine, Metz* **2004**.

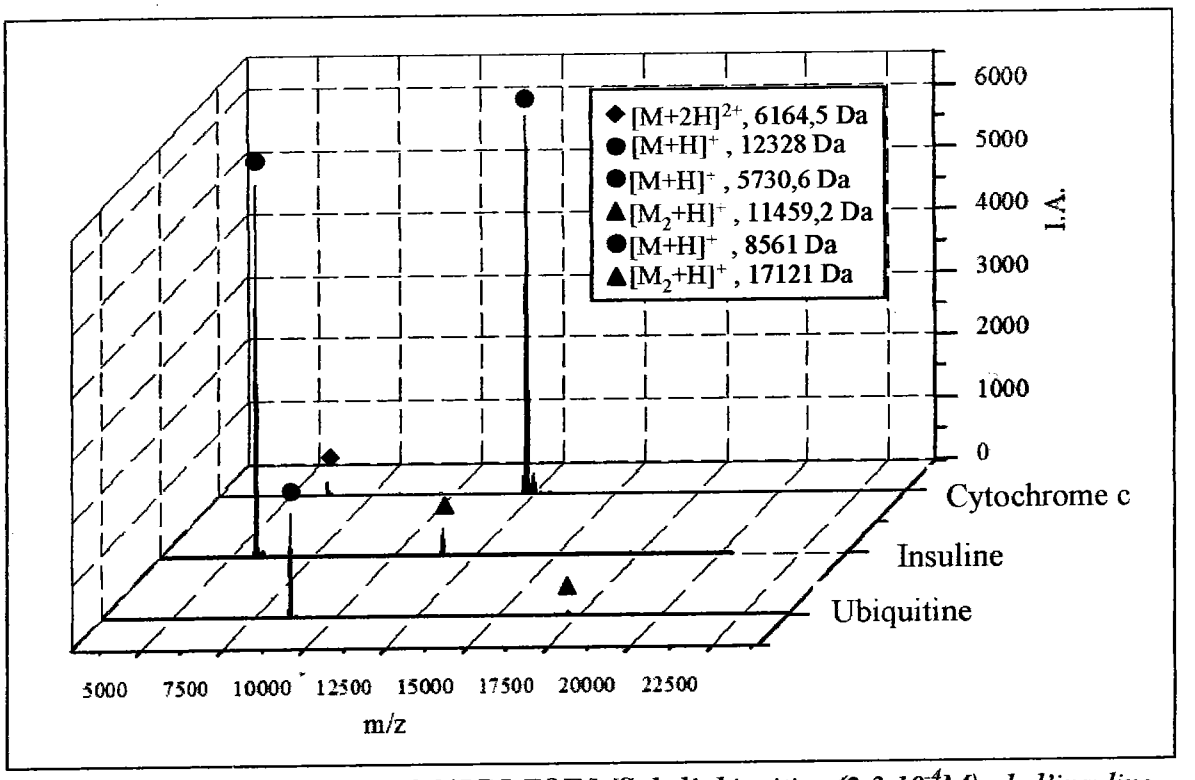


Figure IV. 1. Spectre de masse MALDI-TOF/MS de l'ubiquitine ($2,3.10^{-4}$M), de l'insuline bovine ($3,5.10^{-5}$M) et du cytochrome C de bœuf ($1,4.10^{-4}$M). (Dépôt en mélange intime avec comme matrice l'acide sinapinique CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v)

L'intensité des pics de masse de l'insuline et du cytochrome C sont obtenu par MALDI-TOF/MS (mélange intime par utilisation d'une solution saturée d'acide sinapique ; CH_3CN/H_2O, 3/7 ; v/v) à partir de ces solutions mères étant déjà trop importante par rapport à celle du pic de l'ubiquitine nous avons procédé à une dilution au dixième pour la solution d'insuline ($3,5.10^{-5}$ M) et au cinquième pour le cytochrome C ($1,4.10^{-4}$ M) (Figure IV.1.). Le cytochrome C est caractérisé par l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ et l'ion bichargé $[M+2H]^{2+}$ respectivement à m/z 12328 et m/z 6164,5 Da. En ce qui concerne l'ubiquitine et l'insuline, celles-ci sont caractérisées par l'ion pseudo moléculaire $[M+H]^+$ et l'ion dimère $[M_2+H]^+$ à m/z 8561 Da et m/z 17121 Da pour l'ubiquitine; m/z 5730,6 Da et m/z 11459,2 Da pour l'insuline bovine.

Bien que les concentrations utilisées permettent d'aboutir à des spectres de masse exploitables dans le cadre de solutions standard, celles-ci ne sont plus appropriées dans le cas de mélanges car la réponse spectrale varie notamment selon l'affinité protonique de chaque analyte. Afin d'optimiser les concentrations de chaque protéine, nous avons entrepris d'observer leur

comportement dans le cas de mélanges binaires. Nous avons ainsi réalisé pour cette étude les mélanges binaires ubiquitine/cytochrome C et insuline/cytochrome C.

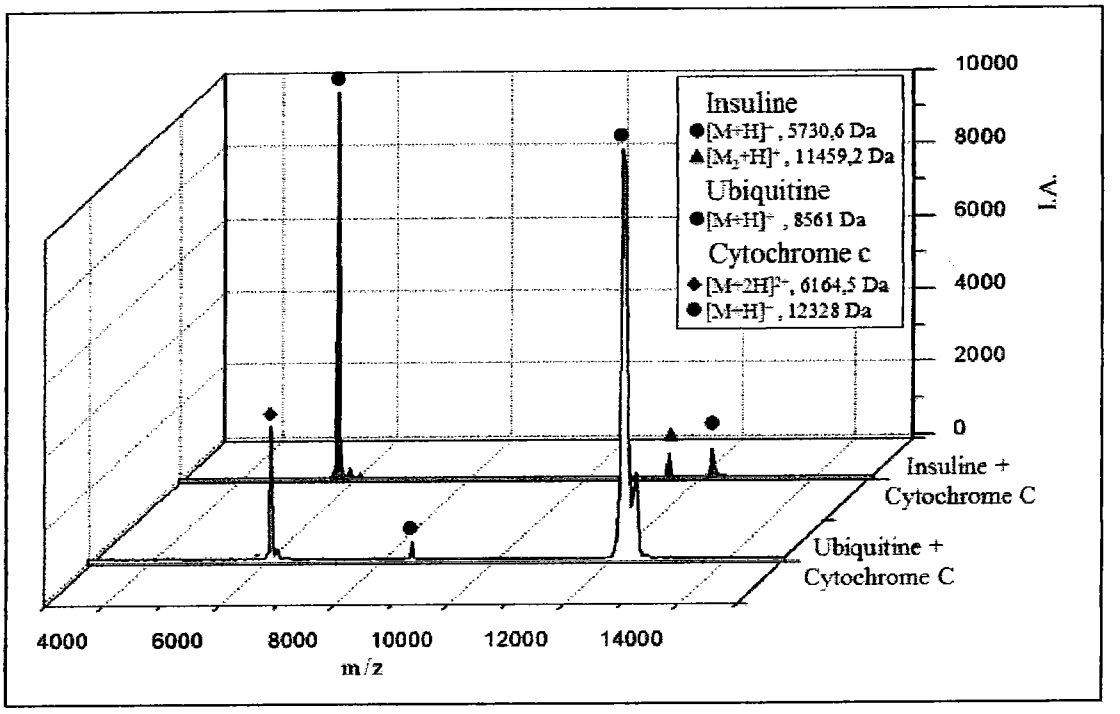


Figure IV. 2. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange binaire ubiquitine ($2,3.10^{-4}$M) / cytochrome C de bœuf ($4,1.10^{-5}$M) et insuline bovine ($1,8.10^{-5}$M) /cytochrome C de bœuf ($4,1.10^{-5}$M). (Dépôts en mélange intime avec comme matrice l'acide sinapinique CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v)

Pour le mélange binaire ubiquitine/cytochrome C obtenu à partir des concentrations relatives aux solutions standard ($2,3.10^{-4}$M et $1,4.10^{-4}$M) nous n'avons pas été en mesure d'obtenir une détection simultanée de nos deux analytes. Aussi, une dilution au vingtième de la solution mère du cytochrome C a été décidée ($4,1.10^{-5}$M) permettant dès lors de visualiser les deux calibrants sur le spectre de masse (Figure IV.2., spectre jaune). Malgré cela l'intensité du pic de masse du cytochrome C (●) reste majoritaire par rapport à celle du pic de masse de l'ubiquitine (●).

Pour le second mélange, insuline/cytochrome C, nous avons également procédé à une dilution de l'insuline afin que le rapport des concentrations soit semblable à ceux pour les analyses standard. Ayant dilué la solution mère de cytochrome C au vingtième, nous avons fait de même pour la solution mère de l'insuline aboutissant à des concentrations respectives de

$4,1.10^{-5}$ M et de $1,7.10^{-5}$ M. Le spectre de masse obtenu à partir de ce mélange est présenté ci-dessus (Figure IV.2., spectre orange). Il ressort de cette analyse que le pic de l'insuline (•) a une intensité bien plus élevée que celui de cytochrome C (•). Ce comportement est du à une différence d'affinité protonique des composés par rapport à la matrice (acide sinapinique) et d'autre part au ratio analyte/matrice concernant le dépôt.

En effet, la concentration d'insuline ($1,7.10^{-5}$ M) et de cytochrome C ($4,1.10^{-5}$ M) est inférieure à celle de l'ubiquitine ($2,3.10^{-4}$ M). Nous avons alors procédé à un nouvel ajustement des concentrations à savoir une dilution au cinquantième des solution mères d'insuline et de cytochrome C tout en gardant la même solution mère d'ubiquitine pour au final aboutir à au mélange insuline/ubiquitine/cytochrome C ($7,0.10^{-6}$M / $2,3.10^{-4}$M / $1,6.10^{-5}$ M) solubilisé dans de l'eau ultrapure (Figure IV.3.).

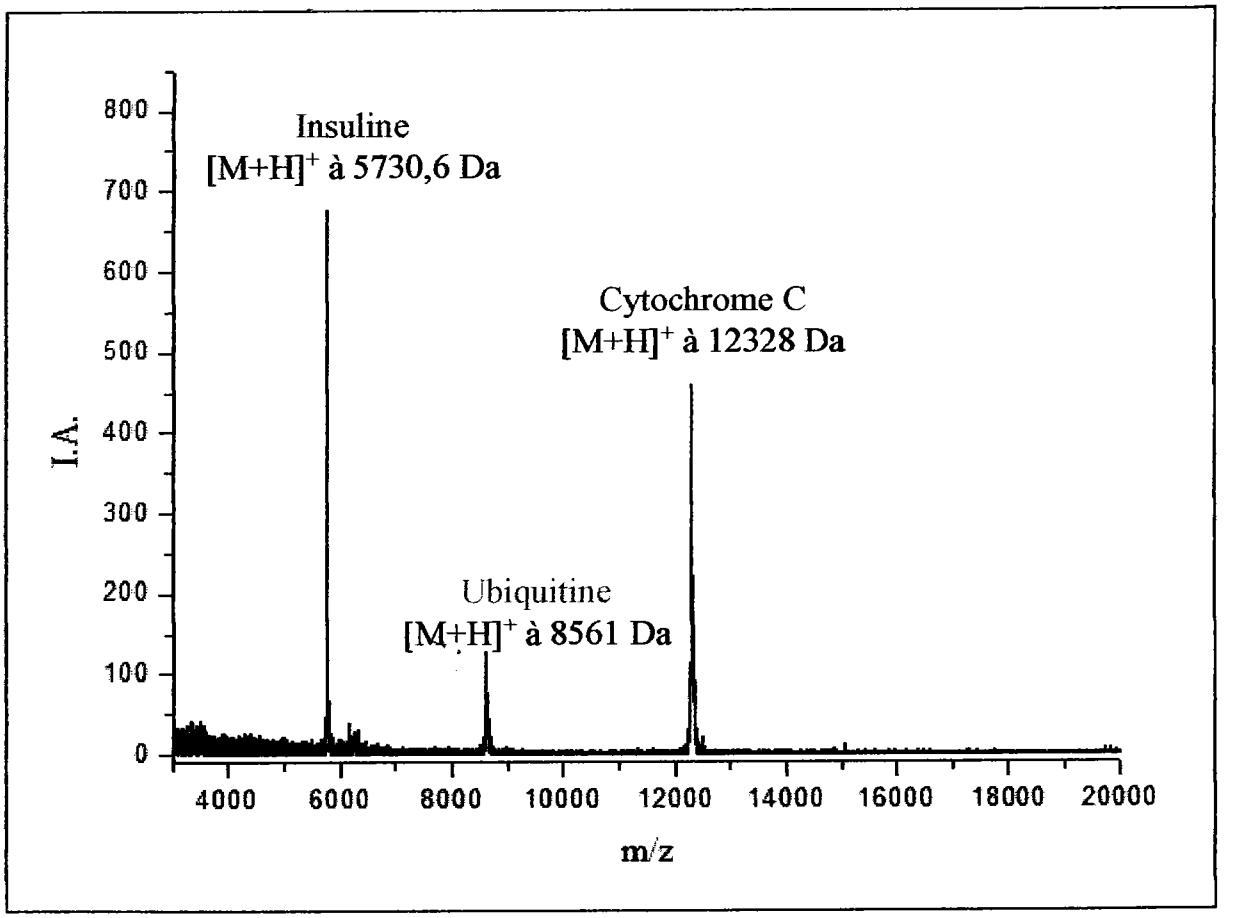


Figure IV. 3. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange ubiquitine/insuline bovine/cytochrome C de bœuf ($7,0.10^{-6}$M / $2,3.10^{-4}$M / $1,6.10^{-5}$M). (Dépôt en mélange intime comme matrice l'acide sinapinique CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v)

Sur le spectre de masse MALDI-TOF présenté figure IV.3., nous pouvons distinguer les pics relatifs aux ions protonés à m/z 5730,6, m/z 8651 et m/z 12328 relatifs à l'insuline, l'ubiquitine et le cytochrome C avec des intensités pour chacun des pics de masse suffisante pour permettre leur utilisation dans le cadre d'une calibration adéquate lors des analyses futurs de cellules intactes afin d'en étudier la distribution en protéines.

Afin de mettre en place la calibration interne, 10 µL du mélange optimisé des trois protéines insuline bovine/ubiquitine/cytochrome C ($7{,}0.10^{-6}$ M / $2{,}3.10^{-4}$ M / $1{,}6.10^{-5}$ M) a été ajouté à de 990 µL d'eau ultrapure permettant d'obtenir une solution finale insuline bovine/ubiquitine/cytochrome C ($7{,}0.10^{-7}$ M / $2{,}3.10^{-5}$ M / $1{,}6.10^{-6}$ M). Un microlitre de ce mélange et un microlitre de la matrice sinapinique (CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v) sont alors disposés en mélange intime sur la monocouche cellulaires HT29 après quoi l'analyse par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS est effectuée (Figure IV.4.).

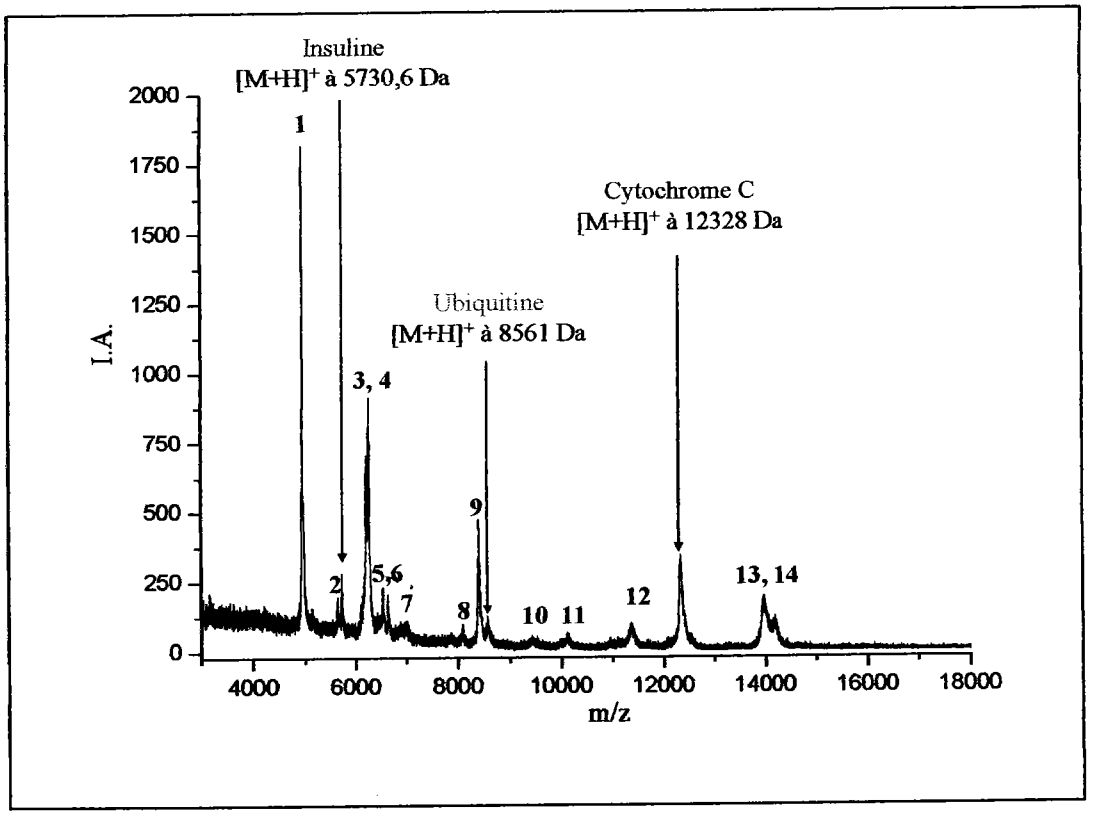


Figure IV. 4. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange insuline bovine/ubiquitine/cytochrome C de bœuf ($7{,}0.10^{-7}$M / $2{,}3.10^{-5}$M / $1{,}6.10^{-6}$M) déposé sur une monocouche cellulaire HT29. (Le mélange de protéines et la matrice avec de l'acide sinapinique (CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v) étant déposés en mélange intime)

Comme nous pouvons voir sur le spectre de masse indiquée sur la figure IV.4., nous retrouvons les ions caractéristiques des trois protéines insuline, ubiquitine cytochrome C respectivement à m/z 5730,6, à m/z 8561,62 et à m/z 12328. De plus, nous pouvons discerner sur ce même spectre jusqu'à quatorze pics de masse dont les masses ont été relevées après calibration interne (Tableau IV.1.).

Pics de masse	m/z
1	4955,49
2	5652,12
Insuline	5730,60
3	6212,17
4	6266,24
5	6534,48
6	6636,80
7	6968,71
8	8084,66
9	8394,43
Ubiquitine	8561,00
10	9421.52
11	10109,36
12	11366,24
Cytochrome C	12328,00
13	13989,11
14	14207,03

Tableau IV. 1. Masses des protéines détectées lors des analyses par MALDI-TOF/MS d'une monocouche cellulaire HT29 après calibration interne du spectre.

Ces différents ions correspondant à différentes protéines pour lesquelles la seule information les concernant ici disponible est la masse. Néanmoins, la détermination exacte de celles-ci va s'avérer utile par la suite lorsque nous étudierons le comparatif concernant la distribution de ces mêmes protéines avant et après illumination laser.

1.1.Etudes de monocouches cellulaires.

Echantillonnage sur lamelles de verre, les monocouches cellulaires HT29 sont alors étudiées afin de mettre en évidence par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS l'effet du traitement PDT au niveau de la distribution des protéines.

Pour mener à bien ces analyses, nous avons eu recours aussi bien à la matrice 2,5 DHB qu'à la matrice acide sinapinique, qui se sont avérées toutes deux adéquates pour l'analyse de protéines et de composés de hauts poids moléculaires, les dépôts étant réalisés par déposition de 1µL de matrice (1 M, ACN/H_2O, 60/40, v/v) sur les cellules en monocouche fixées sur lamelle de verre.

Les résultats des analyses relatives aux cellules HT29 incubées en présence de Foscan® et de sonde DPBF avant et après illumination laser sont présentés ci-dessous (Figure IV.5.). Dans la partie supérieure de la figure, nous voyons deux spectres de masses : le spectre bleu (accumulation de 20 spectres) issu de l'analyse de la monocouche cellulaire avant irradiation, le spectre rouge (accumulation de 20 spectres) issu de l'analyse de cellules intactes après irradiation. Afin de favoriser la comparaison de la distribution des différents pics de masse, nous avons eu recours à une représentation (partie inférieure de la figure) en simili gel 2D (Logiciel Clinprot, Bruker Daltonics, Allemagne).

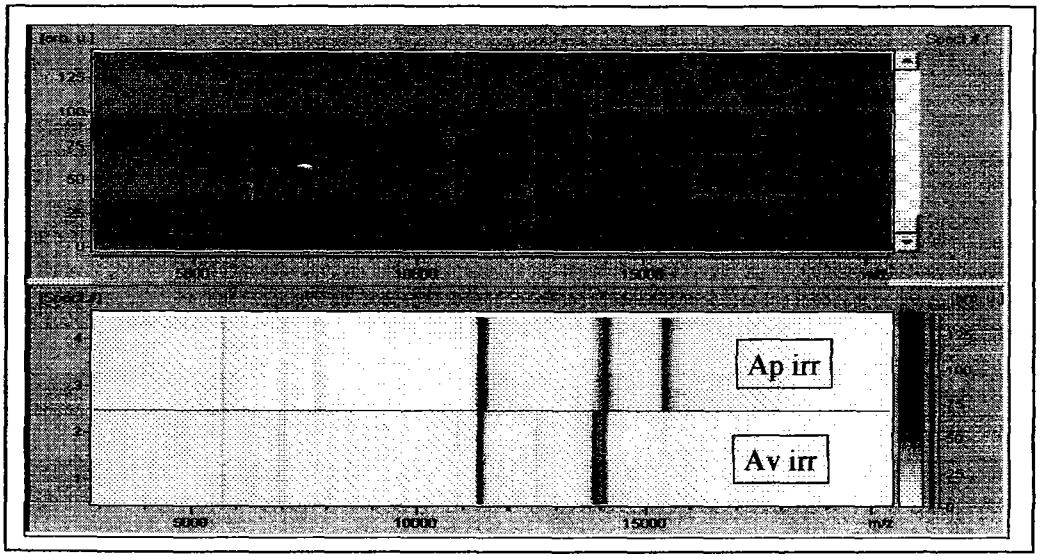


Figure IV. 5. Distribution des protéines au sein de cellules intactes en présence de m-THPC et DPBF avant et après illumination laser (λ=652 nm, 10 J/cm², temps illumination 40 min)

Cependant, des modifications sont visibles. Concernant les cellules HT29, nous pouvons remarquer qu'il a une évolution de certains pics de masse. c'est le cas notamment pour le pic de masse centré sur la masse 9300. En effet celui-ci est présent sur les spectres issus de l'analyse par MALDI-TOF/MS de cellules seules et de cellules incubées avec le mélange m-THPC/DPBF. Or il est de plus faible intensité sur le spectre de masse issu de l'analyse des cellules incubées en présence uniquement de m-THPC. Ainsi, nous pouvons avancer l'idée que cette ou ces protéines dont la masse est centrée sur 9300 sont sujettes à l'action de l'oxygène moléculaire singulet.

En effet, comme nous l'avons prouver précédemment le m-THPC est générateur d'oxygène singulet suite à une illumination laser et ce dernier réagit avec notre sonde spécifique DPBF.

Ainsi, le fait de la diminution significative du pic de masse m/z 9300 au sein des cellules incubées avec le photosensibilisateur et la présence de ce même pic sur le spectre des cellules incubées avec le mélange m-THPC/DPBF indiquerait :

- d'une part que l'oxygène singulet interagirait avec la ou les protéines de masse centrée(s) sur 9300.
- et d'autre part que l'action de $^1O_2$ serait inhibée en partie suite à l'ajout de la sonde DPBF.

Le même raisonnement peut être avancé pour les expériences effectuées sur les cellules MCF7, concernant les protéines présentes dans la zone comprise entre 6000 et 7000 Da. Cette approche par MALDI-TOF/MS, nous a permis d'avoir un regard direct sur l'éventuel interaction ou action de l'oxygène singulet vis-à-vis de protéines spécifiques cellulaires et ce grâce à notre protocole développé pour des analyses de cellules intactes.

Afin d'apporter des arguments supplémentaires quant à la capacité de désigner des protéines d'intérêt directement impliquées dans le processus PDT, des travaux par MALDI-TOF/MS sur des lysats de cellules HT29 ont été réalisés. Ces lysats ont été obtenus par application de trois cycles de congélations rapides (-80°C) suivis d'une décongélation au bain-marie (37°C) afin de générer une rupture membranaire par éclatement des cellules. Les spectres de masses issus d'une part de l'analyse des lysats cellulaires HT29 et d'autre part des cellules intactes HT29 sont représentés sur la figure IV.8.. Il est à noter ici que les cellules en question n'ont

en aucun cas été incubée avec le photosensibilisateur Foscan® et la sonde DPBF et n'ont reçues aucun traitement laser.

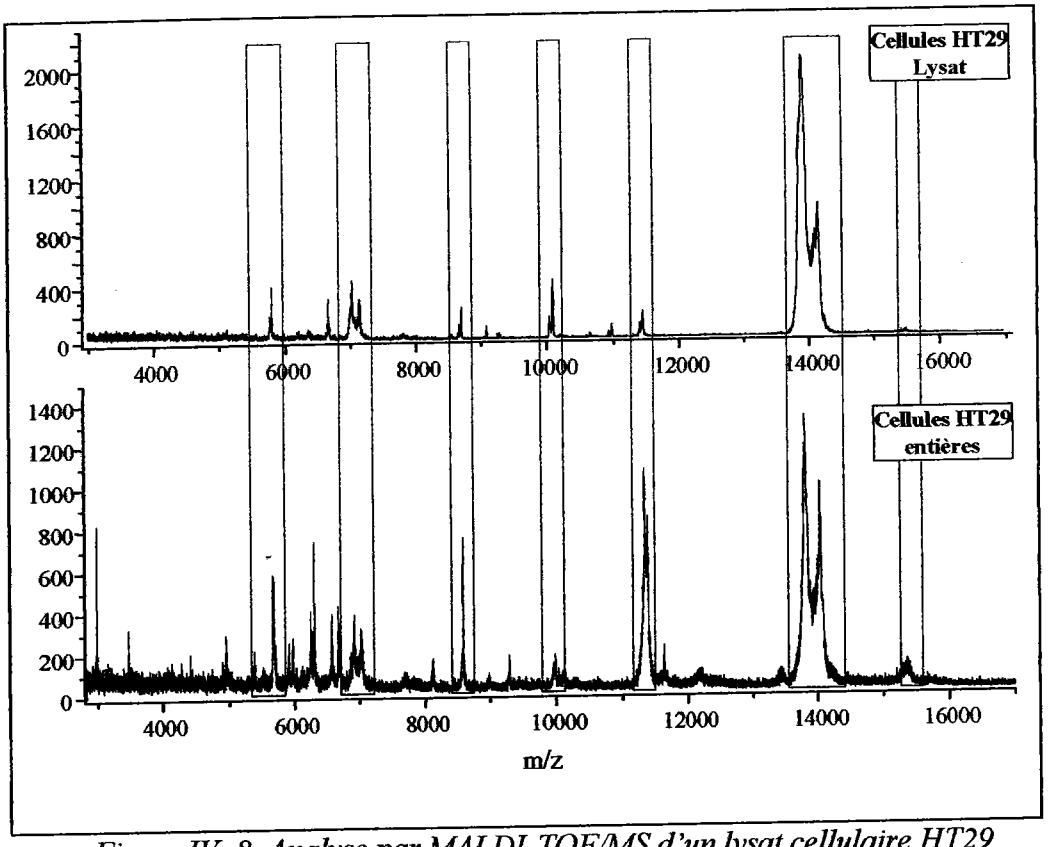


Figure IV. 8. Analyse par MALDI-TOF/MS d'un lysat cellulaire HT29 et de cellules intactes HT29

Les informations issues des analyses de cellules intactes ou de lysat sont très proches (encadrés bleus) avec toutefois un nombre de pics de masse plus conséquent au niveau de la gamme de masse comprise entre 4000 et 8000 Da en ce qui concerne l'analyse des cellules intactes. Une explication possible à ce résultat est l'influence de la sensibilité d'analyse. Ainsi, ces résultats nous confortent sur le fait que les études sur cellules intactes peuvent être poursuivies, dans le cadre de notre protocole d'analyse, compte tenu du fait que les informations obtenues par MALDI-TOF/MS sur cellules intactes ne différent pas de façon significative de celles obtenues sur lysat cellulaire.

Ces résultats fort encourageant nous ont poussé à aller plus en avant dans le domaine de détermination de la nature des protéines susceptibles de subir l'action de l'espèce moléculaire oxygène singulet. C'est pourquoi nous avons commencé à mettre en place au sein de notre laboratoire une démarche d'étude protéomique ciblée. Cette démarche s'appuie à la fois sur

l'utilisation de la spectrométrie MALDI-TOF mais également sur l'arrivée au sein de notre laboratoire d'un spectromètre haute résolution à résonance cyclotronique des ions (FT-ICR/MS) avec comme source d'ionisation soit la possibilité d'utiliser l'électronébulisation (ESI) soit une source MALDI.

2. Etude par MALDI-FT-ICR/MS de la distribution de protéines - approche protéomique

2.1. la protéomique - définition

La protéomique désigne la science qui s'intéresse soit aux les protéomes (l'ensemble des protéines codées par un génome) soit à l'ensemble des protéines d'une cellule, organelle, tissu, organe ou organisme et cela à un moment donné et sous des conditions particulières. Dans notre contexte, l'étude protéomique devant nous permettre de déceler des protéines issues des cellules HT29 et susceptibles d'être impliquées dans des processus PDT.

2.2. Les stratégies d'identification

L'identification des protéines passe par deux stratégies principales et complémentaires (Figure IV.9.).

- La première dite "Bottom-Up" ou montante est réalisée à partir d'une digestion enzymatique de la protéine qui conduit à la formation de séquences peptidiques. Au cours d'une analyse par spectrométrie de masse, ces peptides vont générer un spectre de masse dont la liste des pics de masse peut être soumis à une banque de donnée informatique via un moteur de recherche. L'identification des peptides va alors conduire à l'identification de la séquence de la protéine permettant ainsi de retrouver le nom de celle-ci accompagnée d'autres informations telles que la taxonomie ou sa fonction dans l'organisme dont elle est issue.
- La seconde stratégie dite "Top-Down" ou descendante est basée sur l'analyse de protéines intactes. Au cours d'une analyse par spectrométrie de masse, ces protéines vont subir des fragmentations à l'aide de technique de dissociation tel que le SORI (Sustained Off-Resonance Irradiance), l'ECD (Electron Capture Dissociation) et

l'IRMPD (InfraRed Multi Photon Dissociation) afin d'obtenir des ions fragments spécifiques dont les masses seront soumises à une banque de données. L'interrogation des banques conduira alors à l'identification des séquences et des protéines initialement analysées.

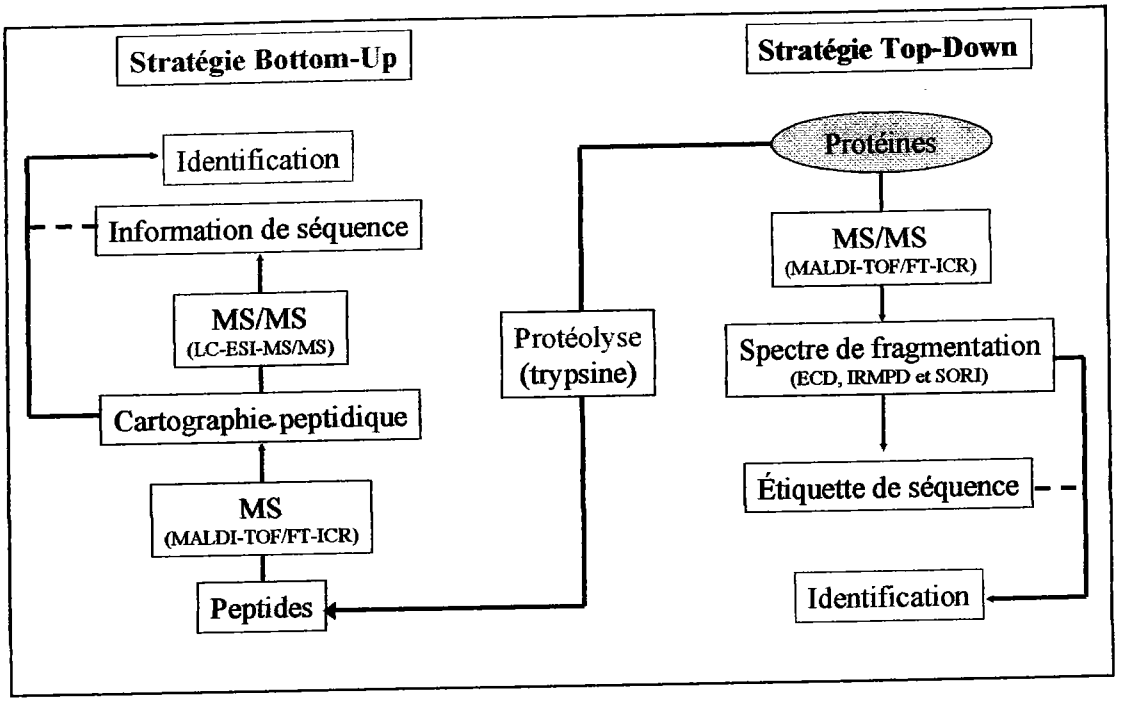


Figure IV. 9. Stratégie Bottom-Up et Top-Down dans le domaine de la protéomique

Afin de débuter nos études protéomiques, nous avons opté tout d'abord pour la stratégie "Top-Down" s'appuyant sur le fait que le spectromètre de masse de haute résolution avec trois modes de dissociation (SORI, ECD et IRMPD) était tout à fait indiqué pour de telles études. De plus ce choix a été dicté dans un premier temps par le fait qu'il nous été difficile de préparer un échantillon de protéines suite à la mise en place d'un gel bidimensionnel.

Afin de pouvoir maîtriser au mieux la technique la première approche a été réalisé sur la mélittine (Sigma, USA), protéine extraite du venin d'abeille constituée de 26 d'acides aminées pour une massse de 2846,312 $g.mol^{-1}$. La solution mère a été préparé à partir d'un aliquot de 100µg de mélittine auxquels nous avons ajouté 1mL d'une solution ACN/H_2O (50/50) puis nous avons dilué cette solution afin d'obtenir une solution fille de $3,5.10^{-12}$ M dans laquelle fut ajouté de l'acide trifluoroacetique à hauteur de 0,1%. La source utilisée lors de ces premières expériences fut la source electrospray (ESI) avec un débit de 2µL/s, un voltage de 3,1 kV à la sortie du capillaire d'introduction, une tension du cône d'échantillonnage à 45 V ainsi que le temps d'acquisition de 4s, permettant d'obtenir deux

Ainsi, pour compléter cette séquence nous nous sommes intéressé à un second mode de fragmentation, la dissociation par IRMPD.

2.2.2. Utilisation du mode de fragmentation IRMPD dans le cadre de l'étude protéomique Top-Down de la mélittine

Pour les acquisitions relatives à la fragmentation de la mélittine par IRMPD, le mode d'isolation ainsi que les paramètres de détection sont restés inchangés à savoir 2µl pour le débit de la solution, un voltage de 3300V au niveau capillaire et une tension de 45 V pour le cône d'échantillonnage. La puissance ainsi que la durée du tir laser ont été ajustées afin d'obtenir une fragmentation significative de l'ion multichargé de la mélittine (m/z 712,1961).

La fragmentation par IRMPD a également conduit à un spectre de masse complexe dont les ions, cette fois-ci, ont pu être identifiés sur la quasi-totalité de la gamme de masse (300 à 1300Th) (Figure IV.13.). L'obtention d'ions de plus basse masse pouvant s'expliquer par le fait que les premiers fragments obtenus peuvent eux même conduire à de nouveaux fragments lorsqu'ils sont exposés à leur tour au faisceau laser infrarouge.

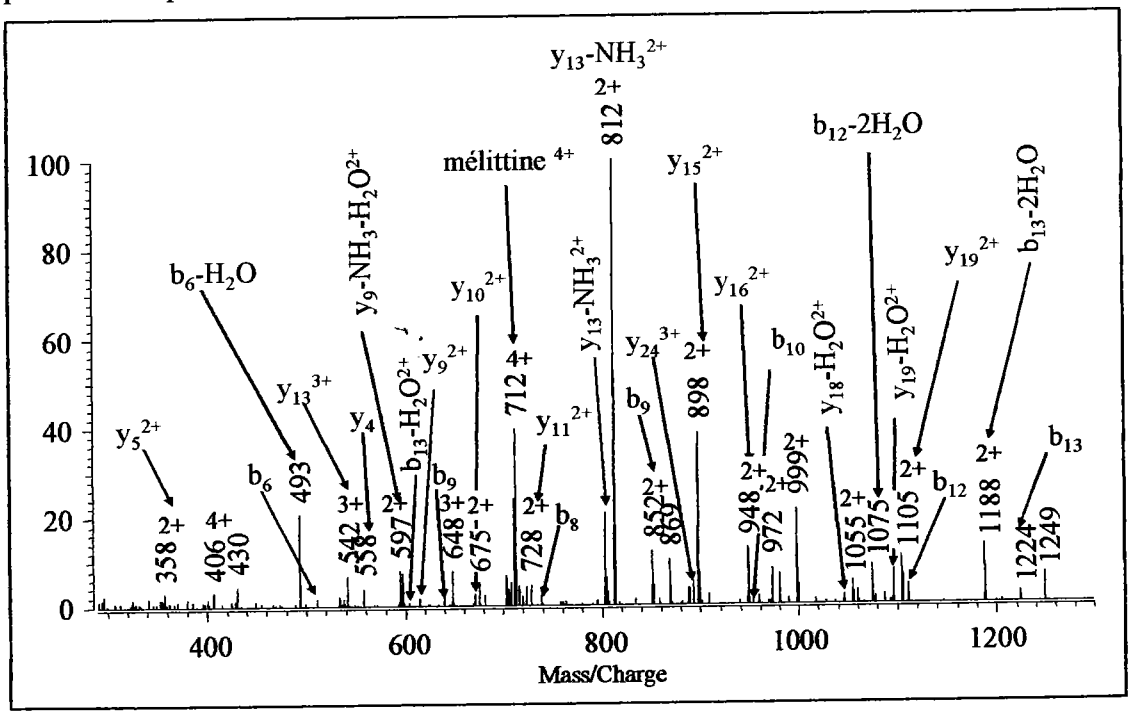


Figure IV. 13. Spectre de masse ESI-FT-ICR/MS de la mélittine après dissociation IRMPD de l'ion à 712,961 Da.

Ions	m/z (Th)		Erreur (ppm)
	Exact	Mesuré	
mélittine $^{4+}$	712.1958	712.1961	-0.4
c_{24}^{3+}	863.8863	863.8864	-0.1
z_{23}^{3+}	868.2101	868.2105	-0.5
c_{25}^{3+}	906.5725	906.5723	0.2
z_{26}^{3+}	943.9191	943.9193	-0.2
mélittine $^{3+}$	949.2587	949.2591	-0.4
$(y_{19})H\text{-}NH_3^{2+}$	1096.1692	1096.1687	0.5
y_{19}^{2+}	1104.1786	1104.1772	1.3
z_{20}^{2+}	1160.2167	1160.2161	0.5
y_{20}^{2+}	1167.7222	1167.7207	1.3
c_{23}^{2+}	1217.2752	1217.2764	-1.0
c_{24}^{2+}	1295.3258	1295.3292	-2.6
z_{23}^{2+}	1302.3154	1302.3149	0.4
c_{25}^{2+}	1359.8590	1359.8582	0.6
x_{25}^{2+}	1408.3672	1408.3674	-0.1
$(z_{26})H^{2+}$	1415.8789	1415.8775	1.0
$(\text{mélittine})H_2^{2+}$	1424.3922	1424.3851	5.0

Tableau IV. 2. Tableau récapitulatifs des fragments obtenus par dissociation par capture d'électrons (ECD) lors de l'analyse de la mélittine par ESI-FT-ICR/MS.

Les ions identifiés au niveau du spectre de masse ont été répertoriés dans le tableau IV.2.. Nous pouvons voir que la majorité des fragments obtenus sont soit de type c soit de type z, l'écart entre les masses exactes et mesurées étant inférieure à 1ppm dans la plupart des cas. Néanmoins il est possible d'observer des fragments de type y tel que y_{19}^{2+} (m/z 1104.1772) et y_{20}^{2+} (m/z 1160.2161) voir même un fragment x_{25}^{2+} (1408.3674 Th).

L'exploitation de ces données, nous permet de déterminée une partie de la séquence de la protéine, observable ci-dessous (Figure IV.12.)

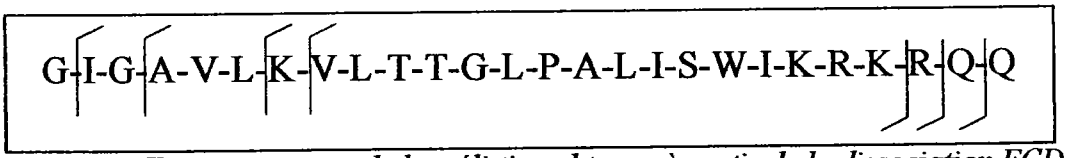


Figure IV. 12. Fragments c et z de la mélittine obtenue à partir de la dissociation ECD

Les fragments obtenus dans le cadre de la dissociation par capture d'électron sont certes nombreux mais insuffisants pour "générer" une séquence complète de la protéine analysée.

2.2.1. Utilisation du mode de fragmentation ECD dans le cadre de l'étude protéomique Top-Down de la mélittine

Suite à l'isolation de l'ion à 712,1961 Th au sein de la cellule ICR, par le biais de l'application d'une gamme de radiofréquences ayant pour but l'éjection de tous les autres ions présents, sa détection s'est faite par une augmentation du voltage du capillaire d'introduction passant de 3100V à 3300V mais tout en maintenant la tension du cône d'échantillonnage à 45 V afin d'augmenter le nombre des ions dans la cellule d'analyse. La différence de potentiel appliquée au filament, source d'électrons nécessaire à la mise en place de la fragmentation par ECD, a été de 7V tandis que la tension d'accélération été maintenu à 0,7 V (génération d'électrons lents).

La fragmentation ECD, effectuée dans nos conditions, a généré un spectre de masse complexe dont la plupart des ions a pu être identifiée, cette identification se faisant essentiellement sur une gamme de 700 à 1500 Th comme nous pouvons le voir sur le spectre de masse ESI-FT-ICR/MS ci-dessous (Figure IV.11.).

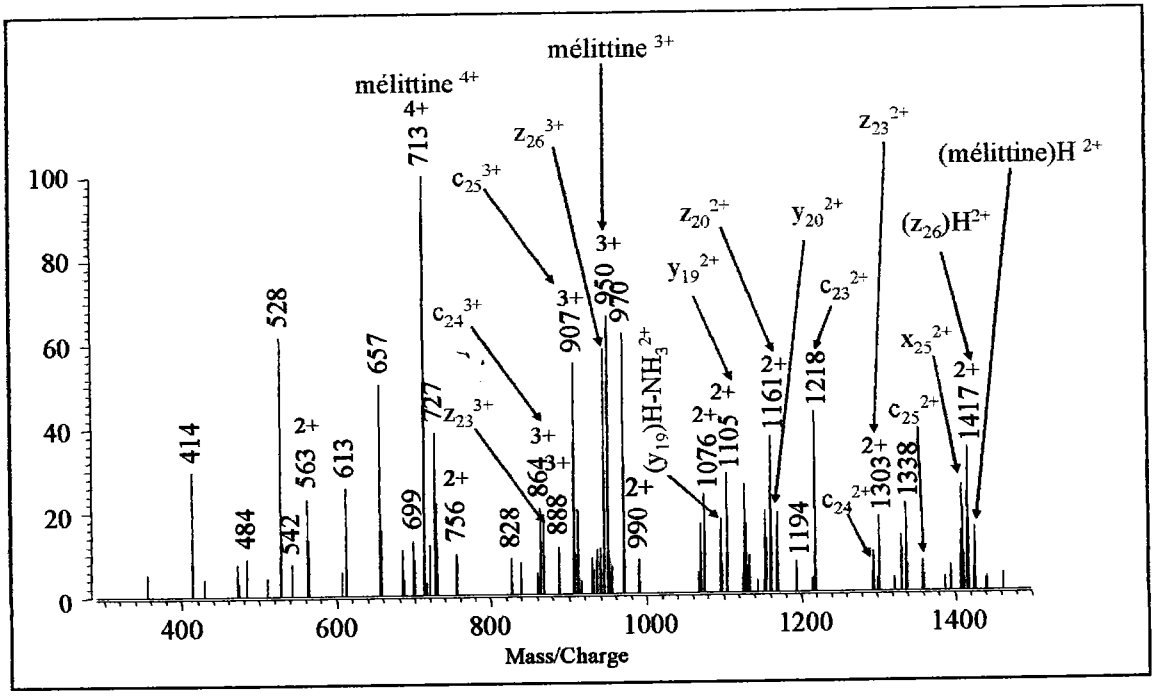


Figure IV. 11. Spectre de masseESI-FT-ICR/MS de la melittine après dissociation par capture d'électrons (ECD) de l'ion à 712,1961 Da.

ions multichargé de la mélittine (Résolution ≈ 250000), l'un portant quatre charges à m/z 712,1960 et le second portant trois charges à m/z 949,2593 ont ainsi été détectés. Une calibration du spectre a été effectuée en se basant sur la distribution isotopique des deux ions précédents, permettant d'accéder à une précision en masse inférieure à 0,5 ppm (Figure IV.10.).

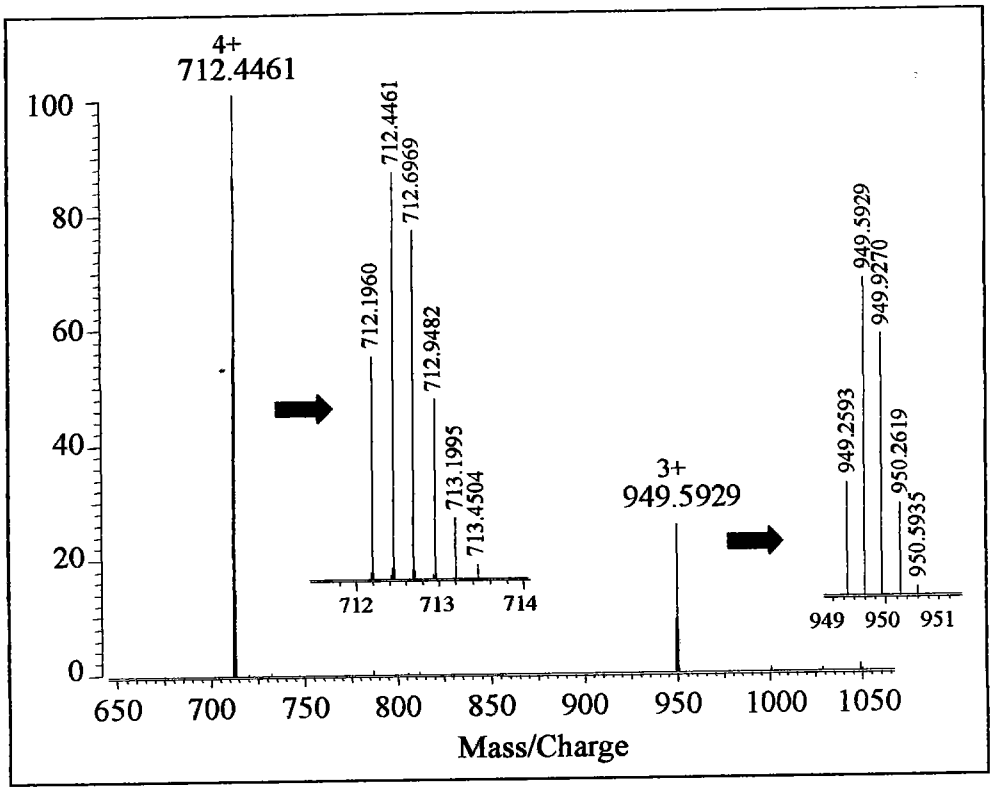


Figure IV. 10. Spectre de masse ESI-FT-ICR/MS de la mélittine ($3,5.10^{-12}$ M, ACN/H_2O, 50/50, 0,1% TFA).

Dans le cadre d'analyses utilisant la source d'électrobulisation, trois modes de dissociation sont à notre disposition à savoir le mode SORI *(Sustained Off Resonance Ionisation)*, le mode ECD *(l'Electron Capture Dissociation)* et le mode IRMPD *(l'InfraRed MultiPhoton Dissociation)*. Les trois modes de dissociation ont été appliqués afin d'aboutir à la fragmention de l'ion m/z 712,1960 caractéristique à la mélittine.

Nous pouvons voir que contrairement au mode de fragmentaion ECD favorisant les fragments de tupe c et z, le mode de fragmentation IRMPD conduit à une majorité des fragments de type b et y. Les ions identifiés ont été classés dans un premier tableau pour les fragments de type b (Tableau IV.3.) et dans un second pour ceux de type y (Tableau IV.4.).

	m/z (Th)		Erreur
Ions fragment b	Exact	Calculé	(ppm)
b_6-H_2O	493.3133	493.3114	3.9
b_6	511.3238	511.3234	0.8
b_{13}-H_2O^{2+}	603.3845	603.3858	-2.2
b_7	639.4188	639.4188	0.0
b_8	738.4872	738.4881	-1.2
b_{23}^{3+}	806.1771	806.1787	-2.0
b_9	851.5713	851.5707	0.7
b_{10}	952.6190	952.6245	-5.8
b_{12}-$2H_2O$	1074.6670	1074.6693	-2.1
b_{12}	1110.6881	1110.6924	-3.9
b_{13}-$2H_2O$	1187.7511	1187.7531	-1.7
b_{13}	1223.7722	1223.7801	-6.5

Tableau IV. 3. Fragments b de la mélittine obtenu à la suite la dissociation par IRMPD.

	m/z (Th)		Erreur
Ions fragment y	Exact	Calculé	(ppm)
y_5^{2+}	357.7277	357.7269	2.2
y_{13}^{3+}	541.6703	541.6701	0.4
y_4	558.3471	558.3467	0.7
y_9-NH_3-H_2O^{2+}	597.3544	597.3537	1.2
y_9^{2+}	614.8729	614.8735	-1.0
y_{10}^{2+}	671.4149	671.4154	-0.7
y_{11}-NH_3^{2+}	719.4437	719.4457	-2.8
y_{11}^{2+}	727.9570	727.9574	-0.5
y_{13}-H_2O^{2+}	802.9966	802.9980	-1.7
y_{13}-NH_3^{2+}	803.4886	803.4893	-0.9
y_{13}^{2+}	812.0019	811.9974	5.5
y_{24}^{3+}	892.5568	892.5610	-4.7
y_{15}^{2+}	897.0547	897.0535	1.3
y_{16}^{2+}	947.5785	947.5793	-0.8
y_{18}-H_2O^{2+}	1045.6391	1045.6368	2.2
y_{19}-$2H_2O^{2+}$	1086.1680	1086.1764	-7.7
y_{19}-H_2O^{2+}	1095.1733	1095.1779	-4.2
y_{19}^{2+}	1104.1786	1104.1835	-4.4

Tableau IV. 4. Fragments y de la mélittine obtenu à la suite la dissociation par IRMPD.

Pour ce mode de fragmentation, il apparaît que le nombre d'ions retenus est plus important mais l'écart de masse l'est également. Nous pouvons distinguer un grand nombre d'ions b et y multichargés mais également bon nombre de ces ions ayant perdu soit un groupement NH_3 soit un groupement H_2O. Cette perte est fréquente et est un moyen supplémentaire de valider la présence des ions initiaux détectés[2]. La contribution de ce mode de fragmentation permettant d'aboutir à la représentation suivante (Figure IV.14.) :

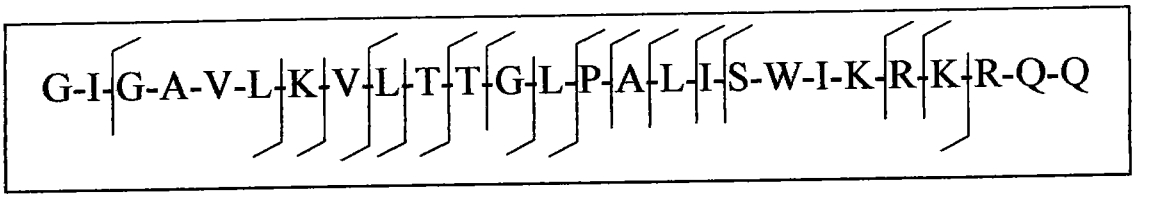


Figure IV. 14. Fragments b et y de la mélittine obtenue à partir de la dissociation IRMPD

Ainsi, chaque mode de fragmentation apporte son lot de fragments identifiés, c et z pour l'ECD d'une part et b et y pour l'IRMPD d'autre part, mettant en avant la complémentarité des deux techniques, le croisement des données permettant quasiment de remonter à la séquence complète et à l'identité précise de la protéine analysée (Figure IV.15.).

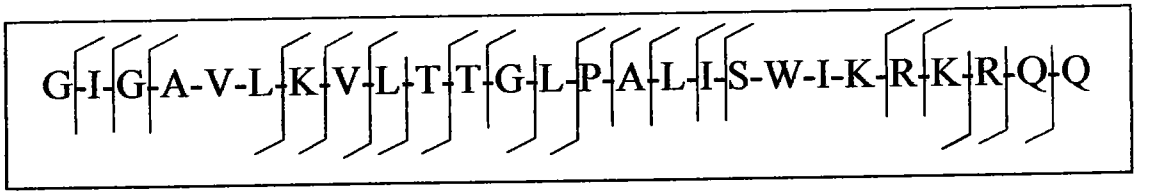


Figure IV. 15. La complémentarité des méthodes de dissociation permet de visualiser les fragments ECD de type c et z (bleu) et les fragments IRMPD de type b et y (rouge) de la mélittine.

Il est à noter que dans le cas présent, l'annotation des spectres de fragmentation ECD et IRMPD de la mélittine s'est faite non pas part soumission des listes de pics de masse à une banque de données mais à l'aide de tableaux de données fournis par le constructeur du de l'instrument FT-ICR/MS. Il va de soi, qu'une soumission des listes de pics aux banques de données aurait permis d'identifier d'avantages d'ions mais cela n'a pas été possible jusqu'à présent à cause d'une incompatibilité des interfaces informatiques.

2 (2) Wysocki *Methods* **2005**, *35*, 211-222.

A la vue de ces premiers résultats encourageants, nous avons souhaité appliquer cette méthode d'analyse Top-Down à un échantillon protéique plus complexe issue d'un spot de gel bidimensionnel élaboré à partir de cellules HT29 non incubées en présence de Foscan®. Pour ce faire, nous avons procédé dans un premier temps à une extraction de protéines du spot sélectionné grâce à 20µL d'une solution d'ACN/H_2O (60/40, v/v) (t = 60 min) puis en second lieu nous avons prélevé la totalité de la solution a laquelle fut ajouté de l'acide acétique à hauteur de 5%. L'analyse par ESI-FT-ICR/MS de la solution ainsi obtenu, effectuée dans les conditions précédentes, ne nous a hélas pas permis d'obtenir de spectre de masse pouvant donné lieu à une recherche informatique. La raison de cet échec est attribuée à une concentration trop faible de matériel nécessitant l'emploi d'une source nanospray qui lors de ces recherches n'étaient pas optimisée pour de telles applications.

Aussi, nous nous sommes tournés vers la stratégie Bottom-Up dont la mise en œuvre n'a été possible qu'avec l'aide du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio Organique à Strasbourg, dirigé par le Pr. Alain Van Dorsselaer. En effet, cette collaboration nous permet d'accéder à l'échantillonnage par gel 2D avec en final l'obtention d'aliquotes de protéines qui seront analysés sur notre spectromètre de masse FT-ICR/MS

2.3.La stratégie Bottom-Up

2.3.1. Les principes de la protéomique

2.3.1.1. Historique

L'électrophorèse est une des nombreuses techniques de séparation. Elle est basée sur le principe de la mise en mouvement différentiel et est par conséquent confrontée aux problèmes de diffusion et de dispersion. Des particules chargées sont placées dans un champ électrique créé par une tension continue et se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge et à une vitesse proportionnelle à cette charge. En 1859, l'allemand Quincke découvre qu'il est possible de déplacer des particules colloïdales (sous forme de colle gélatineuse) sous l'action d'un champ électrique : ce phénomène est appelé la cataphorèse. Par la suite, Helmholtz développe l'électro-osmose : sous un champ électrique, il observe que des particules chargées

se déplacent vers le pôle de signe opposé à leur charge. En 1892, Linder et Picton exploitent cette observation pour la séparation de particules chargées, puis plus tard le suédois Tisélius met en œuvre cette technique de séparation pour les protéines du sérum sanguin et du lait, ce qui lui vaut le prix Nobel en 1948[3].

2.3.1.2. Le gel d'électrophorèse bidimensionnel

L'électrophorèse bidimensionnelle SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis)[4] des protéines dénaturées (EBD) selon 0'Farrell[5] est, comme son nom l'indique, une combinaison de deux électrophorèses. La première, une isoélectrofocalisation (IEF), fait en sorte que tout polypeptide contenu dans l'échantillon se déplace jusqu'à une position en fonction de son point isoélectrique (pI). La deuxième, une électrophorèse en présence de sodium dodécyl-sulfate (SDS), provoque un déplacement de ces mêmes polypeptides en fonction de leur masse moléculaire.

Le gel et le tampon de migration contiennent tous deux du SDS qui agit ici comme un détergent anionique. Il va avoir deux fonctions :
i) détruire la structure secondaire des protéines faisant en sorte que la migration soit totalement indépendante de la forme de la protéine,
ii) se fixer aux sites hydrophobes de la protéine et permettre ainsi d'aboutir à une densité de charge nette comparable à toutes les chaînes polypeptidiques, qui vont toutes avoir le même rapport taille/masse compte tenu que la quantité de SDS fixée est proportionnelle à la taille de des chaînes polypeptidiques. On s'affranchit ainsi de la charge de la protéine au pH du tampon dans lequel on travaille.

Ce type d'électrophorèse conduit à la séparation très résolutive d'un très grand nombre de protéines et de leur isoformes. De plus cela permet une comparaison du profil d'expression protéique dans différentes conditions physiologiques ; plusieurs centaines de constituants d'un mélange de polypeptides peuvent être individualisés sous forme de "spots" sur un gel. Les applications sont multiples, depuis la vérification de la pureté d'un échantillon jusqu'à des études de variabilité génétique, en passant par le suivi des variations d'expression des

3 (3) Tilesius *Nova Acta Regiae Societatis Scientiarum Upsaliensis* **1930**, *7*.
4 (4) Laemmli U.K. *Nature* **1970**, *227*, 680-685.
5 (5) 0'Farrell *J. Biol.Chem.* **1975**, *250*, 4007.

protéines en fonction de différents facteurs notamment dans le cadre de différenciations[6] , du dépistage de composés illicites[7] ou de facteurs de stress[8].

Cependant, les séparations par I.E.F. à l'aide d'ampholytes pour générer les gradients de pH peuvent souffrir de problèmes de déplacement de pH au cours de la migration et de variabilité de lots d'ampholytes. Les gels de gradient de pH immobilisés précoulés, IPG strips (< ±0.03 pI ; Biorad, USA) apparaissent comme une solution aux problèmes. Les IPG strips sont fabriqués à partir de dérivés d'acrylamide qui comprennent des groupements libres d'acide carboxylique et d'amines tertiaires qui sont polymérisé avec de l'acrylamide et du bis-acrylamide. Ainsi, le gradient est définitivement fixé au moment du coulage, et ne peut plus être déplacé lors de l'électrophorèse.

2.3.1.3. Principe du gel 2D

L'un des points clef de l'électrophorèse bidimensionnelle réside dans le conditionnement de l'échantillon. Il doit être exempt d'éléments de pollution notamment de kératine. Pour cette raison, la préparation et la manipulation des extraits cellulaires, l'I.E.F. et la SDS-PAGE doivent être effectués avec beaucoup rigueur de préférence en salle blanche avec le port de vêtements adéquats et selon un protocole strict et bien maîtrisé.

Dans le cas d'acides aminés, il y a transfert du proton de l'acide carboxylique (2< pKa< 2,5) sur l'amine (9< pKa< 9,5) pour donner une entité neutre, appelée zwitterion. Les acides aminés ont donc un comportement amphotère (Figure IV.16.).

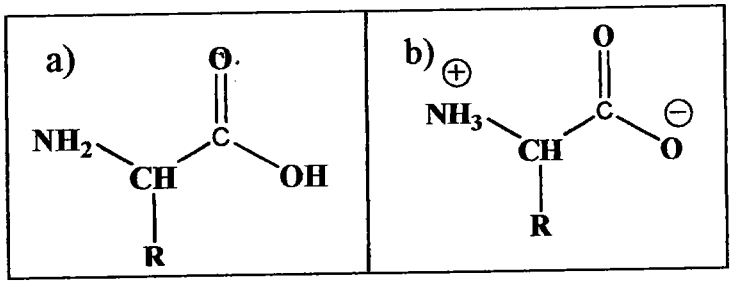


Figure IV. 16. a) forme basique de l'acide aminé, b) forme zwitterionique de l'acide aminé (majoritaire en solution).

---

6 (6) Gao W.M.; Chadha M.S.; Berger R.P.; Omenn G.S.; Allen D.L.; Pisano M.; Adelson P.D.; Clark R.S.; Jenkins L.W.; Kochanek P.M. *J. of Neurotrauma* **2007**, *24*, 43-53.

7 (7) Khan A.; Grinyer J.; Truong S.T.; Breen E.J.; Packer N.H. *Clinica Chimica Acta* **2005**, *358*, 119-130.

8 (8) B. McDonagh; Sheehan D. *Aquatic Toxicology* **2006**, *79*, 325-333.

En solution, le pH des acides aminés sous forme zwittérionique est appelé pH isoélectrique et noté pH_i. Un diagramme de répartition des espèces (Figure IV.17.) peut alors être représenté comme suit.

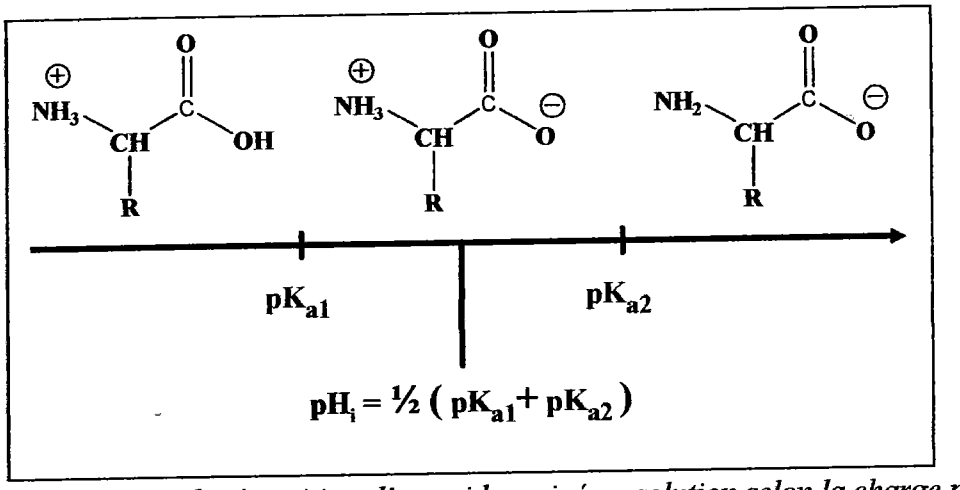


Figure IV. 17. Diagramme de répartition d'un acide aminé en solution selon la charge portée.

En dehors de ce " point isoélectrique " les acides aminés sont globalement chargés et migrent sous l'effet d'un champ électrique. Ainsi, en travaillant à un pH fixé, on peut séparer différents acides aminés par électrophorèse.

Le choix du pH du milieu se fait de façon à obtenir une séparation optimale des différentes espèces. Il va de soit que pour une première analyse, la gamme de pH sélectionné est relativement large (pH de 3 à 10) afin d'obtenir une distribution la plus complète possible. Suite à cela, la gamme de pH est restreint (4-7, 5-8, 8-11) afin d'obtenir une séparation maximale et plus fine dans la zone d'intérêt.

Les défis de la préparation de l'échantillon protéique tient au fait qu'elle doit faire en sorte d'obtenir et de maintenir toute les protéines en solution et prévenir les hétérogénéités des profils obtenus par gel 2D par des contaminations telles que des acides nucléiques, des polysaccharides, les sels tampons et le matériel insoluble. Cette préparation doit également éviter l'agrégation des complexes protéiques, empêcher toute dégradation ou formation de nouvelles liaisons interprotéines et respecter la répartition d'abondance des différentes protéines extraites.

Les protéines étudiées ont été extraites de cellules HT29 (adénocarcinomales du colon humain) issus de 2 boîtes de Pétri (V = 5mL chacune) ensemencées avec 10^4 cellules/mL (incubation à 37°C, 5% CO_2) durant 7 jours. L'extraction des cellules HT29 s'est faite au Centre Alexis Vautrin avec l'emploi du protocole d'extraction des protéines indiqué en annexe.

Puis les extraits ont été stockés à -80°C. Le tampon de lyse ne correspondant pas au milieu souhaité pour le gel 2D, les protéines ont été précipitées par l'utilisation d'un solvant organique (acétone) puis lyophilisé.

Protocole d'échantillonnage par l'étude par électrophorèse bidimensionnelle SDS-PAGE

Afin de parvenir à une séparation efficace des protéines présentes, une dénaturation des de celles-ci doit être opérée. Cette dénaturation a pour but de permettre l'individualisation et la solubilisation des polypeptides par rupture des ponts disulfures et des liaisons non-covalentes. Pour assurer la rupture des ponts disulfures, des agents anti-oxydants tels que le DTT (Dithiothreitol) ou le 2-mescapto éthanol (Beta-mescapto éthanol, BME) sont utilisés. Des substances dites chaotropes, c'est-à-dire qui suppriment les interactions hydrophobes, telles que le sodium dodécyl-sulfate (SDS) ou l'urée à haute concentration sont nécessaires pour rompre les liaisons non-covalentes. Le mélange urée/thiourée (8M/2M) est très utilisé parce qu'il donne de très bons rendements lorsqu'on travaille avec des gradients de pH immobilisés (IPG) (Rabilloud *et al.*, 1997).

Ces mélanges de composés chaotropes ne suffisent pas toujours pour supprimer toutes les interactions. C'est le cas notamment des échantillons riches en lipides. C'est pourquoi on ajoute toujours des détergents (non ionique et zwitterionique) tels que Triton, ASR-14 ou du CHAPS permettant la dispersion des molécules, une meilleure solubilisation et évitent l'agrégation lorsque celles-ci ont des domaines hydrophobes.

Pour la réhydratation de notre IPG strip ($1^{ère}$ dimension) nous avons sélectionné l'ASR-14, le CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)diméthylammonio]-1-propanesulfonate) (détergents non-ioniques et / ou zwitterions) et le Dithiothreitol (DTT) qui quant à lui maintient les

groupements –SH réduits afin de ne pas oxyder les protéines ou provoquer la formation de ponts disulfures interprotéines. Pour cette étude, nous avons employé deux solutions tampon : l'une avec ASB-14 (solution 1), l'autre avec CHAPS (solution 2). Cette démarche s'insère dans une phase d'optimisation dans le but de choisir la solution de tampon la plus adéquate pour mener à bien la solubilisation de nos protéines extraites. Outres ces détergents, la solution tampon (V = 400 µL) est constituée d'urée (8M), de DTT (20mM), de 8µl d'inhibiteurs de protéases, de 4µL de TLCK (N-tosyl-L-lysine-chlorométhyle cétone, inhibiteur de protéase), de 8µL Pharma-lyte® (3-10), de 20µl Triton x-100 et de 0,4µL de Bleu de bromophénol.

A l'issu de cette préparation, les protéines précédemment lyophilisées y ont été dissoutes. Puis nous avons procédé à une ultracentrifugation des solutions (10000g). Cette ultracentrifugation permettant d'éliminer des substances (les sels, les lipides, les polysaccharides et les acides nucléiques), celles-ci pouvant interagir avec les protéines et induire de ce fait des charges artefacts. Cette étape ne s'appliquant pas pour les composés phénoliques et les protéases, ceux-ci devant être préalablement éliminées ou inhibées[9].

Ainsi, pour la réhydratation de l'IPG, nous avons procédé à la récupération de 390 µL par solution de réhydration et les avons placés chacune dans un portoir. Puis vient le positionnement précis et délicat du strip afin d'éviter le piégeage de bulles d'air et de limiter le dessèchement de ce dernier de l'huile végétale a été ajoutée (Figure IV.18.).

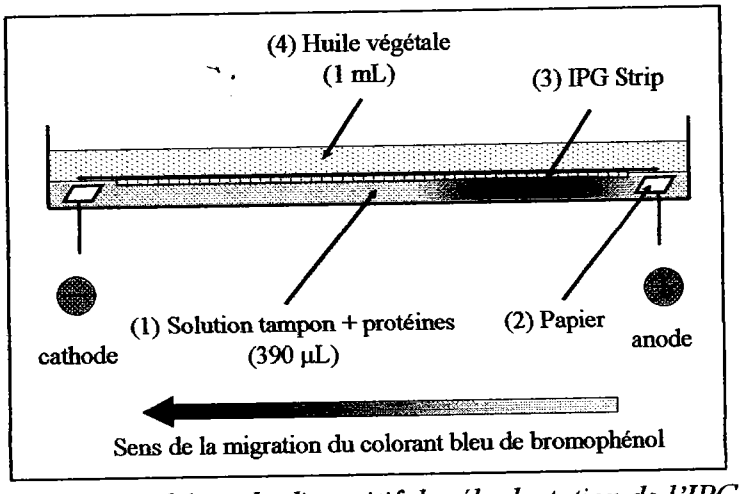


Figure IV. 18.- schéma du dispositif de réhydratation de l'IPG strip

9 (9) Görg A.; Boguth G.; Obermaier C.; Weiss W. *Electrophoresis* **1998**, *19*, 1516-1519.

Quelques précisions sont à apporter pour cette étape d'hydratation notamment l'utilisation de papier wicks et le bleu de bromophénol. L'utilisation du papier placé aux bornes se justifie pour deux raisons: d'une part, il protège le strip d'une détérioration par effet joule, d'autre part, il permet le dessalage de la solution. Le sel, migrant dans le gradient de pH, peut être à l'origine de zones très conductrices entraînant une baisse localisée du voltage et du champ électrique, celle-ci empêchant la progression des protéines et se traduisant par d'immenses taches sur le gel 2D. Le bleu de bromophénol incorporé dans la solution joue le rôle d'indicateur. Lors de la focalisation celui-ci va migrer et la focalisation sera considérée comme achevée lorsque l'ensemble de la coloration sera positionné au niveau de la cathode.

La réhydratation se fait selon deux étapes successives, la première relative à la mise en repos de l'IPG strip durant 5 heures ($\theta = 20°C$) dans le portoir et la seconde consistent à soumettre l'IPG strip durant 15 heures ($\theta = 20°C$) à une tension de 50 volts et à une intensité de 50 µA, afin de permettre une meilleure migration des grosses protéines dans le strip[10].

Les conditions électriques de focalisation ne sont jamais fixes. Elles varient selon la composition de l'échantillon, sa complexité et la gamme de pH utilisée. Dans le cadre de notre étude, les voltages appliqués à l'IPG strip (L = 17 cm) lors de la focalisation sont les suivantes.

Voltage initial	Voltage final	Temps	Température
0 V	200 V	1h	20°C
200 V	1000 V	4 h	20°C
1000 V	5000 V	16 h	20°C
5000 V	5000 V	7 h	20°C

Tableau IV. 5. Voltages appliqués à l'IPG strip lors de la focalisation

[10] (10) Obermaier C. *Surrey U.K.* **1998.**

La première étape d'une heure est une étape de conditionnement, le faible voltage servant à enlever les excès de sel. La quantité globale Volts x Heures est de l'ordre des 85000, soit la quantité nécessaire pour faire migrer le bleu de bromophénol jusqu'à la cathode, mettant ainsi en évidence la fin de la focalisation.

Avant de disposer l'IPG strip sur le gel de deuxième dimension, il est nécessaire de l'équilibrer avec du tampon contenant du SDS. Une première incubation permet de saturer le gel en SDS et en agent réducteur DTT. L'incubation au DTT nécessite une seconde incubation à l'iodoacétamide qui permet de prévenir d'une réoxydation des protéines lors de l'électrophorèse et alkyle le DTT résiduel, minimisant les traînées verticales.

Le tampon d'équilibrage employé est constitué de DTT (1%), de TRIS-HCl (50 mM, pH = 8,8), d'urée (5M), de glycérol (30%), de SDS (2%) et d'eau ultrapure (10 mL) tandis que la seconde solution se compose de iodoacétamide (2,5%), de TRIS-HCl (50 mM, pH = 8,8), d'urée (5M), de glycérol (30%), de SDS (2%) et d'eau ultrapure (10 ml). L'IPG strip est plongé dans la première solution durant 30 minutes sous agitation douce puis il est placé dans la seconde durant 30 min sous agitation douce.

Enfin, l'IPG strip est retiré puis lavé une première fois à l'eau et une seconde fois dans un tampon eau /(Tris-HCL (25 mM) et Glycine (192 mM). Pour l'étude de nos échantillons, un gradient d'acrylamide de 10 à 20% a été sélectionné car il permet une bonne séparation des protéines de 26 à 220 kDa. En effet, plus le pourcentage d'acrylamide est élevé, plus la densité des chaînes est élevée et les mailles du réseau sont serrées diminuant ainsi la migration des protéines volumineuses. Chaque solution, l'une à 10% et l'autre à 20% en acrylamide dont la composition est indiquée respectivement dans le tableau IV.6., est placé dans un dispositif de vases communicants, leur mélange s'effectuant grâce à une pompe péristaltique (minipuls3,Gilson, USA) de débit égale à 1 mL/min.

Les constituants de nos solutions sont les suivants :

	Solution d'acrylamyde à 10%	Solution d'acrylamyde à 20%
H_2O	6,8 ml	1,2 ml
Tris-HCl; pH 8,8	4,3 ml	4,3 ml
Acrylamide/bisacrylamide (30%)	5,8 ml	11,4 ml
SDS (10%)	170 µl	170 µl
Teemed	17 µl	17 µl
APS (10%)	30 µl	30 µl

Tableau IV. 6. Composition des solutions d'acrylamide de 10 et de 20%

la réalisation de la polymérisation est alors initiée par la formation de radicaux libres par le persulfate d'ammonium (APS) et catalysé par le TEMED (N,N,N',N'-tétramethyl-1-,2-diaminométhane). Sachant que la solution est une solution dite "mouillante", il y a formation d'un ménisque à la surface du gel. Pour y remédier, 1 mL d'isopropanol y est déposé et constituera ainsi une interface qui nous permettra une surface de gel plane, permettant un transfert homogène des protéines présentes dans l'IPG lors de la focalisation.

Après séchage du gel et évaporation de l'isopropanol, l'IPG strip est placé directement en contact avec le gel tout en évitant la présence de bulles d'air. Pour le maintenir en bonne place, il est recouvert avec une solution d'agarose 1% et de bleu de bromophénol. Comme précédemment, le colorant incorporé, joue une fois de plus le rôle d'indicateur de migration.

Dans cette phase et contrairement à L'I.E.F., la séparation des molécules ne se fait pas selon le point isoélectrique mais selon la masse moléculaire. En présence de SDS, les protéines voient leurs chaînes polypeptidiques "enveloppées" de charges négatives, qui vont se repousser et ainsi déplier celles-ci. Le déplacement est alors en fonction uniquement de la masse et la taille de la molécule.

Plus la taille des molécules est petite, relativement à celles des pores, plus les molécules se déplaceront facilement, ce qui implique une migration rapide, permettant ainsi une séparation efficace. Plus l'affinité est grande moins la molécule migre vite et loin, parce qu'elle est retardée. Ce phénomène étant généralement nuisible à la qualité de la séparation et la vitesse de la migration, on essaie de minimiser ce problème en choisissant des matrices les plus inertes possibles par rapport aux molécules qu'on veut séparer (Figure IV.19.).

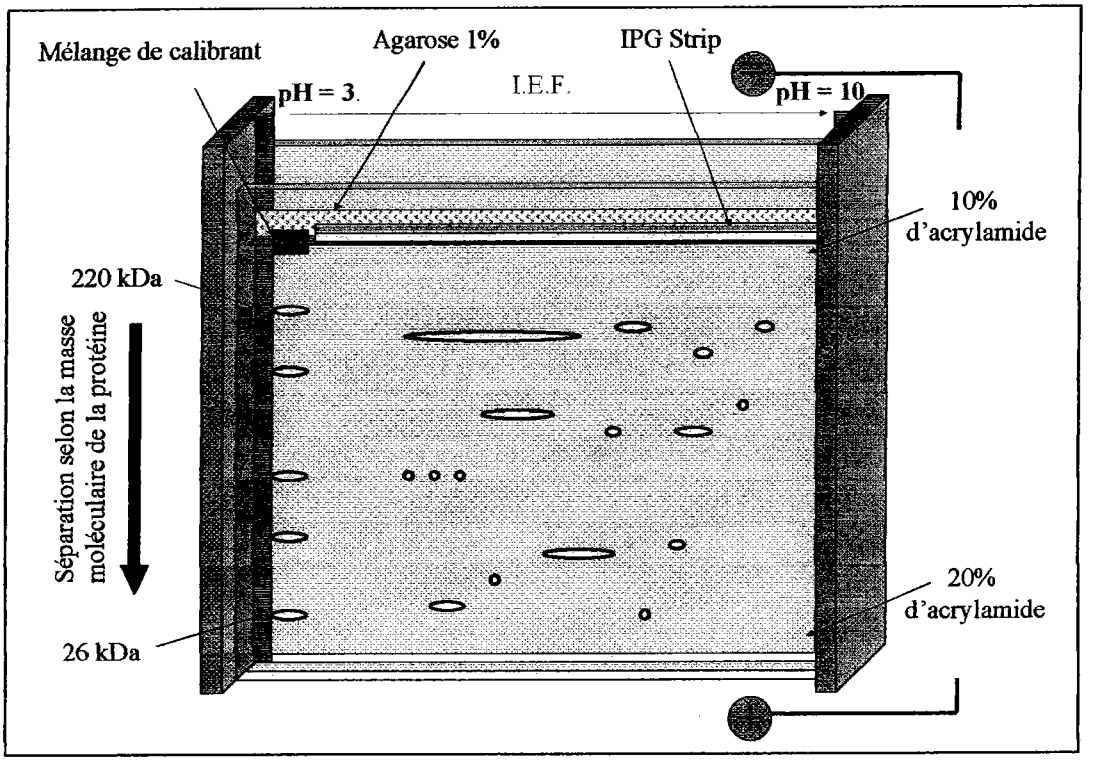


Figure IV. 19. - Représentation de la SDS-PAGE, migration des protéines dans le gel d'acrylamide. (Dimension : largeur 17cm, hauteur 20cm)

Afin de permettre une bonne pénétration des protéines dans le gel, une première intensité de 5mA est appliquée. Puis une seconde, plus importante, de 7mA est utilisée pour la durée de la focalisation. La migration des protéines est considérée comme achevée lorsque le bleu colloïdal de la solution d'agarose atteint la partie inférieure du gel.

Au terme de cette étape, le gel est retiré de son enceinte et la fixation des protéines s'effectue par utilisation d'une solution d'éthanol (50%) et d'acide phosphorique (3%) qui dénaturent de manière irréversible les protéines dans les mailles du gel.

Il est à noter ici, qu'une étape importante avant d'effectuer le gel bidimensionnel, est de déterminer la concentration en protéines présent dans chaque aliquotes obtenus suite à

l'extraction de celle-ci à partir des cellules HT29. Afin d'effectuer cette mesure, nous avons utilisé la méthode de Bradford[11] qui emploi le bleu de Coomassie comme réactif. Ce dernier, qui est supposé se fixer sur les acides basiques (notamment l'arginine) et aux aromatiques, permet de déterminer la concentration, par spectrophotométrie UV-visible, de protéines en solution. En effet, en milieu acide, le bleu de Coomassie indique une absorption à $\lambda = 470$ nm qui, après fixation à la protéine, est déplacé vers les plus hautes longueurs d'onde à savoir $\lambda = 595$ nm. Cette méthode sensible et rapide permet une quantification au plus bas de 2 - 5 µg de protéines. Dans nos études, la quantité en protéine estimée a permis de "charger" chacun des IPG strip à hauteur de 300 – 350 µg. Cependant il est bon de remarquer que les protéines de faible poids inférieur à 3000 Da ne sont pas prises en compte par cette méthode.

Suite à cette étape de quantification en protéines afin d'être dans les meilleurs conditions pour l'élaboration du gel 2D, nous avons procédé à la mise en place de cette dernière. Après retrait du gel, celui-ci est rincé à l'eau distillée avant d'être fixé par utilisation d'un mélange eau/éthanol/acide phosphorique (47/50/3) pendant au moins 30 minutes. L'éthanol chassant peu à peu le SDS des protéines, permettant ainsi la coloration.

2.3.1.4. Coloration des protéines

Les colorations des protéines en gel 2D reposent principalement sur l'emploi de colorants organiques tel que le bleu de Coomassie (également appelé Brillant Blue, Brillant Blue G, Acid Blue 90, C.I. 42655 ou BBC G250), de sels métalliques tels que le nitrate d'argent, ou encore de sondes fluorescentes. Ces colorations permettent soit une observation directe à l'œil nu soit une observation par fluorescence.

Coloration au bleu de Coomassie (retenu pour les analyses protéomiques)

Le bleu de Coomassie BBC G250 (Sigma Chemical Co) permet la mise en coloration de spots contenant une quantité de protéines de microgramme avec une limite de détection pouvant aller jusqu'à 38 ng. Cette coloration, rapide, peu chère permet une visualisation dans le visible et prouve une bonne homogénéité au niveau des spots avec une linéarité de 2 -3 ordres de magnitudes.

---

[11] (11) Bradford M. M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–254.

Coloration à l'argent

Elle permet de mettre en évidence dans le visible des spots contenant une quantité de protéines bien plus faible de l'ordre de 0,1 ng avec une limite de détection de l'ordre de 0,02 ng. Il est supposé que ce soit les cations argentiques qui réagissent avec les groupements amines des protéines ainsi qu'avec les résidus soufrés que sont la méthionine et la cystéine[12]. Cette coloration est rapide.

Coloration au Sypro® Ruby (tris(bathophénantrolinedisulfate)ruthénium(II))

Cette coloration permet une détection sensible (1 ng) par fluorescence des protéines après une simple immersion des gels dans un bain de Sypro® Ruby. Après coloration, les gels sont visualisés sur un système de détecteurs UV avec comme longueur d'onde d'excitation λ 300 et λ 480 nm et comme longueur d'onde d'émission λ 618 nm.

Coloration à la cyanine

Cette coloration, tout comme la coloration au Sypro® Ruby autorise une détection (limite de détection 125 pg) par fluorescence des protéines, avec une excellente linéarité sur 5 ordres de magnitude. L'utilisation de ce type de coloration a permis l'émergence d'une technique électrophorétique appelée DIfferential Gel Electrophoresis (DIGE) qui est caractérisé notamment par une résolution, reproductibilité de tout premier ordre et permet aussi d'accéder à une analyse quantitative des gels.

La technique DIGE est une technique multiplexe de l'électrophorèse 2D qui consiste à séparer, en deux dimensions, les protéines d'un échantillon par migration au sein d'un gel 2D. Cette technique est basée sur le couplage des marqueurs fluorescent Cy^2 (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 520 nm), Cy^3 (λ_{ex} = 532 nm, λ_{em} = 580 nm) et Cy^5 (λ_{ex} = 633 nm, λ_{em} = 670 nm) par exemple à plusieurs distributions protéiques différentes avant de le mélanger et de les faire migrer au sein d'un même gel 2D[13]. Elles possèdent en outre un groupement N-hydroxy-succinimidyl ester qui permet par une réaction de substitution nucléophile avec le groupe amine en epsilon des lysines des protéines de former une amide. L'analyse d'images d'un gel DIGE est plus aisée puisque les deux échantillons ont migré sur le même gel.

---

12 (12) Dunn **1998**.

13 (13) Patton W. F. *Journal of Chromatography B* **2002**, *771*, 3–31.

Les images, acquises à l'aide d'une source fluorescente dont les filtres d'émission correspondent aux longueurs d'onde des cyanines utilisées, sont ensuite superposées et comparées quantitativement à l'aide de logiciels adaptés (PDQuest (www.protemone works.bio-rad.com) ou 2D Elite (http://www.imsupport.com/)) permettant la mise en évidence des protéines qui différent ou qui sont identiques.

Bien que la détection au bleu de Coomassie ait un seuil de détection plus faible, l'homogénéité de la coloration ainsi que la possibilité d'analyser le gel d'un point de vue quantitatif en font une méthode de choix dans le cadre de nos travaux[14]. La solution de coloration (V = 100mL) que nous avons utilisé pour la coloration de nos gels se compose d'eau ultra pure (20 %), d'acide phosphorique (10 %), de sulfate d'ammonium (10 %), de bleu de Coomassie (0,12 %). Après dissolution de l'ensemble, nous avons ajouté de l'eau ultrapure (jusqu'à 80% du volume totale) et 20 mL de méthanol.

La solution est versée sur le gel placé sur une table d'agitation à température ambiante pour une durée de 24 heures. A l'issu de cette agitation, la solution est retirée et le gel est lavé deux fois à l'eau ultra pure.

2.3.1.5. Analyse des gels

Suite à la migration des protéines issues de la lignée cellulaire HT29, nous obtenons un gel 2D SDS-PAGE sur lequel on peut visualiser des spots constitués chacun d'une ou plusieurs protéines.

Afin de traiter les informations relatives au gel 2D, celui-ci est scanné. L'utilisation de l'outil informatique permet de stocker et d'accumuler les informations issues de différents gels appartenant à un même échantillon pour générer un profil servant dès lors de référence. La comparaison des différents profils 2D relatifs à la différente conditions expérimentales permet de mettre en évidence la sur ou sous expression d'un spot donné ou l'apparition ou la disparition de ce dernier suite à un traitement photodynamique sur une lignée cellulaire donnée.

---

[14] (14) Kwanyuen P.; Wilson R. F. *J Am. Oil Chem. Soc.* **2000**, *77*, 1251-1254.

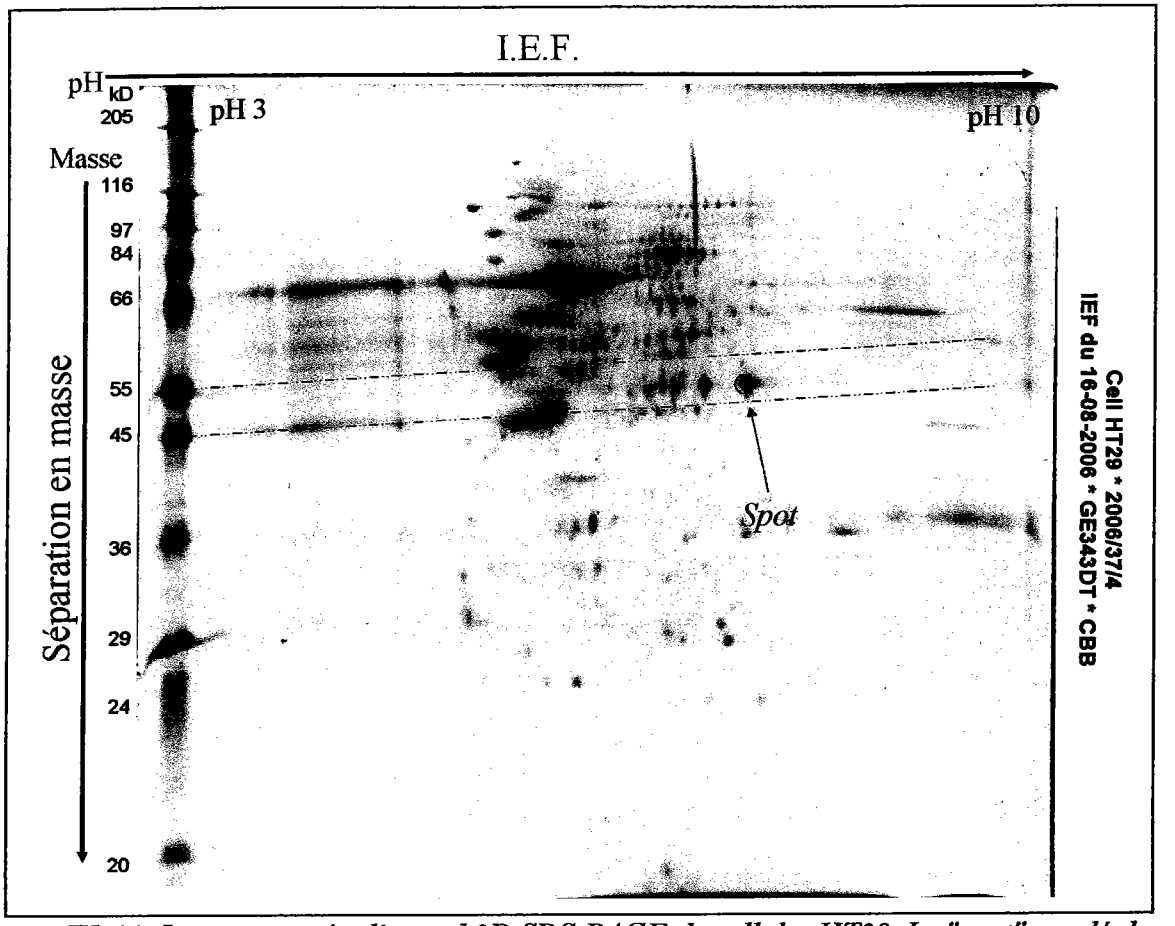


Figure IV. 20. Image scannée d'un gel 2D SDS-PAGE de cellules HT29. Le "spot" cerclé de rouge est recueilli afin de subir une digestion enzymatique.

Ainsi sur le gel 2D SDS-PAGE de protéines issues de cellules HT29 (Figure IV.20.), nous pouvons observer un nombre conséquent de spots. Nous avons alors sélectionné un spot (cercle rouge) afin de mettre en place les premières analyses protéomiques. Ces études s'effectueront en parallèle au sein de notre laboratoire par spectrométrie de masse MALDI-FT-ICR/MS et par MALDI-TOF-TOF/MS au sein du laboratoire de spectrométrie de masse bio organique de Strasbourg. Cette démarche, faisant appel à deux techniques complémentaires, s'inscrit dans une volonté de valider nos résultats par rapport à ceux trouver par l'équipe de Strasbourg.

Le spot d'intérêts excisés de façon automatique par le robot MassPREP Station (Micromass, Manchester, UK), a été stocké dans des boites P96 permettant soit la conservation de l'échantillon, soit la digestion des protéines "*in-gel*" par le biais d'une solution de trypsine. A

l'issu de la digestion, la solution est retirée puis mélangée à la matrice avant d'être déposée sur le support d'analyse et étudiée. Les masses des peptides obtenus après digestion sont mesurées avec précision par spectrométrie de masse, l'ensemble de ces masses constituant la carte peptidique massique de la protéine, carte qui s'avère être une véritable empreinte digitale. La protéine peut être alors identifiée en comparant la carte peptidique massique obtenue expérimentalement aux cartes peptidiques massiques théoriques déduites de chacune des séquences présentes dans les banques de données (banques généralistes qui contiennent des données plutôt hétérogènes) et/ou des bases de données (qui contiennent des informations homogènes et spécialisés).

2.4. Stratégie d'identification des protéines

2.4.1. Les banques de données

Les banques de données reposent sur la collaboration de plusieurs groupes donnant un haut niveau d'annotation pour les protéines identifiées. Plusieurs banques "protéiques" sont annotées et disponibles gratuitement sur internet. Ces banques de données sont agencées sous une forme standard afin de retrouver rapidement les informations utiles et alléger le temps de recherche. Les banques de protéines peuvent parfois contenir des données redondantes ou des séquences incomplètes. Pour les banques de données disponibles, les principales sont :

- Swiss-Prot (http://expasy.org/sprot/) créée en 1986 en collaboration entre le groupe d'Amos Buiroch (Swiss Institut of Bioinformatics) et l'EBI (European Bioinformatics Institut), est la plus rigoureuse et regroupe le maximum d'information sur chaque protéine annotée, telles leurs isoformes, leurs modifications post traductionnelles (MPT). Cependant, cette banque fait référence à un nombre limité de protéines à l'égard des autres banques générales exploitées. Un supplément à la banque Swiss-Prot existe, et porte le nom de TREMBL. Ce dernier apporte des informations sur les EST (séquence exprimée suite au clonage et séquençage de l'ADNc) ou sur les CDS (séquence d'ADNc codant obtenu à partir de l'ARN).

- TREMBL-NEW (http://expasy.org/sprot/) est une banque qui contient les nouvelles entrées en attente d'annotation de la banque TREMBL. Les séquences peuvent être partielles et l'analyse de résultats issus de cette banque est à prendre avec prudence.
- PIR (Protéin Information Ressources) (http://pir.georgetown.edu) est une banque crée dans les années 60 et regroupe trois centres que sont NBRF (National Biomedical Research Fondation), MIPS (Munich Information Center for Proteins Sequences) et JIPID (Japan International Protein Information Database). Elle contient des séquences protéiques annotées par des experts issues entre autre de la banque PSD (Protein Sequence Database)
- Genepept est une banque dérivée du site NCBI (National Center for Biotechnology Information) contenant la transcription de CDS en acides aminés.
- NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) regroupe des séquences protéiques provenant essentiellement de la traduction des séquences ADN de EST ou de "contigs" (blocs de séquences qui sont utilisés pour élucider la séquence originale d'ADN). Cette banque intègre également les entrées aux banques Genepept, swiss-Prot, TREMBL et PIR. une description complète de la protéine et une liste importante de références sur celle-ci est alors disponible.
- GenBank diffusé par NCBI, est une collection de toutes les banques publiques de séquences de DNA avec une mise à jour tous les 2 mois. Cette banque de données fait partie de l'International Nucleotide Sequence Database Collaboration dans lequel on retrouve NCBI et EMBL (banque qui contient des séquences d'ADN et d'ARN collectées dans la littérature, brevets et au près des équipes de recherche sur le séquençage).

Les banques de données citées ci-dessus (à l'exception de Genbank) sont mises à jour quotidiennement sur les sites qui les hébergent, d'où la nécessité de les télécharger régulièrement pour être à jour. Ces banques de données sont intégrées dans l'environnement de moteurs de recherche (www.expasy/tools/) tels que Mascot (http://www.matrixscience .com/search_form_select.html), Aldente, Profound (http://prowl.rockfeller.edu/) et ProteinProspector (http://prospector.ucsf.edu/).

2.4.2. Le moteur de recherche Mascot

Les moteurs de recherche utilisés en protéomique tels Mascot exploitent comme données d'entrée une liste de masses monoisotopique qui est extraite à partir du spectre de masse par le logiciel d'acquisition Omega (FT-ICR/MS, Ionspec) dans notre cas. Lors de la soumission de cette liste au moteur de recherche Mascot, dans le cadre de nos études, il nous faut indiquer que nous travaillons dans le cadre d'empreinte peptidique massique (Peptide Mass Fingerprint) avec comme choix de la banque données SwissProt est utilisée dans le cadre de r cette étude. Ensuite apparaissent plusieurs paramètres de réglages indispensables pour mener à bien l'identification de la protéine d'intérêt à savoir :

1) La taxonomie :

Le paramètre de taxonomie permet de cibler la recherche à des catégories bien spécifiques tel que les plantes, les insectes, les mammifères ou l'homme (Figure IV.21.). Ceci peut accélérer une recherche toute en s'assurant que les protéines identifiées sont en rapport avec la catégorie choisie. Toutefois le ciblage n'est possible que dans le cas ou l'on est certain de l'origine de l'échantillon. Sachant que des risques de contaminations sont toujours possibles, il est recommandé toutefois d'effectuer une recherche sur l'ensemble de la banque de données, les résultats non significatif pouvant être écartés en fin de recherche.

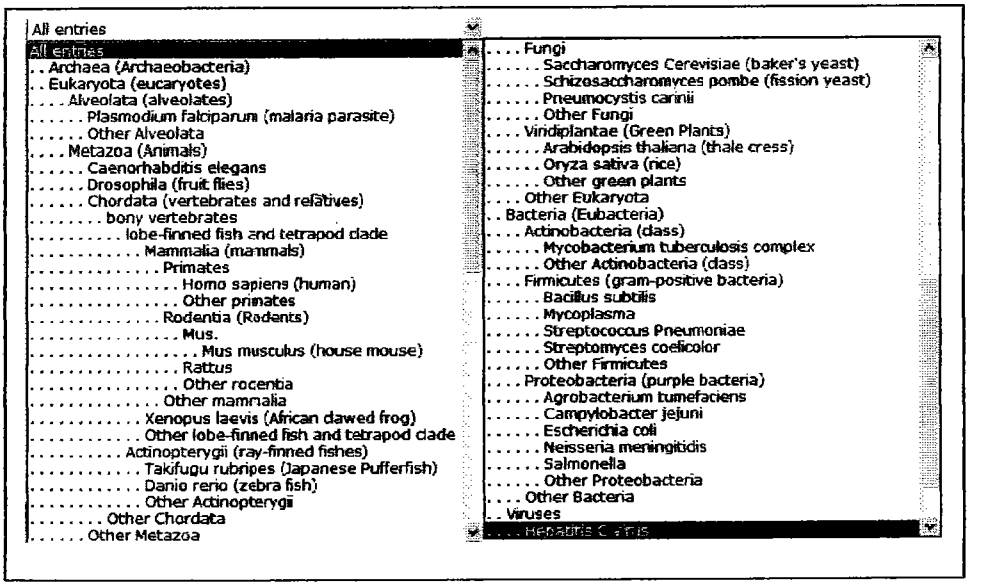


Figure IV. 21. Feuilles d'entrée pour le choix de la taxonomie au niveau du moteur de recherche Mascot.

2) Choix de l'enzyme

Un autre facteur important est le choix de l'enzyme de digestion. En effet, selon le choix de la protéase, le clivage au niveau des protéines peut varier, entraînant la formation de séquences de peptides spécifiques qui seront différentes. Lors de notre étude, nous avons eu recours à la trypsine (Promega), enzyme permettant un clivage spécifique de protéines au niveau de la lysine (K) et de l'arginine (R). Néanmoins cette protéase voit son action inhibée lorsque ces acides aminés sont en présence de proline. Aussi l'utilisation d'une trypsine modifiée, Trypsine/P, peut pallier à cet inconvénient (Tableau IV.7.).

Name	Coupure	Non coupure	N or C term	PM kDa	pH Optimal
Trypsin	KR	P	CTERM	23.3	pH 8.0
Arg-C	R	P	CTERM	26.5	pH 7.5 - 8.5
Asp-N	BD		NTERM	24.5	pH 6.0 - 8.5
Asp-N_ambic	DE		NTERM	24.5	pH 6.0 - 8.5
Chymotrypsin	FYWL	P	CTERM	25.0	pH 7.8
CNBr	M		CTERM		
Formic_acid	D		CTERM		
Lys-C	K	P	CTERM	28.0	pH 8.5
Lys-C/P	K		CTERM	28.0	pH 8.5
PepsinA	FL		CTERM		
Tryp-CNBr	KRM	P	CTERM		
TrypChymo	FYWLKR	P	CTERM		
Trypsin/P	KR		CTERM	23.3	pH 8.0
V8-DE	BDEZ	P	CTERM	29.0	pH 7.8
V8-E	EZ	P	CTERM	29.0	pH 4.0
CNBr+Trypsin	M		CTERM		
	KR	P	CTERM		

Tableau IV. 7. Tableau récapitulatif des caractéristiques de protéases les plus fréquemment utilisées[15].)

3) Les modifications fixes et/ou variables au niveau des protéines.

Les modifications fixes sont des modifications appliquées systématiquement à chaque acide aminé sélectionné. Le logiciel Mascot examine tous les arrangements possibles et tient compte systématiquement de la modification lors de l'identification de la séquence. Ainsi si l'on suppose que la protéine est sujette à une modification fixe de type "phosphorylation" au

15 (15) Stub J. M. *l'analyse protéomique et les bases de données - LSMBO.*

niveau des tyrosines, l'ensemble de ces tyrosines sera considéré comme ayant une masse de 243.0297 au lieu de 163.0633 Da (Figure IV.22).

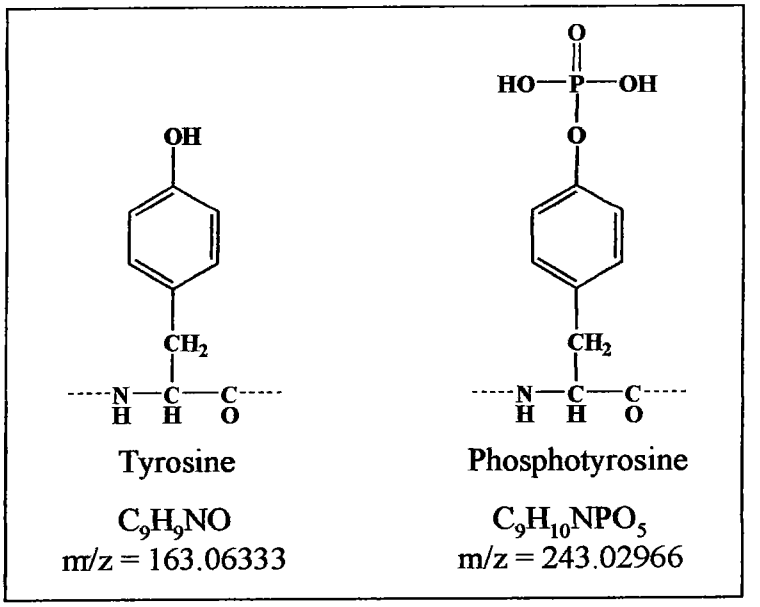


Figure IV. 22. Exemple de modification post traductionnel appliquée à l'acide aminé tyrosine, cette modification entraîne une variation de masse de 79.9663 Da

Les modifications variables quant à elles, sont celles, qui peuvent être présentes de façon aléatoire sur les acides aminés sélectionnés. Dans ce cas, toutes les combinaisons sont prises en compte lors de l'interrogation Mascot qui va tester l'ensemble des possibilités avec ou sans modifications afin de trouver le meilleur résultat (match). Les modifications variables usuelles prisent en compte lors de nos études sont la modification du N-Acéthyl ainsi que l'oxydation des méthionines (Tableau IV.8.).

Nature des MPT	Δ Masse (Da)
Phosphorylation	
pTyr	+80
pSer, pThr	+80
Acétylation	+42
Méthylation	+14
Acylation, acides gras	
farnésyle	+204
myristoyle	+210
palmitoyle...etc	+238
Glycosylation	
N-glycosylation	> 800
O-glycosylation	203, > 800
« Ancre » GPI	> 1000
Hydroxyproline	+16
Sulfatation (sTyr)	+80
Pont Disulfure	-2
Déamidation	+1
Acide Pyroglutamique	-17
Ubiquitine	> 1000
Nitratration des Tyrosines	+45

Tableau IV. 8. Exemple de certaines modifications post-traductionnelles de protéines[16] *pouvant aussi bien être fixes que variables.*

Les modifications variables peuvent être des moyens très puissants d'aboutir à une séquence, mais la prise en compte de ces peptides additionnels peuvent conduire à une augmentation du temps de recherche ainsi qu'à des séquences erronées (faux positifs). Ainsi, il est judicieux d'appliquer ces modifications avec parcimonie et tendre d'avantage vers l'utilisation de modifications fixes.

4) La précision de mesure,

Cette précision de mesure est un facteur important, par défaut elle est étiquetée à 50ppm. Elle peut être améliorée en utilisant une calibration externe tel que des mélanges de peptides ou des calibrants internes tel que des peptides d'autolyse de l'enzyme de digestion. L'erreur est

[16] (16) Mann; Jensen *Nature Biotechnol* **2003**, *21*, 255.

généralement est de 10 à 20ppm pour un TOF-MS/MS (mode réflectron). Pour notre part, les études menées par MALDI-FT-ICR/MS (9,4 Tesla; Ionspec) permettent d'aboutir à des erreurs de masse de l'ordre du ppm lors d'une calibration interne.

2.4.3. Identification

Après avoir lancé la recherche dans les banques de données via le moteur de recheche, des protéines sont identifiées permettant d'obtenir ainsi une séquence. Pour chaque cas, un score Mowse (MOlécular Weight SEarch) est calculé. Ce score est basé sur un algorithme attribuant un poids statistique à chacune des masses expérimentales obtenues lors des analyses FT-ICR/MS retenues dans la séquence considérée. Le score Mowse est un indice de confiance. Pour une valeur Mowse inférieure à 70, il y a plus de 5% de risques que la protéine identifiée soit le fait d'une répartition aléatoire des masses obtenue. Ainsi plus l'indice de confiance est élevé et plus nous sommes certain que la protéine retenue correspond à l'échantillon étudié (Figure IV.23.) selon notre protocole d'analyse.

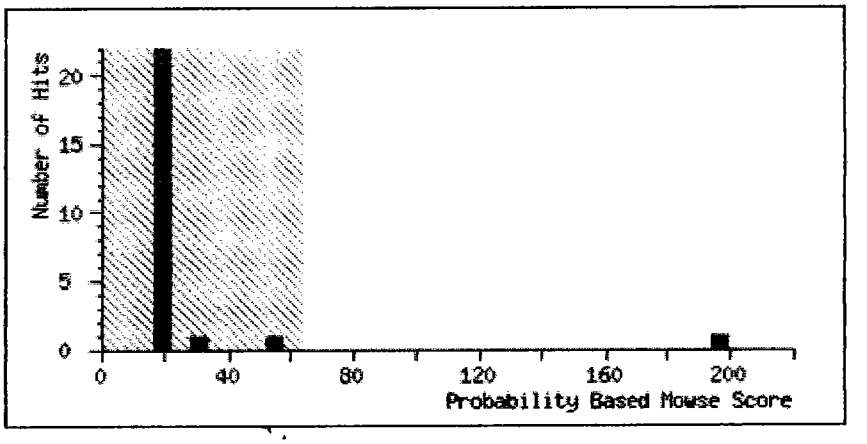


Figure IV. 23. Diagramme représentatif des indices de confiances (Mowse score) des séquences retenues par le moteur de recherche concernant les études menées sur la lignée cellulaire HT29. L'axe des ordonnées correspond au nombre de séquences retenues, l'axe des abscisse correspond à l'indice de confiance de chaque cas retenu et la zone rayée est représentative des résultats non significatifs.

Néanmoins le score n'est pas le seul paramètre significatif. D'autres éléments doivent être pris en compte, notamment la masse de la protéine, son point isoélectrique, le nombre de peptides retenu pour l'identification. Ces deux premiers paramètres discriminants sont

accessibles à partir du gel bidimensionnel sur lequel le spot a été prélevé. Elles permettent de confirmer ou d'infirmer les résultats retenus par le logiciel Mascot.

De même le nombre de peptides retenus par rapport au nombre total de peptides considérés est gage d'une identification correcte. En effet, un nombre important de peptides retenus conduit à un recouvrement de la séquence élevé permettant de valider le résultat obtenu.

en ce qui concerne nos analyses de cellules HT29, 23 peptides ont été retenus sur un total de 71, conduisant à un recouvrement de 47% dont la couverture de séquence est visible ci-dessous (Figure IV.24.)

```
  1 MSILEIHARE IFDSRGNPTV EVDLFTSKGL FRAAVPSGAS TGIYEALELR
 51 DNDKTRYMGK GVSKAVEHIN KTIAPALVSK KLNVTEQEKI DKLMIEMDGT
101 ENKSEFGANA ILGVSLAVCK AGAVEKGVPL YRHIADLAGN SEVILPVPAF
151 NVINGGSHAG NKLAMQEFMI LPVGAANFRE AMRIGAEVYH NLKNVIKEKY
201 GKDATNVGDE GGFAPNILEN KEGLELLKTA IGKAGYTDKV VIGMDVAASE
251 FFRSGKYDLD FKSPDDPSRY ISPDQLADLY KSFIKDYPVV SIEDPFDQDD
301 WGAWQKFTAS AGIQVVGDDL TVTNPKRIAK AVNEKSCNCL LLKVNQIGSV
351 TESLQACKLA QANGWGVMVS HRSGETEDTF IADLVVGLCT GQIKTGAPCR
401 SERLAKYNQL LRIEEELGSK AKFAGRNFRN PLAK
```

Figure IV. 24. La couverture de séquence (47%), les acides aminés en rouge correspondant aux peptides identifiés.

Ce pourcentage de couverture correspond à la proportion d'acides aminés détectés par rapport à la somme totale des acides aminés de la protéine. La base de données, nous donne également accès aux séquences peptidiques des pics de masses retenues lors de l'identification. De plus, la position des peptides dans la séquence de la protéine (Start-End), la valeur expérimentale (Observed) et théorique (Calc) des peptides, l'écart entre ces deux valeurs (Delta), le nombre de clivages manqués par l'enzyme de digestion (Miss) et la séquence des peptides (Sequence) qui peut comporter d'éventuelles modifications post-traductionnelles (MPTs) décelées lors de l'interrogation sont autant de critères à prendre en compte afin d'apporter un poids acceptable à la validation sur le nom de ou des protéines proposées par la banque de données. Dans le cas présent, il apparaît clairement que les écarts de masse observé sont inférieurs de 0,005 Da, qu'il n'y a que 5 clivages manqués sur 23 peptides retenus et les séquences sont exempt de MPTs (Figure IV.25.). Ce qui tend à penser que la proposition de nom fournit par la base de données est justifiée.

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss	Sequence
16 - 28	1405.7068	1405.7068	1405.7089	-0.0021	0	R.GNPTVEVDLFTSK.G
33 - 50	1803.9322	1803.9322	1803.9366	-0.0044	0	R.AAVPSGASTGIYEALELR.D
51 - 56	747.3552	747.3552	747.3511	0.0041	1	R.DNDKTR.Y
65 - 71	809.4404	809.4404	809.4395	0.0009	0	K.AVEHINK.T
72 - 80	898.5485	898.5485	898.5487	-0.0002	0	K.TIAPALVSK.K
81 - 89	1087.5872	1087.5872	1087.5873	-0.0001	1	K.KLNVTEQEK.I
82 - 89	959.4922	959.4922	959.4923	-0.0001	0	K.LNVTEQEK.I
127 - 132	703.4028	703.4028	703.4017	0.0011	0	K.GVPLYR.H
184 - 193	1142.6086	1142.6086	1142.6084	0.0002	0	R.IGAEVYHNLK.N
203 - 221	1959.9180	1959.9180	1959.9173	0.0007	0	K.DATNVGDEGGFAPNILENK.E
222 - 228	800.4652	800.4652	800.4643	0.0009	0	K.EGLELLK.T
234 - 239	653.3031	653.3031	653.3020	0.0011	0	K.AGYTDK.V
240 - 253	1539.7757	1539.7757	1539.7755	0.0002	0	K.VVIGMDVAASEFFR.S
254 - 262	1071.5212	1071.5212	1071.5236	-0.0024	1	R.SGKYDLDFK.S
257 - 262	799.3759	799.3759	799.3752	0.0007	0	K.YDLDFK.S
257 - 269	1553.7025	1553.7025	1553.6998	0.0027	1	K.YDLDFKSPDDPSR.Y
263 - 269	772.3367	772.3367	772.3351	0.0016	0	K.SPDDPSR.Y
270 - 281	1424.7164	1424.7164	1424.7187	-0.0023	0	R.YISPDQLADLYK.S
307 - 326	2032.0497	2032.0497	2032.0476	0.0021	0	K.FTASAGIQVVGDDLTVTNPK.R
359 - 372	1524.7639	1524.7639	1524.7619	0.0020	0	K.LAQANGWGVMVSHR.S
407 - 412	805.4463	805.4463	805.4446	0.0017	0	K.YNQLLR.I
413 - 420	903.4542	903.4542	903.4549	-0.0007	0	R.IEEELGSK.A
427 - 434	958.5336	958.5336	958.5348	-0.0012	1	R.NFRNPLAK.-

Figure IV. 25. Séquences peptidiques des pics de masses retenues pour l'identification

Le dernier paramètre, et non des moindres, correspond à l'erreur globale obtenue sur l'ensemble du jeu de valeurs. Cette erreur est désignée par "*RMS error*", elle est calculée à partir des écarts entre les valeurs de masses calculées et expérimentales (Figure IV.21.) d'où l'intérêt d'avoir une grande précision en masse lors de nos analyses. Lors d'une analyse, toute "*RMS error*" supérieure à 25ppm met en avant un résultat erroné. Dans notre cas, l'observation des valeurs expérimentales et calculées met en avant des écarts de masses de ± 2,5 ppm conduisant à une erreur globale ("*RMS error*") de 1ppm (Figure IV.26.)

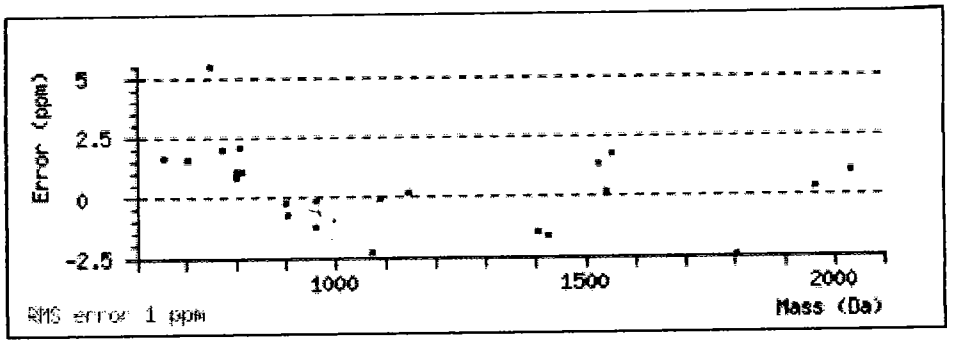


Figure IV. 26. Distribution des écarts (ppm) pour chaque peptide retenus.

Ainsi, la prise en compte de la masse moléculaire, du point isoélectrique du ou des protéines relatif au spot sélectionné, la taxonomie, le nombre de peptides retenus par rapport au nombre total de peptides, la couverture de la séquence ainsi que l'exactitude et la précision des masses des peptides retenus sont autant de paramètre discriminants

Afin de valider nos résultats, une analyse en parallèle a été effectuée par MALDI-TOF-TOF/MS au LSMBO par l'équipe du Professeur Van Dorsselaer. Comme nous pouvons le voir dans le tableau ci-dessus, l'échantillon a été identifié comme étant de l'énolase 1 ou une de ses variantes. Le recouvrement et le nombre de peptides retenus étant similaires pour les deux techniques. Néanmoins l'avantage de notre technique se situe au niveau de l'exactitude et de la précision en masse. En effet, bien que la technique TOF-TOF/MS permette d'atteindre une erreur globale faible sur la mesure de 12 ppm, notre technique permet d'aller plus loin en fournissant une erreur de 1 ppm (Tableau IV.9.).

		Taxo	MW (Da)	pI	% R	nbre de peptides	RMS error (ppm)
TOF-TOF	Alpha-enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Non-neural enolase)	Human	47008	6.99	47	18	12
	Enolase 1 variant (Fragment)	Human	47167	7.01	47	18	12
	Enolase 1 variant (Fragment)	Human	47111	7.01	47	18	12
FT-ICR	Enolase 1	Human	47139	7.01	47	23	1
	Enolase 1 variant (Fragment)	Human	47167	7.01	47	23	1
	Enolase 1 variant (Fragment)	Human	47111	7.01	45	22	1
	2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase; carbonate dehydratase	Human	47079	7.01	44	22	1

Tableau IV. 9. Identification d'une protéine issue de cellules HT29 par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF/MS (LSMBO, Strasbourg) et par MALDI-FT-ICR/MS (LSMCL, Metz)

Il est à noter que le moteur de recherche se fonde entièrement sur l'extraction de la liste de masses monoisotopiques expérimentale. Si le logiciel fait un écart dans l'assignation du pic monoisotopique, conduisant à une erreur de masse non négligeable, la recherche dans les banques de données conduit à une identification erronée.

2.4.4. Calibration des spectres de masses liées aux analyses en protéomiques

Aussi, l'identification d'une protéine est fortement dépendante de l'exactitude des masses considérées. Lors de nos analyses, nous n'avons pas échappé à cet écueil. Ainsi, afin d'accéder à la banque de donnée nous avons eu recours au logiciel FTDoc Viewer (Ionspec, USA). Il s'est avéré que les fichiers calibrés et sauvegardés via le logiciel d'acquisition Omega présentent des décalages en masse lorsque ceux-ci été exploités sous FTDoc Viewer.

Un exemple bien représentatif de ce phénomène correspond au spectre d'un mélange de peptides dédié à la calibration externe. Le spectre a été obtenu à partir 1 µl de 2,5DHB (1M, ACN/H_2O, 50/50, 0,5% TFA) ajouté à 1µL d'une solution d'angiotensine II, P14R et ACTH 18-39 (10 nM, H_2O) caractérisés respectivement par les ions protonés m/z 757,3997, m/z 1046,5423, m/z 1533,8582 et m/z 2465,1989. Lors de la calibration du mélange, la précision obtenue fut de ± 0,2 Da sur une gamme de 700 à 2500Da (Tableau IV.10.).

	Masse fournie par le logiciel d'acquisition Omega (Da)	Masse fournie par le logiciel d'acquisition FTDocViewer (Da)
Bradykinine	757.39910	757.39919
Angiotensine II	1046.54200	1046.54214
P14R	1533.85744	1533.85755
ACTH 18-39	2466.19762	2466.19863

Tableau IV. 10. Masses des ions protonés issus de l'analyse MALDI-FT-ICR/MS du mélange peptidique d'angiotensine II, P14R et ACTH 18-39

Comme nous pouvons le voir (colonne de droite), l'utilisation du logiciel FTDoc Viewer engendre un décalage en masse significatif par rapport aux masses sous Omega, de 0,00009Da pour l'ion relatif à la bradykinine jusqu'à 0,01Da pour l'ion protonée de l'ACTH 18-39. Ce problème vient du fait que la calibration effectuée sous Omega ne soit pas reconduite sous FTDoc Viewer. Cela étant d'autant plus problématique qu'une haute résolution et une bonne précision en masse soient nécessaires pour l'identifier des protéines. De plus, FTDoc Viewer n'étant qu'un logiciel de visualisation, toute calibration s'est avéré impossible. Pour nous affranchir de ce problème, nous avons eu recours à un autre logiciel d'analyse, Peak Hunter, qui non seulement tenait compte de la calibration du logiciel d'acquisition Omega, mais qui permet également une calibration pseudo-interne du spectre de masse considéré. Il est à noter que dans le cadre de la calibration pseudo-interne, le FT-ICR/MS en mode MALDI, procède à l'acquisition et du stockage simultané (hexapôle) des ions issus d'un dépôt de calibrants et d'un dépôt d'analyte. Ces étapes étant réalisées, le paquet d'ions est transféré vers la cellule ICR ou analyte et calibrant sont détectés. Dans le cadre de l'analyse d'une solution de protéines extrait à partir de spots de gel, cette approche sera utilisée.

2) Choix de la calibration

Afin d'observer les répercussions d'une calibration externe au niveau des analyses protéomiques, une première étude a été menée sur un échantillon préalablement identifié par MALDI-TOF-TOF/MS (LSMBO, Strasbourg, l'équipe du Professeur Van Dorsselaer) calibré en externe à l'aide d'un mélange de peptide (Kit 206195, Brucker, Karlsruhe, Allemagne). Les protéines étudiées, ont été extrait du spot soumit à une digestion trypsique de 16 heures à l'aide d'une solution ACN/H_2O (60/40, v/v).

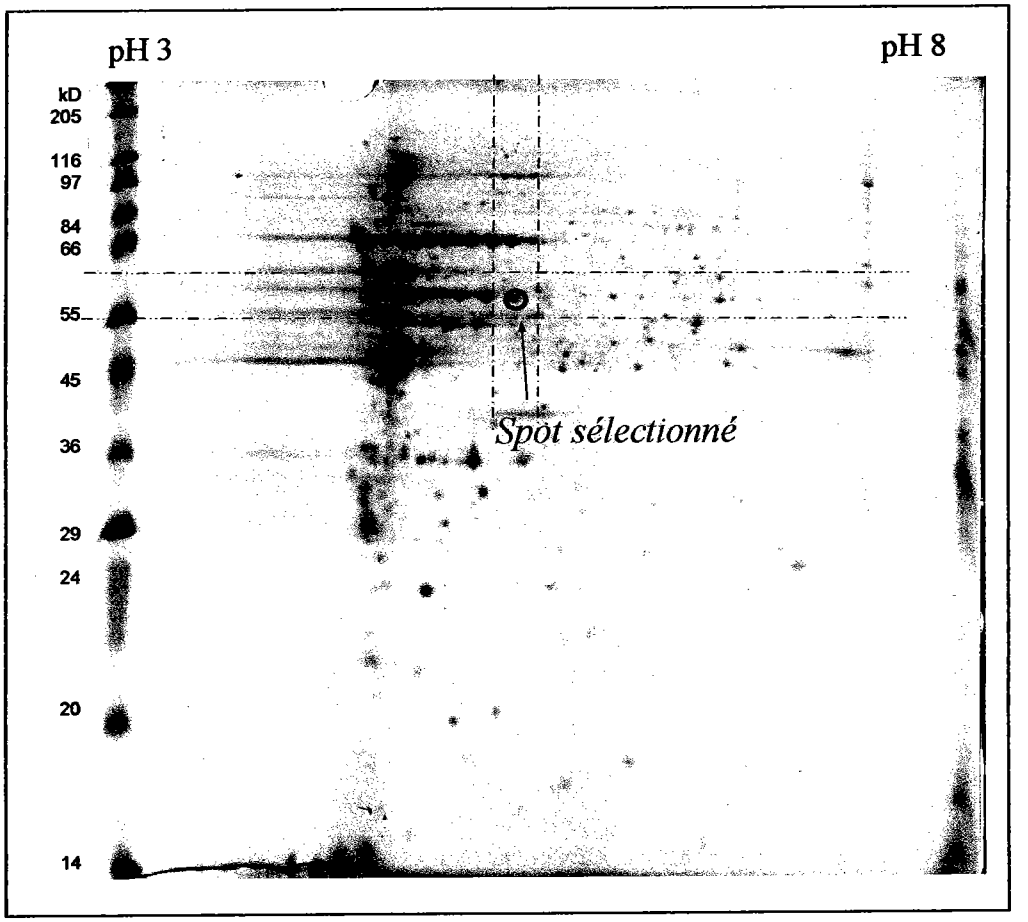


Figure IV. 27. Gel Bidimensionnel SDS-PAGE de cellules HT29, le spot considéré, pour l'analyse par spectrométrie de masse, se défini par un pI ≈ 6 et une masse de 57kDa environ.

La position du spot sur le gel, permet de définir un point isoélectrique ainsi qu'une masse aux protéines qui seront à extraire. Ainsi, pour cette analyse le pI est d'environ 6 tandis que la masse se situe entre 55kDa et 60kDa (Figure IV.27.). Ces deux éléments permettent déjà de valider nos résultats à venir.

Au bout de 60 minutes d'extraction, 1 µL de cette solution a été prélevé et déposé avec 1 µL de 2,5 DHB (1M dans ACN/H_2O, 50/50, v/v + 0,5% TFA) sur la plaque d'échantillonnage. L'acquisition par MALDI-FT-ICR/MS de la protéine initialement identifiée par MALDI-TOF-TOF/MS comme étant PDAI3, nous a fournit le spectre de masse reporté ci-dessous (Figure IV.28.).

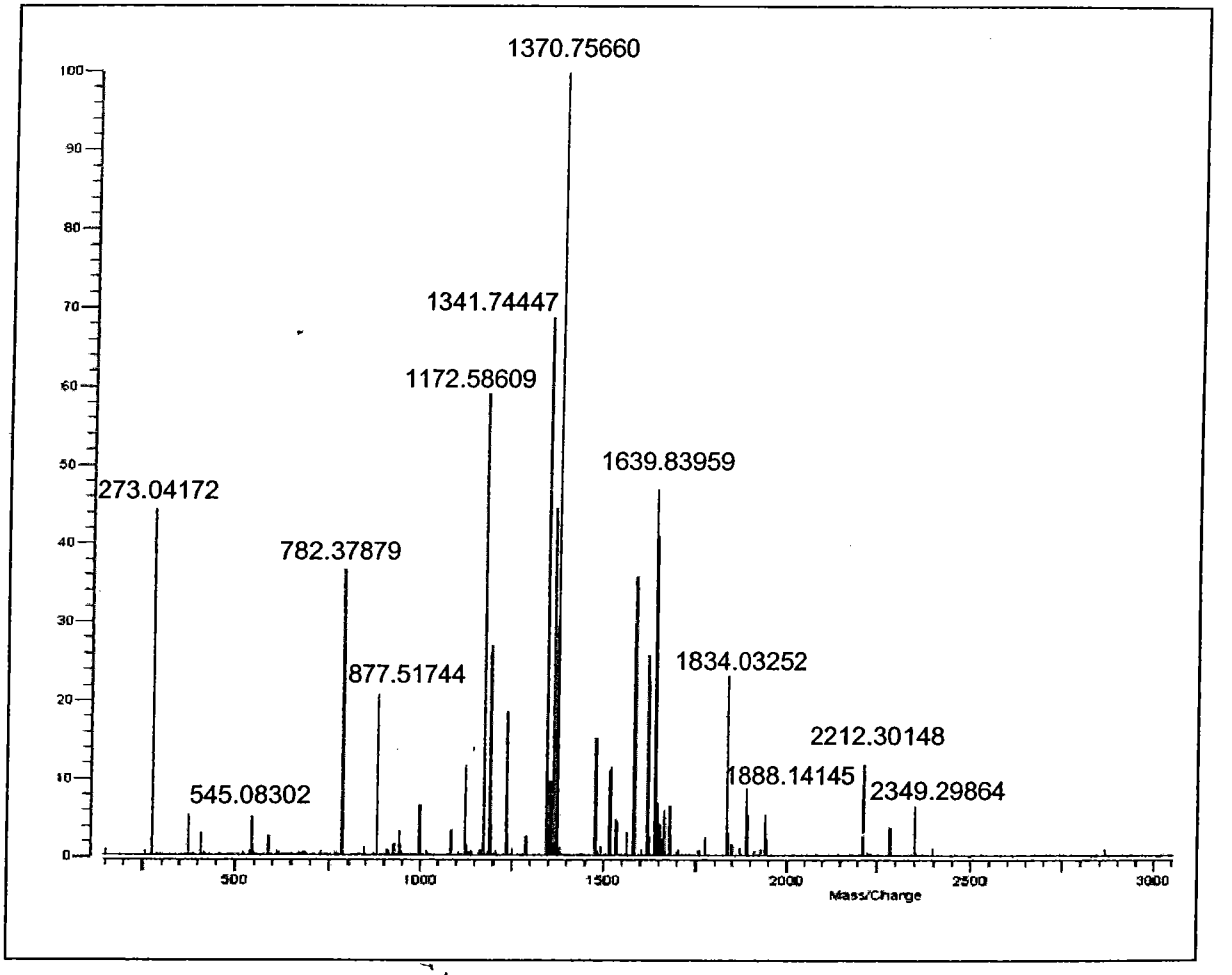


Figure IV. 28. Spectre de masse MALDI-FT-ICR/MS (9,4 Tesla) en calibration externe

En nous basant sur les informations relatives à la position du spot excisé au niveau du gel bidimensionnel, à savoir sa gamme de masse [55kDa, 60kDa] et son point isoélectrique ≈6, et en se basant sur les résultats préalablement obtenus par MALDI-TOF-TOF/MS, il s'est avéré que les résultats issus de notre analyse par MALDI-FT-ICR/MS étaient non significatifs en ce qui concernait l'identification de la protéine PDAI3 comme nous pouvons le voir dans le tableau IV.11..

Instrument	Identification	N° Accession	Organisme	MW / pI	% de R	Nbre de peptides	Nbre total de peptides	Erreur ppm	calibration
TOF-TOF	PDIA3	P30101	humain	56747/5.98	57	35	66	15	externe
FT-ICR	PDIA3	P30101	humain	56747/5.98	25	17	106	38	externe

Tableau IV. 11. Données issues du moteur de recherche Mascot en ce qui concerne l'identification de la protéine PDAI3 après analyse par MALDI-TOF-TOF/MS et par MALDI-FT-ICR/MS

En effet, il s'avère que nos analyses par MALDI-FT-ICR/MS s'accompagnent dans ce cas précis d'une erreur de 38 ppm bien trop importante (>25 ppm) pour que le résultat puisse être pris en compte. Néanmoins, en comparant la liste de pics de masses obtenus à la fois par TOF-TOF/MS et FT-ICR/MS, il s'est avéré que les mêmes pics de masse avaient été retenus mais que leurs valeurs différaient de 0,3 Da d'une technique à l'autre. Afin de résoudre ce problème, nous avons eu recours à une calibration "pseudo interne" basée sur deux acquisitions successives : la première se faisant au niveau du dépôt de notre analyte et la seconde au niveau d'un dépôt MALDI de la protéine P14R dont l'ion $[M+H]^+$ est détecté à m/z 1533,8582. L'avantage de cette technique est de visualiser sur un même spectre de masse les ions issus de l'échantillon et du calibrant sans pour autant qu'il y ai interaction directe entre les deux composés. Les résultats obtenus à l'issue de l'acquisition en mode "pseudo interne" (p- interne) sont indiqués dans le tableau IV.12. ci-dessous.

Instrument	Identification	N° Accession	Organisme	MW / pI	% de R	Nbre de peptides	Nbre total de peptides	Erreur ppm	calibration
TOF-TOF	PDIA3	P30101	humain	56747/5.98	57	35	66	15	externe
FT-ICR	PDIA3	P30101	humain	56747/5.98	25	17	106	38	externe
FT-ICR	PDIA3	P30101	humain	56747/5.98	50	32	110	12	p-interne

Tableau IV. 12. Données issues du moteur de recherche Mascot relatives à l'identification de la protéine PDAI3 après analyse par MALDI-TOF-TOF/MS et par MALDI-FT-ICR/MS

Les résultats obtenus lors de l'acquisition en calibration pseudo interne (p- interne) révèlent que 32 peptides sur 110 ont été retenus contre 17 sur 106 en calibration externe permettant de passer de 25 à 50% de recouvrement avec une erreur de 12 ppm au lieu de 38 ppm, un peu

meilleure que celle obtenue par MALDI-TOF-TOF/MS, donnant l'identification de la protéine PDAI3 comme significative. Ainsi, bien que la calibration externe permette d'aboutir à une erreur de 0,2 ppm sur une gamme de 800 à 2500 Da. Aussi, la calibration "pseudo interne" effectuée par le logiciel "Peak Hunter" semble donner les meilleurs résultats.
Aussi, pour la suite de nos analyses en protéomiques, nous effectuerons une calibration "pseudo interne" suivie de la soumission de la carte peptidique massique expérimentale aux banques de donnée via le moteur de recherche Mascot.

2.5. Analyses protéomiques appliquées à la thérapie photodynamique

Afin de visualiser les effets du traitement photodynamique au niveau de cellules cancéreuses, nous avons entrepris d'effectuer une approche protéomique sur des cellules carcinomales du colon humain (HT29). Pour cette étude, quatre échantillonnages cellulaires ont été retenus :

- les cellules HT29 non incubées avec le Foscan® et non irradiée (G188), les cellules ont été incubées avec du milieu de croissance (RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v). Après un temps de 24 heures, celui-ci a été retiré et la surface de nos cellules a été lavée par deux fois avec du RPMI et par trois fois avec du PBS. Il s'en est suivi d'un ajout de RPMI afin que les cellules ne se dessèchent pas. Il est à noter que ces cellules ont baigné dans le RPMI durant le même temps que les échantillons à irradier, cette mesure a été prise afin d'avoir le même protocole d'échantillonnage d'un échantillon à l'autre. Suite à cela, le milieu fut retiré et les cellules furent lavées par deux fois au RPMI et par trois fois au PBS.

- les cellules HT29 non incubées avec le Foscan® et irradiée (G189), les cellules ont été incubées avec du milieu de croissance (RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v). Après un temps de 24 heures celui-ci a été retiré et la surface de nos cellules a été lavée par deux fois avec du RPMI et par trois fois avec du PBS. Il s'en est suivi un ajout de RPMI afin que les cellules ne se dessèchent durant l'illumination laser (λ = 652nm, 0,095 J/cm², t = 45s). A l'issu de l'illumination, le milieu fut retiré et les cellules furent lavées par deux fois au RPMI et par trois fois au PBS.

- les cellules HT29 incubées avec le Foscan® et non irradiée (G186), les cellules ont été incubées avec une solution Foscan® (1µg/mL, RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v). Après 24 heures, celui-ci a été retiré et la surface de nos cellules a été lavée par deux fois avec du RPMI et par trois fois au PBS. Afin de rester notre protocole, nous avons procéder à un ajout de RPMI suivi de deux lavages au RPMI et trois au PBS.

- les cellules HT29 incubées avec le Foscan® et irradiée (G187), les cellules ont été incubées avec une solution Foscan® (1µg/mL, RPMI/SVF/ETOH, 97/2/1, v/v/v). Après 24 heures, celui-ci a été retiré et la surface de nos cellules a été lavée par deux fois avec du RPMI et par trois fois avec du PBS. Il s'en est suivi un ajout de RPMI afin que les cellules ne se dessèchent durant l'illumination laser (λ = 652nm, 0,095 J/cm², T = 45s). A l'issu de l'illumination, le milieu fut retiré et les cellules furent lavées par deux fois au RPMI et par trois fois au PBS.

A l'issu de ces manipulations, les cellules ont été extraites selon le protocole d'extraction de protéines en vigueur au laboratoire d'oncologie du Centre Alexis Vautrin (Annexe) et conditionnées afin de procéder à la mise en place des gels bidimensionnels. Un numéro a été attribué par la suite à chaque gel à savoir G186 et G187 pour les cellules incubées avec le Foscan® avec et sans irradiation laser, G188 et G189 pour les cellules non incubées au Foscan® avec et sans irradiation laser.

Durant mes études, il s'est avéré que la migration des protéines varient légèrement d'un gel à l'autre (à cause de la présence de sels), la mise en évidence des modifications des empreintes protéiques des cellules ne peut se faire qu'en comparant par superposition des gels le profil protéique général de chaque gel bidimensionnel. Les protéines dont la coloration est la plus intense vont tenir le rôle de repères, permettant ainsi de mettre en évidence si les protéines observées sont communes ou non à l'ensemble des gels considérés.

Les gels bidimensionnels élaborés à partir des cellules HT29 présentes des protéines sur une gamme de 14 à 205 kDa pour un pH allant de 5 à 8. Lors de nos observations, une plage plus restreinte (masse 45 - 66kDa, pH 5 – 6,5) a retenu notre attention, l'intensité de la coloration au bleu de Coomassie permettant d'effectuer une différentiation fine et correcte (Figure IV.29.).

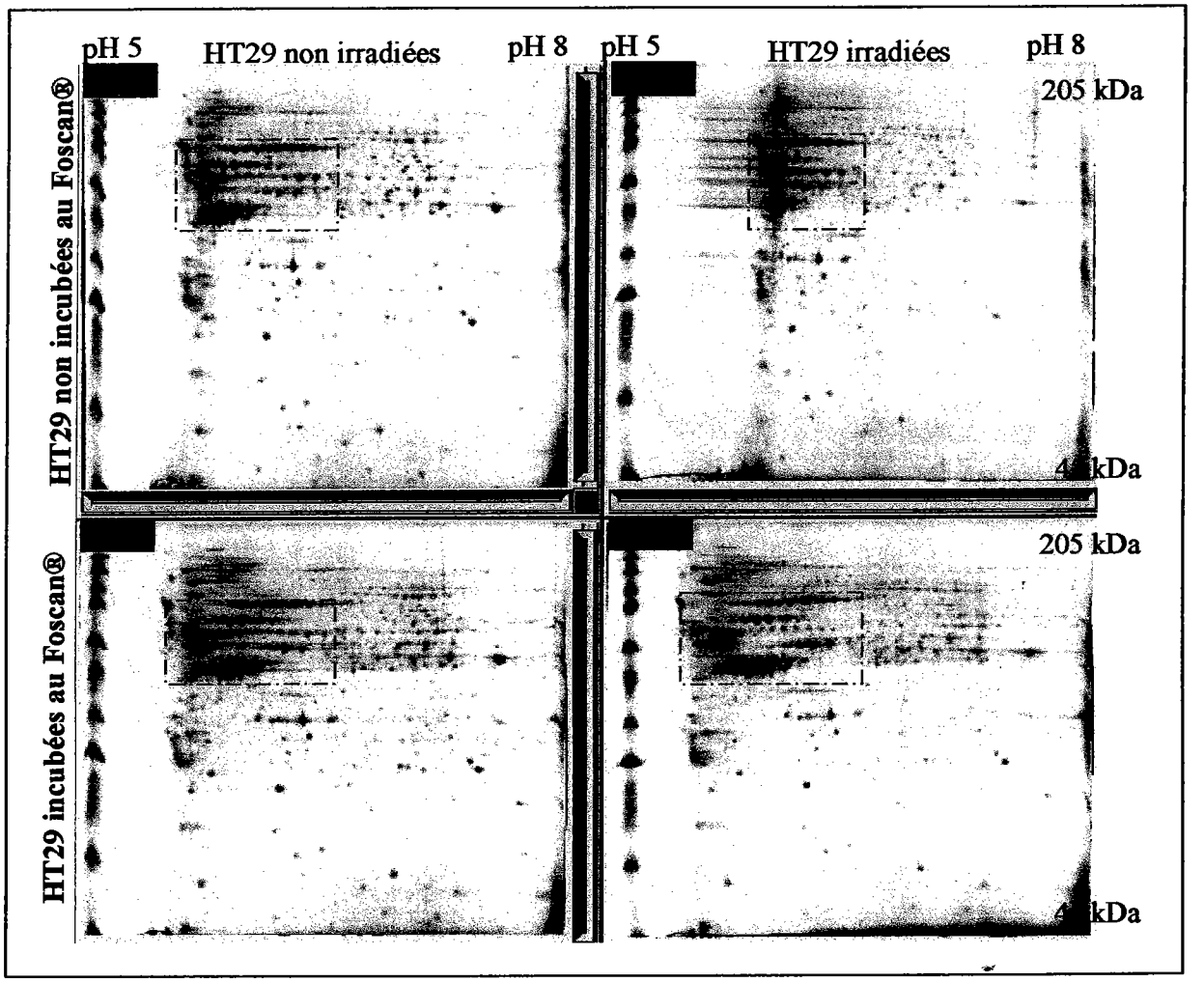


Figure IV. 29. Gels différentiels de nos cellules HT29 avec et sans incubation au Foscan® ainsi qu'avec et sans illumination laser. Les zones d'intérêts pour la différentiation sont délimitées par le rectangle rouge.

La comparaison faite entre les catégories cellules non irradiées et cellules irradiées dans un premier temps puis entre la référence "cellules non incubées au Foscan® et non irradiées" et les cellules ayant subit le traitement photodynamique "cellules incubées au Foscan® et irradiées" dans un second temps laisse apparaître des différences quant à la présence ou l'absence de certaines protéines comme nous pouvons le voir sur la figure IV.26..

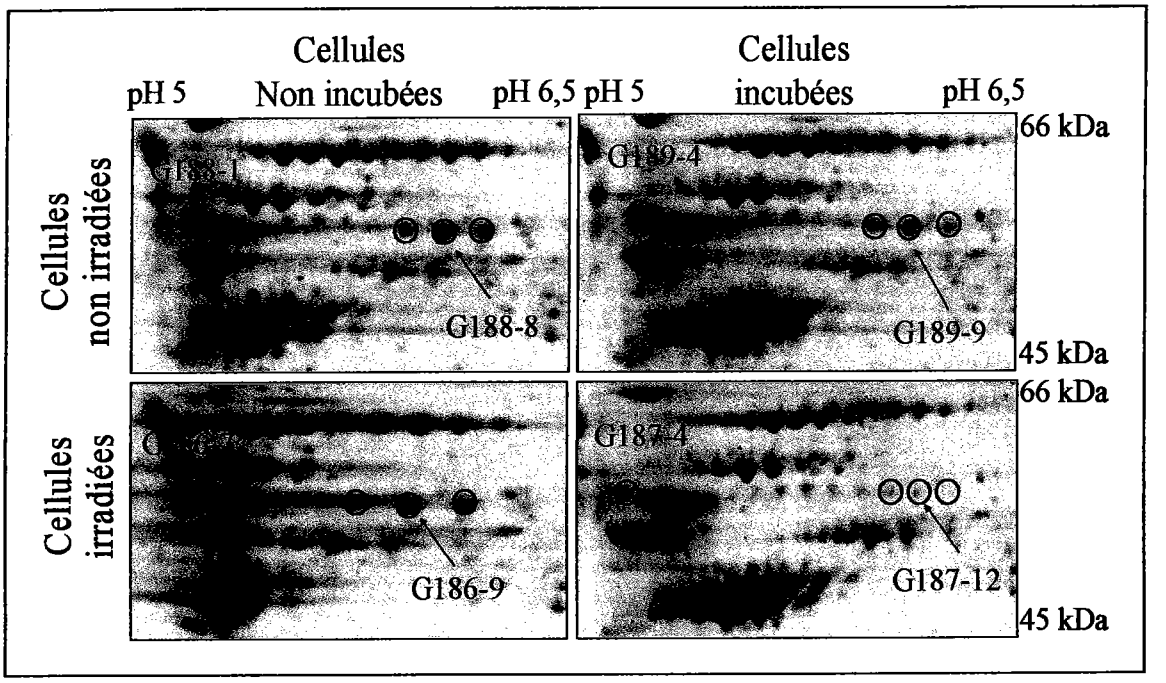


Figure IV. 30. Quartiers des gels différentiels mettant en avant des différences quant à la présence ou l'absence de certaines protéines liées soit à l'illumination laser (cercles bleus) soit au traitement PDT (cercles rouges).

En comparant les cellules non irradiées aux cellules irradiées, nous voyons la disparition d'une protéine à pH 5 et MW ≈ 60kDa (cercles bleus, figure IV.30.) que ce soit pour les cellules incubées ou non incubées au Foscan®. Ainsi, il est possible d'avancer l'hypothèse selon laquelle la "suppression" de la protéine serait uniquement liée à l'irradiation laser, seul facteur discriminant entre les deux échantillons.

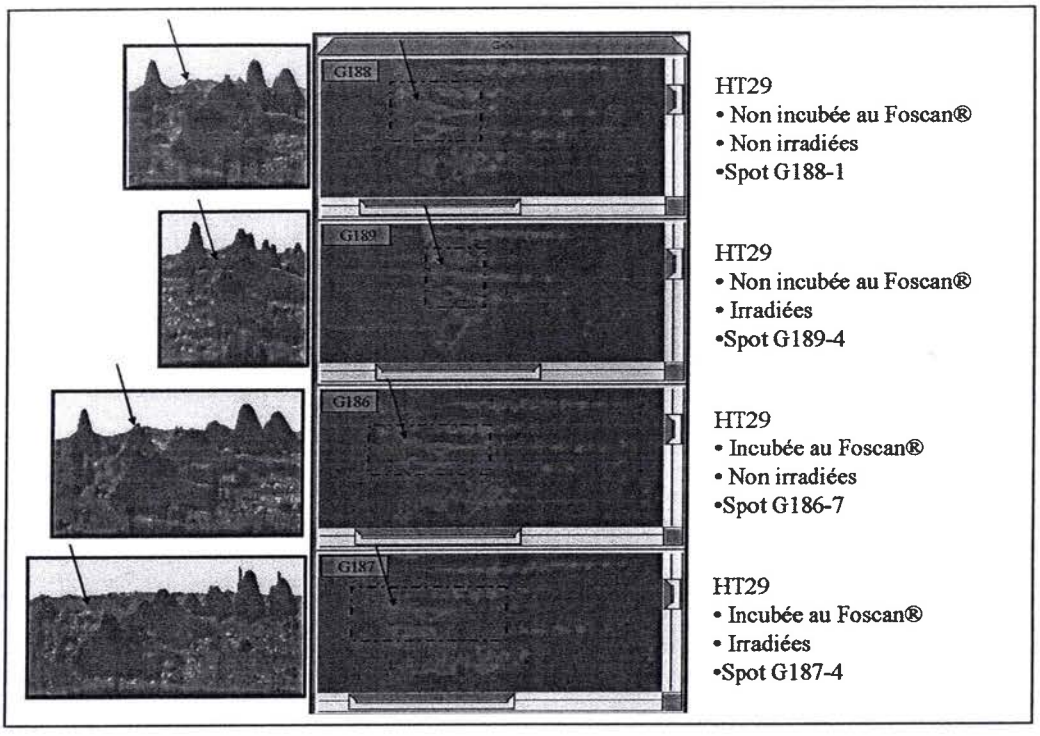


Figure IV. 31. Visualisation 3D par le logiciel Image Master 2D Platinum des quartiers de gels différentiels relatifs à la protéine sensible à l'illumination laser.

Afin d'affiner nos observations, nous avons eu recours au logiciel Image Master 2D Platinum (Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)). Ce dernier nous a permis un traitement informatique des quartiers des gels différentiels, permettant une modification de la palette de couleurs et du contraste afin d'observer plus aisément les protéines d'intérêt dans un premier temps, d'aboutir à une tridimensionnelle prenant en compte l'intensité de la coloration de la protéine (Figure IV.31) et de déterminer l'intensité des protéines sélectionnées (tableau IV.13).

Cellules HT29	Ref gel 2D	pI	MM	Intensité	ratio d'intensité
sans Foscan, sans illumination	G188-1	4.76	57081	82	1.49
sans Foscan + illumination	G189-4	4.76	57081	55	
avec Foscan, sans illumination	G186-7	4.76	57081	97	2.77
avec Foscan + illumination	G187-4	4.76	57081	35	

Tableau IV. 13. Tableau des intensités des protéines "sensibles" à l'illumination laser.

Nous avons référencé ci-dessus l'intensité des protéines retenues pour "illumination laser", effectivement les cellules irradiées voient l'intensité de leur protéine diminuée mais contrairement à notre attente cette diminution n'est pas suffisamment prononcée pour établir une sous expression. En effet, dans le cas d'une sur ou sous expression, le rapport d'intensité entre deux protéines identiques devant être au minimum de 3 voir 4.

La même démarche a été appliquée afin de mettre en avant les effets du traitement photodynamique.

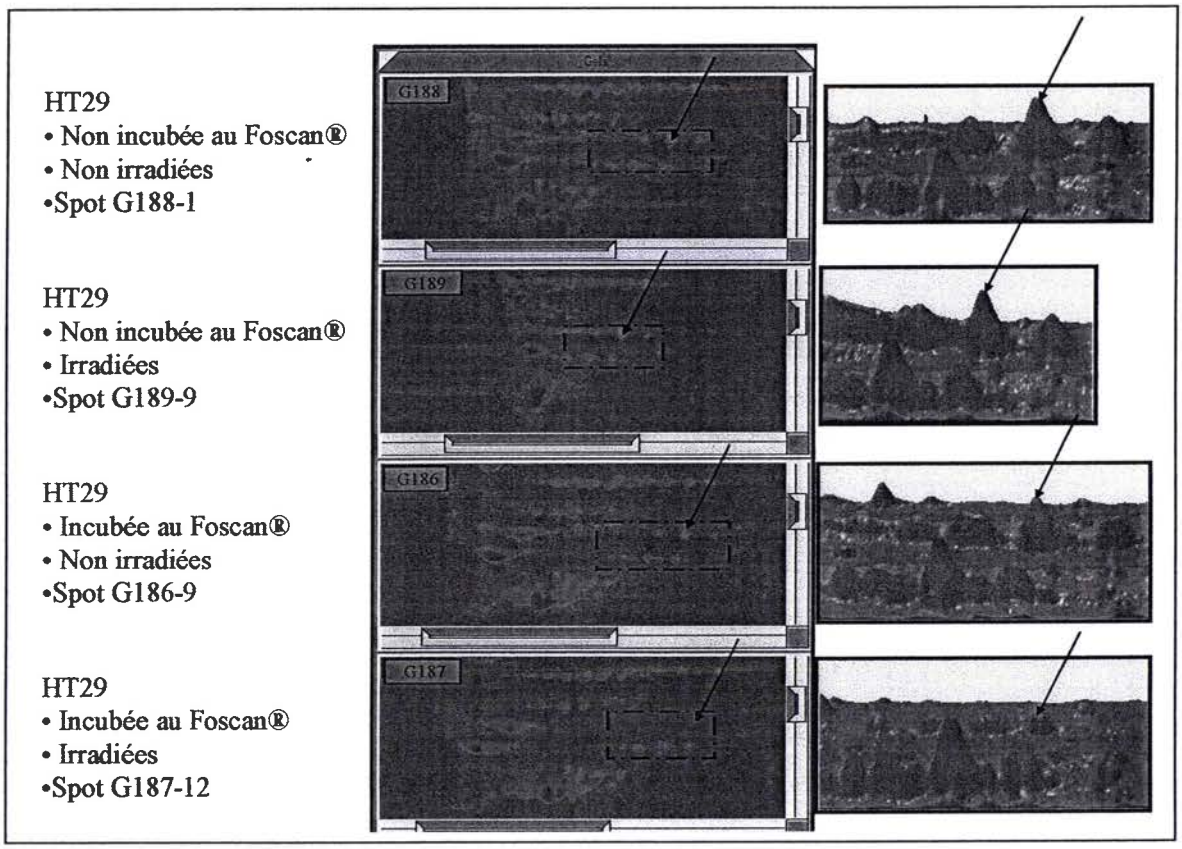


Figure IV. 32. Visualisation 3D par le logiciel Image Master 2D Platinum des quartiers de gels différentiels relatifs à la protéine sensible à l'illumination laser.

En effet, la comparaison entre les cellules de références (cellules non incubées au Foscan® et non illuminées) et les cellules traitées par PDT (cellules incubées au Foscan® et illuminées) a permis de distinguer une disparition de(s) protéine(s) (pH ≈ 6, MW ≈ 60kDa) uniquement dans le cas des cellules traitées par PDT. Sachant que les autres cas ne présentent pas d'altération, cette suppression n'est assimilable qu'au traitement photodynamique.

Cellules HT29	Ref gel 2D	pI	MM	Intensité	ratio d'intensité
sans Foscan, sans illumination	G188-8	5.98	56747	131	4.36
sans Foscan + illumination	G189-9	5.98	56747	139	
avec Foscan, sans illumination	G186-9	5.98	56747	101	
avec Foscan + illumination	G187-12	5.98	56747	30	

Tableau IV. 14. Tableau des intensités des protéines "sensibles" au traitement PDT.

Comme précédemment, nous avons référencé ci-dessus l'intensité des protéines "sensibles" au traitement PDT, l'observation de ces données met en avant que seule la protéine relative aux cellules incubées au Foscan et illuminée est sujette à une perte d'intensité importante.
Il est à noter que cette fois ci, le calcul du ratio d'intensité révèle qu'il y a bien une sous expression de la part de la protéine suite au traitement photodynamique. Ainsi, afin d'identifier cette protéine, une étude en protéomique par spectrométrie de masse MALDI-FT-ICR/MS s'avère indispensable. Nous prélèverons la tache visible pour les cellules exemptes de traitement PDT et une zone correspondant à l'emplacement approximatif de cette dernière pour les cellules dans les conditions PDT.

2.6. Analyses protéomiques par spectrométrie de masse

2.6.1. Résultats de l'analyse

Les spectres de masses des solutions de protéines analysées ont fournis une carte peptidique massique qui après soumission aux banques de données via le moteur de recherche Mascot ont générés les résultats indiqués dans le tableau IV.15..

Tableau IV. 15. Identification des protéines après sélection des spots d'intérêts des gels G186, G187, G188 et G189

Ref gel	Identification	N° Accession	Organisme	MW / pI	% de R	Nbre de peptides	Nbre total de peptides	Erreur ppm	Technique
G186-7	PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	humain	57081/4.76	64	41	78	9	TOF-TOF
G186-7	PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	humain	57081/4.76	51	22	76	1	FT-ICR
G186-9	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101	humain	56747/5.98	60	37	80	15	TOF-TOF
G186-9	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101	humain	56747/5.98	55	31	119	8	FT-ICR
G187-4	PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	humain	57081/4.76	62	37	69	8	TOF-TOF
G187-4	PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	humain	57081/4.76	37	19	52	5	FT-ICR
G187-12	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101	humain	56747/5.98	53	31	54	12	TOF-TOF
G187-13	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101	humain	56747/5.98	55	33	103	12	FT-ICR
G188-1	PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	humain	57081/4.76	68	41	85	13	TOF-TOF
G188-1	PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	humain	57081/4.76	72	48	135	8	FT-ICR
G188-8	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101	humain	56747/5.98	58	37	82	14	TOF-TOF
G188-8	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101	humain	56747/5.98	54	31	90	1	FT-ICR
G189-4	PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	humain	57081/4.76	57	37	79	8	TOF-TOF
G189-4	PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor	P07237	humain	57081/4.76	40	24	101	1	FT-ICR
G189-9	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101	humain	56747/5.98	59	35	82	13	TOF-TOF
G189-9	PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor	P30101	humain	56747/5.98	53	30	91	1	FT-ICR

Tableau IV.15. Identification des protéines après sélection des spots d'intérêts des gels G186, G187, G188 et G189. La Réf gel correspondant au gel ainsi que le spot considéré, la couleur de la police faisant référence soit à l'effet laser (vert) soit à l'effet PDT (rouge) considéré dans chacun des cas. Le numéro d'accession correspond à la référence Expasy (http://expasy.org/) de la protéine identifiée. Est indiqué également dans ce tableau le taux, de recouvrement de la séquence (% de R), le nombre de peptides retenus et le nombre total de peptides. L'erreur en ppm correspondant à l'erreur globale sur l'ensemble du spectre obtenu à partir de la technique utilisée, à savoir la spectrométrie de masse à temps de vol (TOF-TOF/MS) ou par résonance cyclotronique des ions FT-ICR/MS.

La comparaison entre les deux techniques MALDI-TOF-TOF/MS et MALDI-FT-ICR/MS révèle que le nombre de peptides retenu pour mener à bien l'identification de la protéine est plus important dans le cas des analyses par MALDI-TOF-TOF/MS. Cependant, le nombre total de peptides ainsi que la précision en masse est meilleure dans le cadre de l'étude par résonance cyclotronique des ions MALDI-FT-ICR/MS.

Il est à noter que le nombre de peptides retenu lors de nos analyses par MALDI-FT-ICR/MS est plus faible que celui obtenu par MALDI-TOF-TOF/MS, cela pouvant s'expliquer par le fait que nous n'avons pas pris en compte de modifications post traductionnelles lors du lancement de la recherche au sein des banques de données et par le nombre important d'étapes d'extraction de protéines au niveau du spot du gel qui a été effectué à savoir 6 extractions de 7µL d'ACN/H_2O (60/40, v/v) conduisant à une diminution probable de la concentration en protéine de l'échantillon analysé.

Comme nous pouvons le voir (Tableau IV.15.), l'identification obtenue que ce soit par MALDI-TOF-TOF/MS ou par MALDI-FT-ICR/MS aboutit pour les spots relatifs à l'illumination laser à l'identification de la protéine "*PDIA1 Protein disulfide-isomerase precursor*" ayant pour numéro d'accession P07237 tandis que pour les spots relatifs à l'effet PDT, la protéine a été identifiée comme étant "*PDIA3 Protein disulfide-isomerase A3 precursor*" ayant pour numéro d'accession P30101.

Il est à noter que l'analyse des "spots" adjacents à la protéine PDAI3 a mis en avant la présence d'isomères. Ces dernières ayant une conformation différente, leur point isoélectrique en est légèrement modifié entraînant un "étalement" lors de l'électrofocalisation (Figure IV.33).

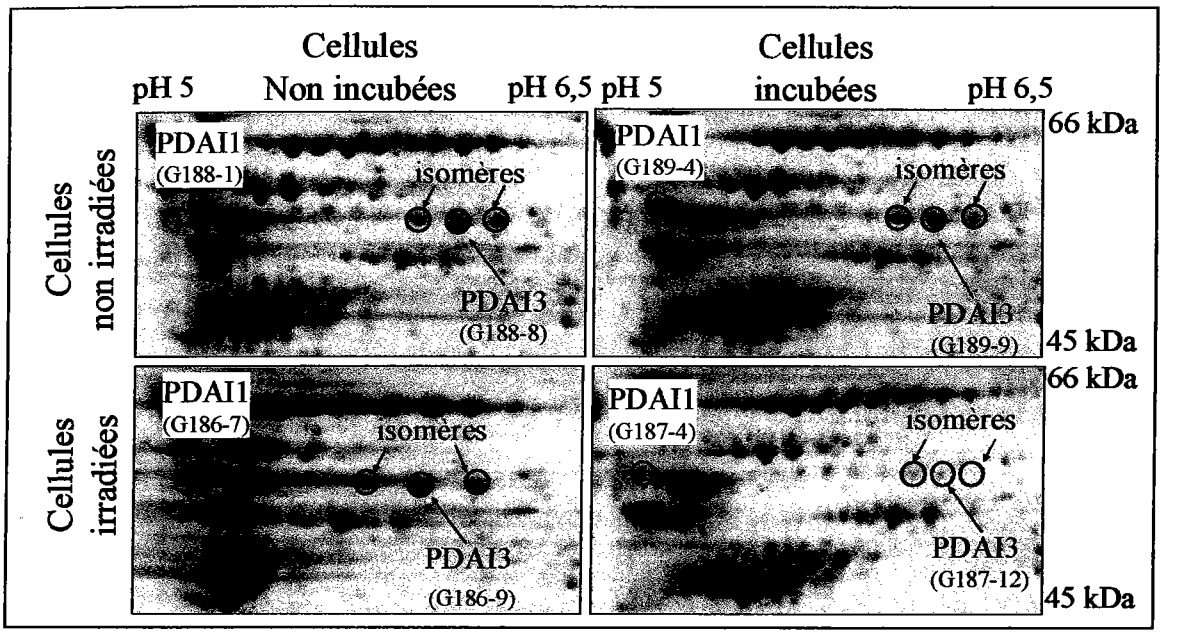


Figure IV. 33. Assignation des identités des spots analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF/MS et MALDI-FT-ICR/MS

Ces deux protéines sont des disulfides isomérases (PDI) localisées dans le réticulum endoplasmique dont l'activité enzymatique à savoir la capacité à catalyser la formation, la rupture et le réarrangement des liaisons disulfides a été mis en évidence au début des années 1960 par le groupe de Anfinsen[17]. Les réarrangements s'effectuent à l'aide des cystéines de deux sites actifs de séquences WCGHCK, similaires à ceux de la thiorédoxine, et peuvent initier par une oxydation, une réduction ou une isomérisation (Figure IV.34.)

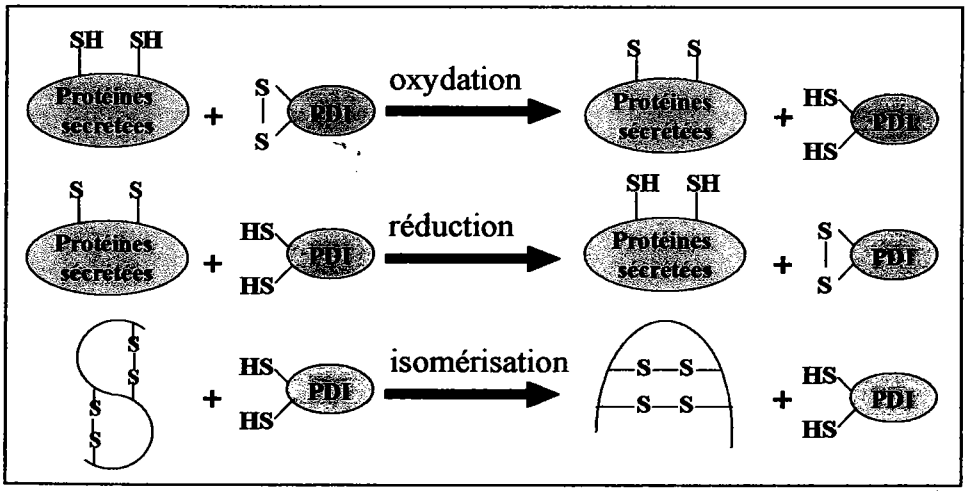


Figure IV. 34. Réactions catalysées par une protéine disulfide isomérase[18].)

17 (17) Goldberger R.F.; Epstein J.; Anfinsen C.B. *J. Biol. Chem.* **1963**, *238*, 628-635.

18 (18) Bulleid, N. J. *Current Biology* **2003**, *13*, 380.

Il est à noter que l'état d'oxydo-réduction de la disulfide isomérase détermine les réactions catalysées. L'oxydation produit une PDI réduite, qui a son tour peut initier une réaction de réduction ou d'isomérisation à moins que la PDI ne soit oxydée de nouveau par la protéine endoplasmique oxydoréductase 1 (Ero1)[19].

Il a également été démontré que selon son environnement son mode d'action différait. A la surface de cellules, elles semblent agir en tant que réductase qui rompt des liaisons disulfide des protéines attachées à la cellule. À l'intérieur de la cellule, elle semble réarranger les liaisons disulfide des protéines naissantes. A concentration élevée, les PDI ont une activité dite "chaperonne", et sont alors capables de reconnaître des protéines incorrectement repliées ou mal assemblées au sein des complexes et empêchent ainsi leur agrégation tandis qu'à basse concentration, elles facilitent l'agrégation (activité dite "d'anti-chaperonne")[20].

La sous expression de la PDIA3 est compréhensible dans le cas du traitement photodynamique de la monocouche de cellules HT29, l'activation à 652nm de l'agent photosensible (Foscan®) entraîne la formation d'oxygène singulet au niveau du réticulum endoplasmique pouvant avoir soit une action directe sur la protéine identifiée PDAI3, soit une action indirecte par l'activation de mécanismes cellulaires tel que l'apoptose. Il est à noter que des travaux parus en 2002 laisseraient penser que cette PDI répertoriée sous la référence P30101 serait spécifique à des cellules tumorales[21].

[19] (19) Benham A.M.; Cabibbo A.; Fassio A.; Bulleid N.; Sitia R.; Braakman I. *EMBO J.* **2000**, *19*, 4493-4502.

[20] (20) Chih-chen Wang *Biochemistry (Moscow)* **1998**, *63*.

[21] (21) R. A. Harris **2002**, *2*, 212 – 223.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION GENERALE

Si les premiers travaux concernant la thérapie photodynamique PDT datent des années 60, ce n'est que récemment qu'elle s'impose comme une nouvelle approche thérapeutique en oncologie. Elle repose sur un concept séduisant : l'activation sélective par la lumière (laser) de molécules (photosensibilisateurs) ayant une certaine affinité pour les tissu tumoraux. Lors de ces recherches, nous nous sommes intéressés en particulier à un des agents photosensibles, le Foscan® (5,10,15,20- tetrakis meso(tetrahydroxyphenyl)chlorine ou m-THPC ou témoporphine), agent de seconde génération, qui est couramment utilisé en PDT à l'heure actuelle. De nombreux renseignements sur la nature de la m-THPC et de son comportement en différents milieux ont été obtenus par spectrophotométrie UV-Vis, fluométrie ou encore cytométrie de flux (localisation cellulaire, rendement quantique).

La technique d'ionisation douce MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization), l'augmentation de la résolution spatiale, de la précision en masse et de la sensibilité des détecteurs donnent à la spectrométrie de masse de nouvelles perspectives dans l'analyse *in situ* de photosensibilisants.

Ces travaux s'inscrivent dans la continuité des recherches engagées au sein de notre laboratoire depuis 1999. Il a notamment été montré par MALDI-FT-ICR/MS (spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier) que l'agent photosensible m-THPBC (Bactériochlorine) en milieu eau/éthanol (99/1, v/v) subit une déshydrogénation pour donner la m-THPC qui elle-même produit la porphyrine m-THPP[1]. Suite à ces travaux de recherches initiées en 2001, par MALDI-TOF/MS (spectrométrie de Masse à Temps de Vol) ont confirmée le processus de déshydrogénation avec comme nouveau résultat la mise en évidence de la phototransformation de la m-THPP en dimère de structure [$(m\text{-}THPP)_2$ – 2H]. Ces recherches ont abouti à la mise en place d'un protocole de caractérisation par MALDI-TOF/MS de cellules entières imprégnées ou non d'agents photosensibles tels que la m-THPC[2].

---

1 (1) Angotti, M. *Thèse à l'Université Paul verlaine, Metz* **2001**.
2 (2) Lourette, N. *Thèse à l'Université Paul verlaine, Metz* **2004**.

Ce travail de thèse, réalisé en étroite collaboration ave le Centre Alexis Vautrin, Vandoeuvre-lès-Nancy et le Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique de Strasbourg avec le soutient financier de la Ligue contre le Cancer (comité 57), s'articule selon deux axes principaux qui sont :

- La mise en évidence de la production, par spectrométrie de masse, de l'espèce l'oxygène moléculaire singulet.

- La détermination des noms des protéines potentiellement impliqués dans le processus PDT (approche protéomique)

Le premier volet de l'étude concernant l'oxygène moléculaire singulet s'est déroulée en milieu aqueux (éthanol/eau, 1/99, v/v) en utilisant une sonde spécifique qui est en l'occurrence le 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF). Suite à une optimisation des conditions de solvatation des matrices MALDI (2,5 DHB, 10^{-2}M, ACN/eau, 30/70, v/v), les études par MALDI-TOF/MS permettent la détection simultanée, sur un même spectre, de la sonde moléculaire DPBF, du photosensibilisateur m-THPC et du composé ortho-dibenzoylbenzène (o-BB) produit de la réaction DPBF et du composé oxygène moléculaire singulet. Fort de ces premiers résultats, des études ont été menées sur un mélange DPBF/Foscan® (10^{-5}M en milieu éthanol/eau, 1/99, v/v) après illumination laser (λ = 655 nm, 30 mJ, 120 minutes). Les analyses par MALDI-TOF/MS révèlent, outre la présence d'oxygène moléculaire singulet, la formation d'espèces telles que $[m\text{-}THPP + H]^+$, $[m\text{-}THPC + OH]^+$, $[m\text{-}THPC + (OH)_2 - H]^+$ et $[(m\text{-}THPC)_2 - 2H]^+$.

Par la suite, nous avons effectué les même études, non plus en solution, mais au sein de cellules tumorales intactes HT29 (adénocarcinome humain). Après s'être assuré de l'internalisation de nos composés d'intérêt (DPBF et Foscan®) et ce par des études par microscopie à épifluorescence et par spectrométrie de masse MALDI-TOF/MS via l'utilisation de la digitonine en tant que "perméabilisant membranaire", nous avons mis au point un mode d'échantillonnage qui permet la détection de la production de l'oxygène moléculaire singulet directement au sein des cellules intactes HT29. Parallèlement, des études sur la toxicité (test MTT) révèlent que les composés DPBF et o-BB ne sont pas photocytotoxiques. Cela s'avère très important dans le dans les travaux concernant la caractérisation des protéines potentiellement impliquées dans le mécanisme PDT. En effet, s'il est envisagé par la suite d'étudié à la fois la production d'oxygène moléculaire singulet

ainsi que l'identification de protéine, alors nous pouvons avancer le fait que l'action de la PDT au niveau des protéines n'est du qu'à la présence du photosensibilisant Foscan®.

Le deuxième grand volet de nos recherches concerne l'approche protéomique effectuée par MALDI-FT-ICR/MS. Ces travaux ont débutés par la validation de calibrants que sont l'ubiquitine, l'insuline bovine et le cytochrome C de bœuf. Ceux-ci seront utilisés dans toutes la démarche afin de calibrer les spectres de masses et ainsi d'accéder à des masses exactes, atout majeur notamment lors de l'interrogation de banques de données. Lors de travaux sur des monocouches cellulaire HT29 et MCF7 (adénocarcinome humain du colon et du sein) en présence de DPBF et/ou Foscan®, avant et après illumination laser (652nm, 10 $J.cm^{-2}$, 40 minutes), les résultats par MALDI-TOF/MS nous permettent d'avoir une information directe sur l'impact de l'oxygène moléculaire singulet vis-à-vis de protéines spécifiques et ce par analyse *in situ* de cellules intactes. Il nous fallait alors mettre un nom sur ces protéines éventuellement impliquées lors du processus PDT.

Une approche protéomique, par MALDI-FT-ICR/MS (9,4 Tesla) sur des cellules HT29 a lors été engagée. Après séparation des protéines cellulaires par électrophorèse SDS-PAGE bidimensionnelle, nous nous sommes focalisés sur des protéines qui semblent sur ou sous exprimées, aspect qualitatif effectué sur le gel. Suite à la digestion des "spots" sélectionnés, l'analyse par MALDI-FT-ICR/MS 9,4 T a permis, suite à l'interrogation de la banque de données Swiss Prot via le moteur de recherche Mascot, de caractériser les protéines PDAI1 et PDAI3. Ces deux protéines, de la famille des disulfides isomérases (PDI) sont localisées dans le réticulum endoplasmique, cible privilégiée du Foscan®. Ainsi, ces protéines seraient des cibles de l'action du photosensibilisateur via la production d'oxygène moléculaire singulet généré suite à l'illumination laser. Ces deux protéines seraient alors impliquées directement ou indirectement dans le processus de mort cellulaire.

Ces recherches ouvrent la voie sur une approche spécifique au niveau protéomique du mécanisme PDT.

PERSPECTIVES

PERSPECTIVES

Dans la continuité de ces études en protéomiques, concernant la compréhension des mécanismes d'apoptose liés à la thérapie photodynamique, deux voies nous semblent particulièrement intéressante être aborder :

La première repose sur la détermination de temps de "références" correspondant à l'extraction des protéines de cellules HT29. En effet, il a été mis en évidence, par le biais de marqueurs apoptotiques (), que l'expression de l'apoptose des cellules HT29 est initié à t = 4 heures pour être maximale un maximum à t = 24 heures. Ainsi, une séparation par électrophorèse sur gel 2D SDS-PAGE correspondant à ces deux temps, permettrait de visualiser les protéines les plus sollicitées et des informations sur la distribution du profil protéique des cellules avant traitement PDT jusqu'à la mort de ces dernières. La spectrométrie de masse à résonance cyclotronique des ions à Transformée de Fourier (FT-ICR/MS) s'avère être une technique de choix tant par sa haute précision en masse que par sa résolution afin de mener à bien ces études en protéomiques ciblées.

La seconde approche consistera à explorer un modèle plus complexe comparé aux les lignées cellulaires maintenues en culture, la sensibilité aux agents anticancéreux de ces dernières pouvant être non représentative de la sensibilité d'un patient, probablement parce que les interactions avec le microenvironnement ne sont pas prises en compte. Le choix de xénogreffes s'avère être un choix tout à fait indiqué afin de se rapprocher des études *in vivo*. En effet, celles-ci sont obtenues à partir de fragments de tumeurs humaines implantés chez la souris *nude* et présentent les avantages tels qu'une croissance contrôlée, une bonne reproductibilité ainsi qu'une conservation de nombreuses propriétés de la tumeur d'origine notamment au niveau de la morphologie, des altérations moléculaires, de l'hétérogénéité tumorale et de la sensibilité à certaines drogues. Là encore, la spectrométrie de masse haute résolution MALDI-FT-ICR/MS, complétée l'électrophorèse bidimensionnelle SDS-PAGE, sera un atout dans l'obtention de résultats pertinents et précis concernant la caractérisation des protéines partiellement impliqués lors de la mort cellulaire suite au traitement PDT. Ces différentes approches pouvant être menée tout particulièrement sur le photosensibilisateur Foscan® afin d'apporter des informations supplémentaires sur son rôle au niveau des

mécanismes de la Thérapie Photodynamique. Cependant, il est à noter que de telles approches peuvent être également appliquées à d'autres types de photosensibilisateurs, notamment de 3ème génération voire à de nouvelles molécules pressenties anticancéreuses.

ANNEXES CHAPITRE II

Rappels spectroscopiques

Les symboles Σ, Δ, g, u, +, - et les indices sont liés à la symétrie des orbitales ou des états considérés (Peter W. Atkins, Chimie physique 6ème édtion, DeBoeck university, 2000). Ainsi afin de caractériser une orbitale ou un état différents éléments de symétrie doivent être pris en compte, notamment :

a) Les symboles de parité

Les orbitales moléculaires des molécules diatomiques homonucléaires sont affectées d'un indices g ou u qui précise leur parité, c'est-à-dire leur comportement lors d'une inversion. Pour déterminer la parité, on considère un point quelconque d'une molécule diatomique homonucléaire et on note le signe de l'orbitale. On se déplace ensuite sur une droite passant par le centre de la molécule jusqu'à un autre point de l'autre coté à égale distance du centre ; c'est l'inversion et le point est le centre d'inversion. Si l'orbitale conserve le même signe, on la note g (de l'allemand *gerade* signifiant pair). Si l'orbitale est de signe opposé, on la note u (de l'allemand *ungerade* signifiant impair) (Fig. 1.)

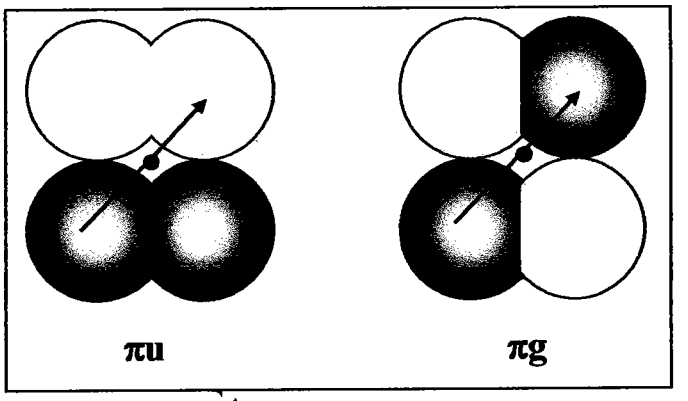


Fig. 1. *Représentation de la parité d'orbitales π d'une molécule diatomique homonucléaire. Une orbitale est paire (g) si la fonction d'onde reste inchangée par inversion par rapport au centre de symétrie de la molécule, mais impair (u) lors la fonction d'onde change de signe.*

b) Les symboles des termes spectroscopiques

Les orbitales moléculaires de O_2 sont complètes, sauf les deux dernières π qui ont deux électrons célibataires. Ces deux électrons étant π, ceux-ci ont des moments orbitaux λ1 et λ2

qui peuvent être soit 1 ou -1 indépendamment. La résultante du moment angulaire totale Λ peut ainsi être:

- soit 1 - 1 = 0, correspondant à Σ,
- soit 1 + 1 = 2, correspondant à Δ.

Lorsque les moment orbitaux sont les mêmes, les spins sont forcément différents à cause du principe de Pauli donc

Pour Δ, $\Lambda = 2$, la multiplicité est égale à 2S +1, sachant que S = 1/2 -1/2 = 0 nous obtenons une valeur de 1 d'où le terme $^1\Delta$.

Pour Σ, $\Lambda = 0$, les moments orbitaux sont 1 et -1, aucun spin n'est exclu. On obtient ainsi (1/2, 1/2) et (-1/2, -1/2) donnant S = 1 conduisant à une multiplicité 2S + 1 = 3 ou (1/2, -1/2) donnant S = 0 conduisant à une multiplicité 2S + 1 = 1. De ce fait les termes à notre disposition sont $^1\Sigma$ et $^3\Sigma$.

Comme il y a deux électrons, tous deux π_g, la parité globale = g x g = g. D'où les termes $^1\Delta_g$, $^1\Sigma_g$, $^3\Sigma_g$.

Les termes + et – en exposant indique quant à eux le comportement de la fonction d'onde moléculaire par réflexion dans le plan passant par le noyau. Si l'on considère que O_2 a un électron dans une orbitale $2\pi_x$, dont le signe ne change pas par symétrie par rapport au plan *xz*, et le second électron dans une orbitale $2\pi_y$, dont le signe change par réflexion par rapport à ce plan (Fig. 2.), la symétrie globale est : (+) x (-) = (-).

La notation symbolique est donc $^3\Sigma^-_g$. Ainsi les termes seront $^3\Sigma^-_g$, $^1\Delta_g$, $^1\Sigma^+_g$ représentatif de l'oxygène bimoléculaire à l'état fondamentale, au premier état excité singulet et au second état singulet.

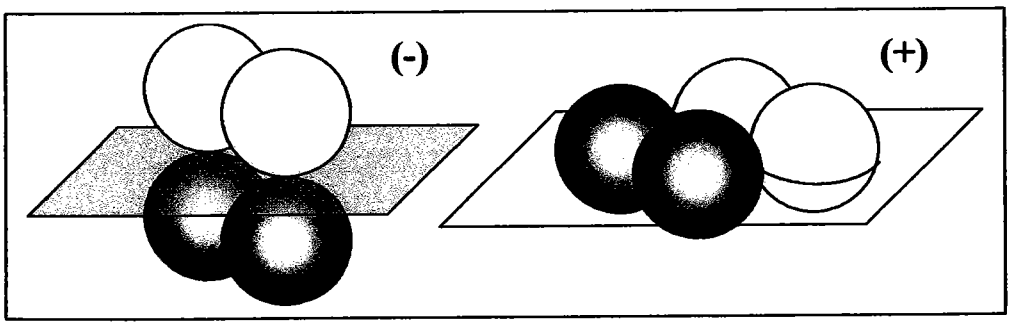


***Fig. 2.** Dans un terme, le symbole (+) et (-) se rapporte à la symétrie d'une orbitale lors de la réflexion dans un plan passant par les deux noyaux.*

ANNEXES CHAPITRE IV

Préparation des lysats cellulaires

Collecte et lyse des cellules

Immédiatement après irradiation, ou à des temps variables, recueillir le surnageant des BP dans un tube de 50ml.

Laver 2X les BP avec 5ml de PBS et le récupérer dans tube 50ml.

Sécher les BP, et les placer à –80°C pendant au moins 1h.

Centrifuger les tubes à 4°C, 1 500 trs/min

Laver 2X avec 5ml de PBS froid.

Reprendre le culot avec 1ml de PBS froid et transvaser dans des tubes Eppendorf.

Centrifuger à 4°C, 1 500 trs/min (centrifugeuse Biomol programme 17).

Éliminer le surnageant.

Congeler les culots secs à –20°C.

Mettre les BP sur lit de glace, et ajouter 1ml de tampon de lyse* froid et gratter.

Ajouter les cellules au culot des surnageants.

Maintenir les tubes Eppendorf dans la glace pendant 30min.

Vortexer toutes les 5min.

Centrifuger à 4°C, 15 000g, 20min (programme 6)

Fractionner les surnageants (50µl/tube). Conserver à –80°C.

Tampon de lyse* :

- EDTA = 1mM = 0,336 mg/ml
- Triton X-100 Sigma T9284 = 1%
- Tris-HCl = 10mM = 1,21g/L, pH 7,4

Ajouter extemporanément PMSF (anti-protéase) au tampon de lyse

Préparer une solution de PMSF à 10mg/ml dans l'éthanol

Puis dilution au 1/100ème dans tampon de lyse (1ml tampon de lyse + 10µl PMSF)

⇒ Concentration finale de la PMSF = 100µg/ml

LISTES DES FIGURES

Listes des Figures

Chapitre I - La Thérapie Photodynamique

Figure I. 1 Hématoporphyrine (Hp)

Figure I. 2 Diagramme de Jablonsky : absorption et évolution des états électroniques excités. Positions relatives des spectres d'absorption, de fluorescence (en bleu) et de phosphorescence

Figure I. 3 – Mécanisme photochimique de type I et II rencontrés lors des processus PDT

Figure I. 4 Exemples d'interaction de l'oxygène moléculaire singulet sur trois constituants cellulaires. Les réactions sont soit des oxydations (cas du cholestérol) soit des cycloadditions (cas du tryptophane et de la guanine).

Figure I. 5. Mécanisme de la nécrose : cellule normale (1), gonflement réversible de la cellule (2), gonflement irréversible de la cellule (3) éclatement de la cellule (4).

Figure I. 6. Mécanisme de l'apoptose : cellule normale (1), condensation de la chromatine (2), fragmentation de cette dernière en corps apoptotiques (3). L'élimination de ces corps par phagocytose (4).

Figure I. 7. Représentation des voies d'activation de l'apoptose

Figure I. 8. Représentation de la visudyne®

Figure I. 9. DMLA caractérisée par la formation de néovaisseaux choroïdiens non étanches localisés au niveau de la macula (source : http://www.amdcanada.com/)

Figure I. 10. L'irradiation (763 nm, 10 J/cm²) consécutive à l'injection (T = 24 h) du Tookad® (33µg/embryon) met en évidence le mode d'action de ce dernier au niveau du système vasculaire d'œuf de poules fertilisées.

Figure I. 11. Représentation des différents diffuseurs de lumière par fibres. Habituellement, la fibre utilisée est une fibre flexible en quartz de diamètre central variant de 400 µm à 600 µm.

Figure I. 12. Photographie (gauche) et coupe transversale (droite) d'un diffuseur cylindrique (ou radial).

Figure I. 13. Spectre d'absorption des 3 principaux chromophores des tissus (eau, hémoglobine et mélanine) (www.univ-lille2.fr/lasers/infogeneral/courbes.gif).

Figure I. 14. Dosimétrie explicite du traitement photodynamique

Figure I. 15. Dosimétrie implicite du traitement photodynamique.

Figure I. 16. Schéma de la cavité d'un laser

Figure I. 17. Laser à quatre niveaux – Nd^{3+}- YAG (Guesic 1964)

Figure I. 18. Colorants pompés par la seconde harmonique du Nd-YAG (532 nm, E = 360 mJ). Le DCM dans le méthanol correspond à la référence LC 6500 qui a pour λ_{max} = 640 nm, couvrant une gamme de 607 à 670 nm

Figure I. 19. Représentation de la porphyrine, de la chlorine, bactériochlorine, la numération du cycle se faisant selon le système IUPAC. Le tracé en gras mettant en évidence le système de 18 électrons π aromatiques.

Figure I. 20. Structure du chloro (protoporphyrinato)-fer(III) (Protohemin)

Figure I. 21 . Dérivé benzoporphyrinique - mono acide A (BPA-MA, Verteporfin).

Figure I. 22. Structure d'une chlorine couplée à un œstrogène naturel, l'estradiol. Ce composé issu du photohemin a été obtenu à partir d'une synthèse partielle.

Figure I. 23. 3-vinylporphyrine (b) et divinylporphyrine (c) synthétisées à partir de la phéophorbide-a méthylique ester (R_1=R_2=CH_3, R_3=H) (a). Le dérivé [A]-benzoporphyrinique (d) a été préparé à partir de la 3-vinylporphyrine (b) tandis que le dérivé [A,C]-dibenzoporphyrinique (e) a été préparé à partir de la divinylporphyrine (c).

Figure I. 24. Structure du dimère HPPH–chlorin e6

Figure I. 25. (a) Structure d'une phtalocyanine (λ ≈ 700 nm). (b) Structure de la naphthalocyaninato-Zn(II) (λ ≈780 nm)

Figure I. 26. chlorophthalocyaninato-Al(III) pouvant de degrés variables de sulfonation.

Figure I.27. Synthèse de la Protoporphyrine IX (PP IX) (dans la mitochondrie) à partir du 5-ALA présent dans le cytosol (phase liquide où baignent les organites cytoplasmiques).La flèche bleu correspondant à la régulation (inhibition) de la production du 5 ALA par le hème

Figure I. 28. Structure de l'agent photosensible visudyne®

Figure I. 29. Phototransformation en milieu aqueux de la m-THPBC (10^{-5}M) en m-THPC ainsi que de la m-THPC (10^{-5}M) en m-THPP après irradiation laser.

Figure I. 30. Phototransformation de la m-THPC (5 μg/mL) incubée dans les cellules HT29 durant 20h avant et après illumination (diode laser, λ = 652nm, 30mW/cm²).

Figure I. 31. Propositions de structures et de voies de formation de composés mono hydroxylés

Figure I. 32. Proposition de structure pour les ions issus des études par spectrométrie MALDI-TOF de l'ion parent 711,22 et 713,24.

Figure I. 33. Macrocycles tétrapyrroliques portant des unités glycosylées

Figure I. 34. Le complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique (Por-COOH-Fa)

Figure I. 35. Synthèse divergente d'un dendrimère, s'effectuant du cœur vers la périphérie, en greffant un nombre de plus en plus grand de petites molécules sur la surface multifonctionnalisée du dendrimère

Figure I. 36. Image par microscopie électronique à balayage de nanosphères incorporant du bleu de méthylène (A) particules de polyacrylique, (B) nanoparticules de silice sol-gel et (C) nanoparticules ORMOSIL (organically modified silicate). Les échelles sont respectivement de 200 nm, 2μm et 1 μm.

Figure I. 37. Coupe de cerveau de rat traitée par le biais du Photofrin® encapsulé dans une nanoparticule de polyacrylamide ($\lambda = 630$ nm).

Chapitre II - Spectrométrie de masse et spectroscopie

Figure II. 1. **Courbe d'ablation et fenêtre MALDI**

Figure II. 2. Représentation des différents types de dépôts usuels: (a) en mélange intime, (b) en couche mince et (c) en sandwich

Figure II. 3. (a)Spectres d'absorption UV-visible du Foscan® à 10-5M en milieu éthanol/eau (v:v, 1/99); (b) Spectres d'absorption UV-visible de la sonde DPBF à 10-5M en milieu éthanol/eau (v:v, 1/99).

Figure II. 4. Dépôt par immersion des monocouches cellulaires HT29 sur lamelle de verre. L'immersion partielle de la lamelle de verre met en avant la cristallisation ciblée de la matrice 2,5 DHB au niveau des amas cellulaires.

Figure II. 5. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du PEG 600 déposé sur lamelle de verre

Figure II. 6. Représentation schématique d'une source électrospray. La haute tension fait migrer les charges à l'extrémité du capillaire. Des gouttelettes chargées sont créées. Suite à leur désolvatation, elles subissent des explosions coulombiennes, se transforment en micro - gouttelettes puis en nanogouttelettes et enfin en ions en phase gazeuse. Les ions sont ensuite transférés vers l'analyseur.

Figure II. 7. Schéma et image du spray: La source est assimilée à une cellule électrolytique

Figure II. 8. Le modèle de Dole: L'ion en phase gazeuse ($[M+nH]^{n+}$) est produit suite à une ultime fission coulombienne.

Figure II. 9. Modèle d'Iribarne et Thomson: Le champ électrique à la surface de la goutte est si intense que l'ion est extrait par désorption de champ.

Figure II. **10**. Spectre de masse ESI-FT-ICR/MS de la myoglobine. (a) Chaque pic sur le spectre de masse représente un état de charge de la molécule, (b) Distribution isotopique de l'état de charge +18 de la myoglobine.

Figure II. 11. Schéma de la source d'ionisation électrospray dans la configuration de Zspray^{TM}.

Figure II. 12. – Schéma de principe du spectromètre à temps de vol linéaire.

Figure II. 13. Evolution des potentiels du porte-échantillon et de la grille de retard à l'extraction dans le temps lors d'une expérience TOF/MS avec délai d'extraction.

Figure II. 14. Photographie d'un réflecteur utilisé au sein d'un spectromètre de masse à temps de vol

Figure II. 15. Schéma de disposition du réflecteur du spectromètre à temps de vol Bruker Reflex **IV** utilisé dans le cadre de nos études.

Figure II. 16. Schéma du trajet des ions en mode PSD

Figure II. 17. Schéma du PCIS, servant à la sélection des ions d'après le manuel UltraTOF Bruker.

Figure II. 18. Principe du détecteur microcanaux UltraTOF Bruker.

Figure II. 20. Trajectoire hélicoïdale autour d'un axe parallèle à z d'une particule chargée soumise à un champ magnétique $\vec{B}$.

Figure II. 21. Mouvement d'une particule chargée au sein d'une cellule ICR. Le champ électrique impose à la particule un mouvement axial (fréquence de piégeage ν_T). Le champ magnétique génère le mouvement magnétron de fréquence ν_- ainsi que le mouvement cyclotron de fréquence ν_c.

Figure II. 22. Cellule d'analyse cylindrique équipant notre FT-ICR/MS (9,4 Tesla)

Figure II. 23. a) génération des ions, b) excitations conférant aux ions un mouvement cohérent, c) détection du signal.

Figure II. 24. Principe de la détection des ions. Les deux plaques sont connectées à un circuit RLC qui génère un courant image sous forme temporelle.

Figure II. 25. a) Transient d'une population d'ions de masses différentes, b) Spectre de masse obtenu après application de la transformée sur le transient précédent.

Figure II. 26. Nomenclature de la fragmentation peptidique

Figure II. 27. Mécanisme possible de la fragmentation des ions en type c et z par addition du radical $H^{\bullet}$ au niveau de la fonction carboxyle d'un peptide.

Figure II. 28. Mécanisme de formation des ions fragments de type b et y par IRMPD

Figure II. 29. Schéma du spectromètre MALDI-FT-ICR/MS

Figure II. 30. Représentation de l'effet miroir : le renvoi des ions s'effectue lors du passage d'un milieu de champ magnétique faible B° (guide d'ions) vers un milieu de champ magnétique fort B' (cellule d'analyse FT-ICR).

Figure II. 31. Photographie d'un guide d'ions de type hexapôle monté sur notre spectromètre de masse FT-ICR/MS

Figure II. 32. Représentation du microscope à épifluorescence Olympus AX 70 (Olympus America inc.)

Figure II. 33. Représentation du mode fluorescence du microscope à épifluorescence. (i) sélection de λ_{exc}, (ii) réflexion et filtrage ($\lambda > \lambda_{exc.}$), (iii) transmission ($\lambda > \lambda_{exc.}$)

Figure II. 34. Montage expérimenta concernant l'illumination laser des solutions de Foscan® et/ou de DPBF (éthanol/eau, 1/99, v/v)

Figure II. 35. Etapes de la culture cellulaire conduisant à l'illumination laser des monocouches cellulaires de HT29 et MCF7.

Figure II. 36. Schéma du montage permettant l'illumination de surfaces planes tel que les monocouches cellulaires

Chapitre III - L'oxygène moléculaire singulet

Figure III. 1. Configuration électronique des orbitales de l'oxygène moléculaire à l'état fondamental ($^3\Sigma_g^-$).

Figure III. 2. Représentation simplifiée de l'occupation électronique des orbitales $1\pi_g$ dans l'état fondamental ($^3\Sigma_g^-$) et dans les deux premiers états excités ($^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$) de l'oxygène moléculaire. Les électrons se situent sur la plus haute orbitale moléculaire occupée (Highest Occupied Molecular Orbital, HOMO)

Figure III. 3. Transitions électroniques (émission) entre les états excités singulets et l'état fondamental triplet de l'oxygène moléculaire. Les niveaux vibrationnels pour chaque état sont égaux à 0.

Figure III. 4. Anthracène destiné à la génération (I) et au piégeage d'oxygène moléculaire singulet (II)

Figure III. 5. Génération d'oxygène moléculaire singulet par décomposition thermique d'endoperoxyde

Figure III. 6. Structure du tétracène

Figure III. 7. Représentation moléculaire du processus de cycloaddition [4+2] de type Diels-Alder entre le 1,3-diphénylisobenzofurane et l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ effectué à l'aide du logiciel Mopac MS.

Figure III. 8. Formation d'ortho-dibenzoylbenzène(o-BB) à partir de 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) ayant réagit avec de l'oxygène moléculaire singulet.

Figure III. 9. Génération de $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) à partir d'un fullerène, la réaction entre 2,2,6,6-tétraméthyl-4-pipéridinole (TMP-OH) et $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) conduit à la formation d'un composé radicalaire le 2,2,6,6-4-pipéridone-N-oxyl (TEMPOL) détectable en RPE.

Figure III. 10. Spectre RPE, l'évolution du signal du TEMPOL (1 mM, dans D_2O) en fonction du temps de d'illumination du dérivée de fullerène C60 (axe des ordonnées). Le champ magnétique (axe des abscisses)est exprimé en gauss [G]

Figure III. 11. Méthode microcalorimétrique permettant de visualiser la désactivation non radiative de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$). Cette désactivation thermique (milieu aqueux) engendre une modification de l'indice de réflexion dans le milieu adjacent (organique) provoquant la déflexion du faisceau laser.

Figure III. 12. Structure des sonde spécifiques à l'oxygène moléculaire singulet : (a) l'azide de sodium (NaN_3,) (b) le 1.4-diazabicyclo[2.2.2]octane (DABCO), (c) le 1,3-diphényliso-benzofurane (DPBF) et (d) le β–carotène.

Figure III. 13. Spectre UV-visible du DPBF (en rouge) et de l'o-BB (en noir) en milieu éthanol/eau, 1/99, v/v

Figure III. 14. Spectre de masse LD-TOF/MS du DPBF solubilisé dans éthanol/eau (1/99, v/v) (Energie du laser = 2,5 μJ)

Figure III. 15. Spectres MALDI-TOF/MS de l'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (1), de l'acide sinapinique (2) et de l'acide 2,5-hydroxybenzoique (3). (1 M dans éthanol/eau, 1/1, v/v) (λ = 37nm)

Figure III. 16. Formation de l'ortho-dibenzoylbenzène à partir du 1,3 Diphényliso benzofurane ayant réagit avec de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$).

Figure III. 17. Spectre de masse MALDI-TOF/MS de la sonde DPBF (10^{-5}M). Matrice 2,5 DHB (10^{-1} M, éthanol/eau, 1/1, v/v) * pics de la matrice 2,5DHB.

Figure III. 18. Spectre de masse de l'o-BB (10^{-5}M). Matrice 2,5 DHB (10^{-1} M, éthanol/eau, 1/1, v/v) * pics de la matrice 2,5DHB.

Figure III. 19. – Photographies de dépôts (ø = 2 mm) en mélange intime de l'analyte (m-THPC /DPBF/o-BB; ETOH/eau, 1/99) et de la matrice 2,5 DHB solubilisée dans (a) eau/acétonitrile (30/70) (10^{-1} M), (b) eau/acétonitrile (80/20) (10^{-1} M), (c) eau/acétonitrile (30/70) (10^{-2} M)

Figure III. 20. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange DPBF, o-BB et m-THPC (10^{-5} M, éthanol/eau, 1/99). 2,5 DHB (10^{-2} M, eau/acétonitrile, 30/70).* pics de masse de la matrice 2,5DHB.

Figure III. 21. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange (DPBF, o-BB, m-THPC; 1:1:1) en solution éthanol/eau (1/99) en mélange intime avec de la 2,5 DHB à 10^{-2}M (eau/acétonitrile, 30/70). Apparition simultanée des ions relatifs au DPBF et à l'o-BB.* pics de matrice 2,5DHB.

Figure III. 22. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange (DPBF, o-BB, m-THPC; 1:1:1) en solution éthanol/eau (1/99) en mélange intime avec de la 2,5 DHB à 10^{-2}M (eau/acétonitrile, 30/70).

Figure III. 23 Spectre UV-visible de l'évolution d'une solution de m-THPC (10^{-5} M) + DPBF (10^{-5} M) en milieu éthanol/eau (1/99).

Figure III. 24. Spectre de masse MALDI-TOF/MS avant l'irradiation laser à λ = 655 nm (E = 30 mJ) du mélange : m-THPC (10^{-5} M) + DPBF (10^{-5} M) en milieu éthanol/eau (1/99). * pics de matrice 2,5DHB.

Figure III. 25. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange initial m-THPC (10^{-5} M) + DPBF (10^{-5} M) en milieu éthanol/eau (1/99), après irradiation laser à λ = 655 nm (E = 30 mJ, t = 120 min.)

Figure III. 26. Préparation des cultures cellulaires dans les flacons de culture (slideflask, NUNC) pour l'analyse par microscopie à épifluorescence.

Figure III. 27. Flacons de culture (slideflask, NUNC) disposant d'une partie supérieure (a) et d'un support de croissance (b) amovibles. Le support de croissance est semblable à une lamelle et permet l'observation de monocouches cellulaires par microscopie à épifluorescence.

Figure III. 28. Spectre de fluorescence, plages d'émission du Foscan® (1) et du DPBF (2). Attribution des blocs (jeu de filtres) pour chaque composé.

Figure III. 29. Images de microscopie à épifluorescence. Les Cellules MCF7 et HT29 incubées (t = 5 heures) avec un mélange m-THPC (5.10^{-6} M) / DPBF (10^{-4} M) (RPMI/SVF/ ETOH, 97/2/1). Observation des cellules MCF7 (a) et HT29 (a') par transmission (Lumière blanche), observation de la fluorescence de la m-THPC des cellules MCF7 (b) et HT29 (b') et observation de la fluorescence du DPBF des cellules MCF7 (c) et HT29 (c'). Les ellipses vertes correspondent à l'emplacement des cellules.

Figure III. 30. Structure de la digitonine ($C_{56}H_{92}O_{29}$), détergent non ionique permettant la perméabilisation des membranes cellulaires.

Figure III. 31. Protocole pour l'étude de l'internalisation de la sonde DPBF au sein des cellules HT 29

Figure III. 32. Spectres de masse MALDI-TOF/MS de la solution initiale constituée de la sonde DPBF et des solutions de lavage lors de l'étude des cellules HT29 non traitée à la digitonine

Figure III. 33. Cellules traitée à la digitonine. Spectres de masse MALDI-TOF/MS de la solution initiale d'incubation et des solutions de lavages avant et après le traitement par digitonine.

Figure III. 34. Métabolisation du MTT (couleur jaune) en formazan (couleur bleue) par les mitochondries des cellules vivantes actives.

Figure III. 35. Protocole de mise en évidence de la phototoxicité par le test MTT (3-[4,5-diméthylthiazol-2-yl]-2,5-diphényltétrazolium).

Figure III. 36. Test MTT effectué sur des cellules MCF7 incubées avant et après irradiation laser ($\lambda = 655$ nm).

Figure III. 37. Analyses par MALDI-TOF/MS de cellules intactes HT29 en présence de m-THPC et DPBF avant illumination laser. (L'astérisque correspond à un adduit de la matrice 2,5 DHB (ACN/H2O, 7/3, v/v; 0,1 TFA) déposé en mode coulé)

Figure III. 38. Analyses par MALDI-TOF/MS de cellules intactes en présence de m-THPC et DPBF après illumination laser (λ=652 nm, F = 10 J, temps illumination 40 min) L'astérisque correspond à l'adduit $[Ma+K]^+$ de matrice 2,5 DHB (ACN/H2O, 7/3, v/v; 0,1 TFA) déposé en mode coulé.

Chapitre IV - Etude par spectrométrie de masse de l'empreinte protéique dans le cadre de la thérapie photodynamique

Figure IV. 1. Spectre de masse MALDI-TOF/MS de l'ubiquitine ($2{,}3.10^{-4}$M), de l'insuline bovine ($3{,}5.10^{-5}$M) et du cytochrome C de bœuf ($1{,}4.10^{-4}$M). (Dépôt en mélange intime avec comme matrice l'acide sinapinique CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v)

Figure IV. 2. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange binaire ubiquitine ($2{,}3.10^{-4}$M) / cytochrome C de bœuf ($4{,}1.10^{-5}$M) et insuline bovine ($1{,}8.10^{-5}$M) /cytochrome C de bœuf ($4{,}1.10^{-5}$M). (Dépôts en mélange intime avec comme matrice l'acide sinapinique CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v)

Figure IV. 3. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange ubiquitine/insuline bovine/cytochrome C de bœuf (7,0.10^{-6}M / 2,3.10^{-4}M / 1,6.10^{-5}M). (Dépôt en mélange intime comme matrice l'acide sinapinique CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v)

Figure IV. 4. Spectre de masse MALDI-TOF/MS du mélange insuline bovine/ubiquitine/cytochrome C de bœuf (7,0.10^{-7}M / 2,3.10^{-5}M / 1,6.10^{-6}M) déposé sur une monocouche cellulaire HT29. (le mélange de protéines et la matrice avec de l'acide sinapinique(CH_3CN/H_2O, 3/7, v/v) étant déposés en mélange intime)

Figure IV. 5. Distribution des protéines au sein de cellules intactes en présence de m-THPC et DPBF avant et après illumination laser (λ=652 nm, 10 J/cm², temps illumination 40 min)

Figure IV. 6. Analyse par MALDITOF/MS de cellules intactes HT29 en présence de m-THPC ou d'un mélange m-THPC/DPBF. (λ=652 nm, 10 J/cm², temps illumination 40 min)

Figure IV. 7. Analyse par MALDITOF/MS : distribution des protéines au sein de cellules intactes MCF7 en présence de m-THPC ou d'un mélange m-THPC/DPBF. (λ=652 nm, 10 J/cm², temps illumination 40 min)

Figure IV. 8. Analyse par MALDI-TOF/MS d'un lysat cellulaire HT29 et de cellules intactes HT29

Figure IV. 9. Stratégie Bottom-Up et Top-Down dans le domaine de la protéomique

Figure IV. 10. Spectre de masse ESI-FT-ICR/MS de la mélittine (3,5.10^{-12} M, ACN/H_2O, 50/50, 0,1% TFA).

Figure IV. 11. Spectre de masseESI-FT-ICR/MS de la melittine après dissociation par capture d'électrons (ECD) de l'ion à 712,1961 Da.

Figure IV. 12. Fragments c et z de la mélittine obtenue à partir de la dissociation ECD

Figure IV. 13. Spectre de masse ESI-FT-ICR/MS de la mélittine après dissociation IRMPD de l'ion à 712,961 Da.

Figure IV. 14. Fragments b et y de la mélittine obtenue à partir de la dissociation IRMPD

Figure IV. 15. La complémentarité des méthodes de dissociation permet de visualiser les fragments ECD de type c et z (bleu) et les fragments IRMPD de type b et y (rouge) de la mélittine.

Figure IV. 16. a) forme basique de l'acide aminé, b) forme zwitterionique de l'acide aminé (majoritaire en solution).

Figure IV. 17. Diagramme de répartition d'un acide aminé en solution selon la charge portée.

Figure IV. 18.- schéma du dispositif de réhydratation de l'IPG strip

Figure IV. 19. - Représentation de la SDS-PAGE, migration des protéines dans le gel d'acrylamide. (Dimension : largeur 17cm, hauteur 20cm)

Figure IV. 20. Image scannée d'un gel 2D SDS-PAGE de cellules HT29. Le "spot" cerclé de rouge est recueilli afin de subir une digestion enzymatique.

Figure IV. 21. Feuilles d'entrée pour le choix de la taxonomie au niveau du moteur de recherche Mascot.

Figure IV. 22. Exemple de modification post traductionnel appliquée à l'acide aminé tyrosine, cette modification entraîne une variation de masse de 79.9663 Da

Figure IV. 23. Diagramme représentatif des indices de confiances (Mowse score) des séquences retenues par le moteur de recherche concernant les études menées sur la lignée cellulaire HT29. L'axe des ordonnées correspond au nombre de séquences retenues, l'axe des abscisse correspond à l'indice de confiance de chaque cas retenu et la zone rayée est représentative des résultats non significatifs.

Figure IV. 24. La couverture de séquence (47%), les acides aminés en rouge correspondant aux peptides identifiés.

Figure IV. 25. Séquences peptidiques des pics de masses retenues pour l'identification

Figure IV. 26. Distribution des écarts (ppm) pour chaque peptide retenus.

Figure IV. 27. Gel Bidimensionnel SDS-PAGE de cellules HT29, le spot considéré, pour l'analyse par spectrométrie de masse, se défini par un pI $\approx$6 et une masse de 57kDa environ.

Figure IV. 28. Spectre de masse MALDI-FT-ICR/MS (9,4 Tesla) en calibration externe

Figure IV. 29. Gels différentiels de nos cellules HT29 avec et sans incubation au Foscan® ainsi qu'avec et sans illumination laser. Les zones d'intérêts pour la différentiation sont délimitées par le rectangle rouge.

Figure IV. 30. Quartiers des gels différentiels mettant en avant des différences quant à la présence ou l'absence de certaines protéines liées soit à l'illumination laser (cercles bleus) soit au traitement PDT (cercles rouges).

Figure IV. 31. Visualisation 3D par le logiciel Image Master 2D Platinum des quartiers de gels différentiels relatifs à la protéine sensible à l'illumination laser.

Figure IV. 32. Visualisation 3D par le logiciel Image Master 2D Platinum des quartiers de gels différentiels relatifs à la protéine sensible à l'illumination laser.

Figure IV. 33. Assignation des identités des spots analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF/MS et MALDI-FT-ICR/MS

Figure IV. 34. Réactions catalysées par une protéine disulfide isomérase.)

LISTES DES TABLEAUX

Chapitre IV - Etude par spectrométrie de masse de l'empreinte protéique dans le cadre de la thérapie photodynamique

Tableau IV. 1. Masses des protéines détectées lors des analyses par MALDI-TOF/MS d'une monocouche cellulaire HT29 après calibration interne du spectre.

Tableau IV. 2. Tableau récapitulatifs des fragments obtenus par dissociation par capture d'électrons (ECD) lors de l'analyse de la mélittine par ESI-FT-ICR/MS.

Tableau IV. 3. Fragments b de la mélittine obtenu à la suite la dissociation par IRMPD.

Tableau IV. 4. Fragments y de la mélittine obtenu à la suite la dissociation par IRMPD.

Tableau IV. 5. Voltages appliqués à l'IPG strip lors de la focalisation

Tableau IV. 6. Composition des solutions d'acrylamide de 10 et de 20%

Tableau IV. 7. Tableau récapitulatif des caractéristiques de protéases les plus fréquemment utilisées.)

Tableau IV. 8. Exemple de certaines modifications post-traductionnelles de protéines pouvant aussi bien être fixes que variables.

Tableau IV. 9. Identification d'une protéine issue de cellules HT29 par spectrométrie de masse MALDI-TOF-TOF/MS (LSMBO, Strasbourg) et par MALDI-FT-ICR/MS (LSMCL, Metz)

Tableau IV. 10. Masses des ions protonés issus de l'analyse MALDI-FT-ICR/MS du mélange peptidique d'angiotensine II, P14R et ACTH 18-39

Tableau IV. 11. Données issues du moteur de recherche Mascot en ce qui concerne l'identification de la protéine PDAI3 après analyse par MALDI-TOF-TOF/MS et par MALDI-FT-ICR/MS

Tableau IV. 12. Données issues du moteur de recherche Mascot relatives à l'identification de la protéine PDAI3 après analyse par MALDI-TOF-TOF/MS et par MALDI-FT-ICR/MS

Tableau IV. 13. Tableau des intensités des protéines "sensibles" à l'illumination laser.

Tableau IV. 14. Tableau des intensités des protéines "sensibles" au traitement PDT.

Tableau IV. 15. Identification des protéines après sélection des spots d'intérêts des gels G186, G187, G188 et G189

Listes des Tableaux

Chapitre I - La Thérapie Photodynamique

Tableau I. 1. Tableau regroupant les différentes familles de lasers ainsi que leurs caractéristiques. Les colorants utilisés peuvent être de la rhodamine B, rhodamine 101 ou de la sulphorhodamine 640

Tableau I. 2. Tableau regroupant les différents types de lampes utilisées en PDT.

Chapitre II - Spectrométrie de masse et spectroscopie

Tableau II. 1. Exemple de fréquences cyclotroniques ν_c de quatre ions sous à un champ magnétique de 9,4 Tesla

Tableau II. 2. Paramètres d'acquisition du spectrophotomètre UV-Visible (Lambda 14 Perkin Elmer).

Tableau II. 3. Caractéristiques des blocs disponibles sur le microscope à épifluorescence Olympus AX 70 (Olympus America inc.)

Tableau II. 4. Protocoles d'illumination laser des monocouches cellulaires HT29et MCF7

Chapitre III - L'oxygène moléculaire singulet

Tableau III. 1. Durée de vie de l'oxygène moléculaire singulet $^1O_2$ ($^1\Delta_g$) selon le solvant

Tableau III. 2. Tableau récapitulatif des valeurs des durées de vie expérimentales et calculées de l'oxygène moléculaire singulet ($^1\Delta_g$), tableau extrait des travaux de M.A.J. Rodgers)

ARTICLES

Available online at www.sciencedirect.com
ScienceDirect
Bioorganic Chemistry 35 (2007) 205–220
BIOORGANIC CHEMISTRY
www.elsevier.com/locate/bioorg

Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity

Céline Frochot [a], Benoît Di Stasio [a,b], Régis Vanderesse [c], Marie-Josée Belgy [a], Marc Dodeller [d], François Guillemin [b], Marie-Laure Viriot [a], Muriel Barberi-Heyob [b,*]

[a] *DCPR, UMR 7630 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, Nancy Université, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France*
[b] *Centre Alexis Vautrin, CRAN, UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Nancy Université, Av. de Bourgogne, Brabois, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France*
[c] *LCPM, UMR 7568 CNRS-INPL, Groupe ENSIC, Nancy Université, 1 rue Grandville, 54000 Nancy, France*
[d] *LSMCL, Université Paul Verlaine-Metz, 1 Boulevard Arago, 57078 Metz Technopole 2000 cedex 03, France*

Received 14 September 2006
Available online 9 December 2006

Abstract

Destruction of the neovasculature is essential for tumor eradication by photodynamic therapy. Since the over-expression of integrins is correlated with tumor angiogenesis, we conjugated a photosensitizer (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin or porphyrin) to the $\alpha_v\beta_3$ integrin specific peptide RGD (H-Arg-Gly-Asp-OH) motif as a common sequence. We reported an efficient solid-phase synthesis of a new family of peptidic photosensitizers with linear or cyclic[RGDfK] RGD motif and compared conjugates *in vitro* selectivity and photodynamic activity. The conjugates were characterized by ^{1}H NMR, MALDI, UV–visible spectroscopy and singlet oxygen formation was performed. Chlorins containing linear and constrained RGD motif were incorporated up to 98- and 80-fold more, respectively, than the unconjugated photosensitizer over a 24-h exposure in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) over-expressing $\alpha_v\beta_3$ integrin. Peptidic moiety also led to a non-specific increased cellular uptake by murine mammary carcinoma cells (EMT-6), lacking RGD binding

* Corresponding author. Fax: +33 3 83 44 60 71.
E-mail address: m.barberi@nancy.fnclcc.fr (M. Barberi-Heyob).

0045-2068/$ - see front matter © 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.bioorg.2006.11.005

receptors. Survival measurements demonstrated that HUVEC were greatly sensitive to conjugates-mediated photodynamic therapy.
© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Chlorin; Porphyrin; RGD; Solid-phase synthesis; Singlet oxygen quantum yield; HUVEC; EMT-6; $\alpha_v\beta_3$ integrin

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a promising treatment for a variety of oncological, cardiovascular, dermatological, and ophthalmic diseases [1]. PDT is based on the use of photosensitizers, which are preferentially taken up and/or retained by diseased tissues. It involves a photosensitizer, light, and molecular oxygen, whose combined action results in the formation of singlet oxygen, which is thought to be the main mediator of cellular death induced by PDT [2]. Normal cells, however, are also able to accumulate photosensitizers and to be damaged by them, so that prolonged skin photosensitization, light-sensitivity of the eyes and other side effects have proved to be severe limitations of PDT [3]. As a result, more selective photosensitizers, named third generation photosensitizers are desired. Until now, most of the efforts in the development of tumor targeting photosensitizers have focused on the targeting of markers over-expressed by tumor cells themselves [4]. However, PDT effects are mediated not only through direct killing of tumor cells but also through indirect effects, involving both initiation of an immune response against tumor cells and destruction of the neovasculature [5]. The latter effect may indirectly lead to tumor destruction, following lack of nutrients and oxygen. This vascular effect is thought to play a major part in the eradication of some vascularized tumors by PDT [6]. The ideal drug delivery system should enable the selective accumulation of the photosensitizer within tumoral tissue and neovasculature. The carrier must also be able to incorporate the photosensitizer without loss or alteration of its activity. In view of repetitive dosing schedules, the system must also be biodegradable and have little or no immunogenicity [7]. To this end, we have devised a synthetic route to porphyrin derivatives designed for targeting tumors and more specifically neovascularization that nourish cancer cells. Endothelial cells are crucial in angiogenesis, the process of new blood vessel formation associated with tumor growth and metastasis [8]. $\alpha_v\beta_3$ integrin, a heterodimeric transmembrane glycoprotein receptor, is over-expressed in actively proliferating endothelial cells, in and around tumor tissues [9]. Integrins are involved in cell–cell and cell–matrix interactions and in inside-out and outside-in signal transduction [10]. The $\alpha_v\beta_3$ integrin, known as the vitronectin receptor, is selectively over-expressed on the surface of endothelial cells of growing blood vessels and has been identified as a target in pathologies in which angiogenesis is stimulated [11]. In malignant tumors, $\alpha_v\beta_3$ is over-expressed in neocapillaries and in certain cases also on tumor cells. This led many groups to design ligands that could be used for drug delivery and molecular cancer imaging [12]. Among the 25 $\alpha\beta$ heterodimers, half of them bind to the common RGD motif, but RGD containing substrates have been reported to be selective for a given

integrin. The specificity of the $\alpha_v\beta_3$-RGD recognition is attributed to the sequences flanking the RGD triad, the auxiliary binding motifs in the ligand, and to a large extent, the conformational presentation of the triad [13,14]. Extensive ligand-based drug studies and rational screening of cyclic peptide libraries with constrained backbone conformations led to the discovery of the highly active and selective first-generation peptide cyclo[RGD] [13,14]. The synthetic peptide showed a higher affinity for $\alpha_v\beta_3$ than for $\alpha_v\beta_5$ or $\alpha IIb\beta_3$. Its *N*-alkylated successor cyclo[RGDf(NMe)V] has entered clinical phase II studies as an angiogenesis inhibitor [15]. In this context, this integrin may therefore represent a promising target for the delivery of drugs such as photosensitizers. We selected the well known cyclo[RGDfK] ligand, a gold-standard molecule for imaging and therapy of tumors, and used the lysine side chain to couple 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin. Porphyrins or chlorins can be easily modified through a carboxyl group, which makes the compound suitable for conjugation as we recently described [16–18]. This paper reported the efficient solid-phase synthesis of a new family of chlorin (**1**) and porphyrin (**1b**) with linear RGD triad or cyclic[RGDfK] RGD motif (**2**). Conjugates selectivity and photodynamic activity were compared between $\alpha_v\beta_3$-positive HUVEC and $\alpha_v\beta_3$-negative EMT-6 cells.

2. Materials and methods

2.1. Reagents and materials

5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin (TPC) and tetraphenylporphyrin (TPP) were purchased from Frontier Scientific (Logan, Utah). The Fmoc-Asp(OtBu)-Wang and H-Gly-2-chlorotrityl resins and 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc)-amino acids were from Senn Chemicals International (Dielsdorf, Switzerland). Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck silica gel 60 F254 plates (Merck Chimie S.A.S., Fontenay Sous Bois, France) and developed with the appropriate solvents. The TLC spots were visualized either by UV light or by heating plates sprayed with a solution of phosphomolybdic acid (5% ethanolic solution). Chromatography column was carried out on Merck silica gel (230–400 mesh).

Assembly of the peptide chains was carried out on a multichannel peptide synthesizer, according to a classical Fmoc/*t*Bu solid-phase methodology using the *in situ* neutralization protocol [19]. For the attachment of each amino acid, double couplings (20 and 40 min, respectively) were performed using a threefold excess of *N*-Fmoc-amino acid and activation reagents 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate (TBTU) (3 eq.), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (3 eq.) and *N*,*N*-diisopropylethylamine (DIEA) (9 eq.) in dimethylformamide (DMF). Monitoring of the reaction was performed by the 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid test. For the attachment of the photosensitizer, only one coupling step using 2-fold excess was applied. During the photosensitizer coupling stage and all the next steps, light exposure was minimized by sealing the reaction vessel in foil to limit the occurrence of unwanted side reactions. Before cleavage, the peptide-resin was washed extensively with dichloromethane and dried *in vacuo*.

^{1}H NMR spectra were recorded on BRUKER AVANCE spectrometer at 300 MHz. Mass spectra analyses (MALDI-TOF) were carried out on Analyses were

performed on a Bruker Reflex IV time-of-flight mass spectrometer (Bruker-Daltonic, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT 384 probe ion source, as described previously [17]. The system uses a pulsed nitrogen laser (337 nm, model VSL-337ND, Laser Science Inc., Boston, MA) with energy of 400 μJ/pulse. The analysis was performed in the positive mode with an acceleration voltage of 20 kV and a reflector voltage of 23 kV. The detector signals were amplified and transferred to the XACQ program on a SUN work station (Sun Microsystems Inc. Palo Alto, CA). Spectra were processed with the XMass 5.1 program (Bruker Daltonics). External calibration of MALDI mass spectra was carried out using sodic and potassic distribution with a mixture of PEG 600 and PEG 1000.

*2.2. Synthesis of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin-RGD (**1**) and 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin-RGD (**1b**)*

The synthesis was performed using the preloaded Fmoc-Asp(OtBu)-Wang (capacity, 0.79 mmol/g) on a 0.15 g scale. The side chains of arginine and aspartic acid were, respectively, protected by Pbf (2,2,5,7,8-pentamethylchroma-6-sulfonyl) group, and *tertio*-butyl (*t*-Bu). The successive coupling of Fmoc-Gly-OH (106 mg) and Fmoc-Arg(Pbf)-OH (230 mg) in the presence of TBTU (114 mg), BtOH (54 mg), and 0.18 mL of DIEA in 5 mL of DMF were achieved. After the final removal of the Fmoc group, the peptide-resin was washed with CH_2Cl_2 (6× 5 mL) and then dried *in vacuo* overnight. A standard cleavage with a mixture of 0.75 g of crystalline phenol, 0.25 mL of 1,2-ethanedithiol, 0.5 mL of thioanisole, 0.5 mL of deionized H_2O, and 10 mL of trifluoroacetic acid (TFA) for 1.5 h afforded the crude peptide, which was lyophilized. The compounds were purified by RP-HPLC on a C_{18} semi-preparative column (250 × 10 mm I.D., Apollo, Alltech, Lokeren, Belgium) using a 0.1% (v/v) TFA-water/acetonitrile gradient, monitored by both absorbance at 415 nm on a SPD-10A UV–visible detector (Shimadzu, France) and fluorescence on a RF 10AXL fluorescence detector (Shimadzu). After removal of the solvents, the purified compounds were lyophilized and analyzed by ^{1}H NMR and mass spectroscopy.

*2.2.1. 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin-RGD (**1**)*

^{1}H NMR (DMSO) δ: −1.58, −1.52 (s, 2H, NH-pyrrole), 1.50 (m, 2H, γArg), 2.30 (m, 2H, βArg), 2.18, 2.22 (m, 2H, βAsp), 3.12 (m, 2H, δArg), 4.00 (s, 1H, αGly), 4.10 (s, 1H, αAsp), 4.14 (s, 4H, CH_2-chlorin), 4.32 (s, 1H, αArg), 7.23 (s, 1H, NHε-Arg), 7.98 (s, 1H, NH-Arg), 8.20 (s, 1H, NH-Gly), 7.23–8.57 (m, 1H, ArH, pyrrole) MS (MALDI-TOFMS) *m/z*: calculated 989.41; found: 989.34.

*2.2.2. 5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin-RGD (**1b**)*

^{1}H NMR (DMSO) δ: −2.91 (s, 2H, NH-pyrrole), 1.58 (m, 2H, γArg), 2.30 (m, 2H, βArg), 2.22, 2.24 (m, 2H, βAsp), 3.12 (m, 2H, δArg), 4.02 (s, 2H, αGly), 4.12 (s, 1H, αAsp), 4.28 (s, 1H, αArg), 7.22 (s, 1H, NHε-Arg), 8.05 (s, 1H, NH-Arg), 8.25 (s, 1H, NH-Gly), 7.23–8.83 (m, 1H, ArH, pyrrole) MS (MALDI-TOFMS) *m/z*: calculated 987.39; found: 988.78.

2.3. Synthesis of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin-cyclo[RGDfK] (2)

2.3.1. Synthesis of 5,10,15,tri(p-tolyl)-20-(p-carboxyphenyl)chlorin succinidyl ester

In the dark under a nitrogen atmosphere, *N*-hydroxysuccinimide (26.1 mg, 0.23 mmol) and dicyclohexylcarbodiimide (DCC)[1] (46.8 mg, 0.23 mmol) were added to a solution of 5,10,15-tri(*p*-tolyl)-20-(*p*-carboxyphenyl)chlorin (150 mg, 0.23 mmol) in CH_2Cl_2 (6 mL). The mixture was stirred 4 h at room temperature. The solvent was evaporated and the crude material was purified by column chromatography using $EtOH/CH_2Cl_2$: 4/96 (v/v) as the eluent. The fractions were tested by TLC and the pure compound was isolated as a purple solid (112 mg, 65%).

^1H NMR (DMSO): δ −1.50, −1.65 (s, 2H, NH-pyrrole), 2.99 (s, 4H, CH_2), 4.17 (s, 4H, CH_2-chlorin), 7.26–8.85 (m, 25H, ArH, pyrrole).

2.3.2. Synthesis of 2-(9H-fluoren-9-ylmethoxycarbonylamino)-6-[5,10,15,tri(p-tolyl)-20-(p- carboxyamino)-chlorin]-hexanoic acid

In the dark under a nitrogen atmosphere, to a solution of 81 mg of Fmoc-Lys-OH, HCl (0.20 mmol) in a minimum of DMF were added *N*-hydroxysuccinimide activated chlorin (152 mg, 0.20 mmol) and triethylamine (0.20 mmol, 28.3 μL) in 10 mL CH_2Cl_2. After been stirred at ambient temperature for 24 h, the solvent was evaporated and the crude material was purified by column chromatography using $EtOH/CH_2Cl_2$: 5/95 (v/v) as the eluent. The fractions were tested by TLC and the pure compound was isolated as a purple solid (152 mg, 75%).

^1H NMR (DMSO): δ −1.58, −1.52 (s, 2H, NH-pyrrole), 1.57 (m, 2H, $CH_2\gamma$), 1.75 (m, 2H, $CH_2\delta$), 1.85, 2.00 (m, 2H, $CH_2\beta$), 3,57 (m, 1H, CHε), 4.11 (s, 4H, CH_2-chlorin), 4.14 (m, 1H, CH-Fmoc), 4.40 (m, 1H, Chα), 4.36 (s, 2H, CH_2-Fmoc), 5.76 (m, 1H, NH), 6.70 (m, 1H, NHε), 7.18–8.82 (m, 33H, ArH, pyrrole, Fmoc).

2.3.3. Synthesis of 2

The synthesis was performed using the preloaded H-Gly-2-chlorotrityl PS resin (capacity, 0.85 mmol/g) on a 0.115 g scale. The side chains of arginine and aspartic acid were, respectively, protected by Pbf and *t*-Bu groups. The successive coupling of Fmoc-Arg(Pbf)-OH (190 mg), Fmoc-Lys(CO-Chl1)-OH (152 mg), Fmoc-(*D*)Phe-OH (114 mg) and Fmoc-Asp(OtBu)-OH (121 mg) in the presence of TBTU (94 mg), BtOH (45 mg), and 0.15 mL of DIEA were achieved. After the final removal of the Fmoc group, the peptide-resin was washed with CH_2Cl_2 (6× 5 mL) and then dried *in vacuo* overnight. The linear Chl1-CO-

[1] *Abbreviations used:* DCC, dicyclohexylcarbodiimide; DIPCDI, diisopropylcarbodiimide; DIEA, *N*,*N*-diisopropylethylamine; DMAP, 4-dimethylaminopyridine; DMF, dimethylformamide; DMSO, dimethylsulfoxide; DPPA, diphenylphosphoryl azide; EMT-6, murine mammary carcinoma; FBS, fetal bovine serum; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole; HPLC, high-performance liquid chromatography; HOSu, *N*-hydroxysuccinimide; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionisation time-of-flight; LD_{50}, light doses yielding 50% growth inhibition; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; $NaHCO_3$, sodium hydrogenocarbonate; NMM, *N*-methylmorpholine; Pbf, 2,2,5,7,8-pentamethylchroma-6-sulfonyl; PBS, phosphate-buffered saline. PDT, photodynamic therapy; PyBOP, benzotriazole-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphonium hexafluorophosphate; TBTU, 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate; *t*-Bu, *tertio*-butyl; T3P, 1-propane-phosphonic acid cyclic anhydride; TFA, trifluoroacetic acid; TFE, 2,2,2 trifluoroethane; TLC, thin-layer chromatography; TPC, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin; TPP, tetraphenylporphyrin.

RGDfK peptide was cleaved from the resin without affecting other protecting groups with 10 mL of a mixture of acetic acid, 2,2,2 trifluoroethane (TFE) and CH_2Cl_2 (1/1/3) for 1 h at room temperature. The resin was washed with three times with acetic acid and then lyophilized. The head-to-tail cyclization was performed by slowly adding a solution of the linear peptide acetate salt in 20 mL of CH_2Cl_2 to a solution of 50% 1-propane-phosphonic acid cyclic anhydride (T3P) in EtOAc (3 mL), triethylamine (3 mL), and DMAP (10 mg) in 400 mL of CH_2Cl_2. After stirring overnight, the reaction mixture was concentrated and purified by chromatography (MeOH/AcOEt, 10/90) to afford 115 mg of the chlorin coupled to the protected cyclic peptide. A standard cleavage with a mixture of 0.75 g of crystalline phenol, 0.25 mL of 1,2-ethanedithiol, 0.5 mL of thioanisole, 0.5 mL of deionized H_2O and 10 mL of trifluoroacetic acid (TFA) for 1.5 h afforded the crude peptide, which was lyophilized. The compound was purified by RP-HPLC on a C_{18} semi-preparative column (250 × 10 mm I.D., Apollo, Alltech) using a 0.1% (v/v) TFA-water/acetonitrile gradient, monitored by both absorbance at 415 nm on a SPD-10A UV–visible detector (Shimadzu) and fluorescence on a RF 10AXL fluorescence detector (Shimadzu).

After removal of the solvents, **2** was lyophilized and kept in the dark in aliquots at −20 °C.

Chemical identities were established by ^{1}H NMR and matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight MALDI-TOF mass spectrometry, as described previously [16].

^{1}H NMR (DMSO) δ: −1.58, −1.53 (s, 2H, NH-pyrrole), 1.20 (m, 2H, δLys), 1.42 (m, 2H, γArg), 1.53, 1.72 (m, 2H, βArg), 1.55 (m, 2H, δLys), 1.80 (m, 2H, βLys), 2.40, 2.81 (m, 2H, β(D)Phe), 2.84, 2.94 (m, 2H, βAsp), 3.12 (m, 2H, δArg), 4.01 (s, 1H, αLys), 4.08 (s, 2H, Gly), 4.15 (s, 1H, αArg), 4.52 (s, 1H, αAsp), 4.70 (s, 1H, α(D)Phe), 4.13 (s, 4H, CH_2-chlorin), 7.48 (s, 1H, NHε-Arg), 7.65 (s, 1H, NH-Arg), 8.05 (s, 1H, NH-Asp), 8.08 (s, 1H, (D)Phe-NH), 8.12 (s, 1H, NH-Lys), 8.43 (s, 1H, NH-Gly), 7.19–8.84 (m, 30H, ArH, pyrrole), MS (MALDI-TOFMS) *m/z*: calculated 1245.55; found: 1246.33.

2.4. Photophysical properties

2.4.1. Absorption and fluorescence

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 2, Courtabœuf, France) UV–visible spectrophotometer. Fluorescence spectra were recorded on a SPEX Fluorolog-2 spectrofluorimeter 1680 (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermostated cell compartment (25 °C), using a 450 W Xenon lamp.

2.4.2. Determination of singlet oxygen quantum yield ($\Phi(^1O_2)$)

Excitation occurred with a Xe-arc, the light was separated in a SPEX 1680, 0.22 μm double monochromator. The detection at 1270 nm was done through a PTI S/N 1565 monochromator, and the emission was monitored by a liquid nitrogen-cooled Ge-detector model (EO-817L, North Coast Scientific Co). The absorbance of the reference solution (Bengal pink in ethanol solution $\Phi\ ^1O_2) = 0.68$) and the sample solution (at 515 nm) were set equal (between 0.2 and 0.5) by dilution.

2.5. General procedure for in vitro experiments

2.5.1. Cell culture conditions

For *in vitro* experiments, HUVEC, pooled from several donors, were used (Cambrex, Verviers, Belgium). These cells were routinely grown in endothelial growth medium

(EGM-2), containing 2% fetal bovine serum (FBS), growth factors and supplements, and maintained according to the manufacturer's instructions. Only cells from passages 3 to 7 were used for our experiments. Murine mammary carcinoma (EMT-6) cells were grown in 75 cm^2 plastic tissue culture flasks in RPMI 1640 medium supplemented with 9% heat inactivated fetal calf serum, penicillin (100 i.u. mL^{-1}), streptomycin (100 μg mL^{-1}) in an atmosphere of 37 °C and 5% CO_2 atmosphere. Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). Cells were subcultured by dispersal with 0.25% trypsin and seeded 5×10^4 cells mL^{-1}. All other chemicals were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France). TPP and the peptidic photosensitizers were dissolved in DMSO at a concentration of 1 mM, aliquoted and kept in the dark.

2.5.2. Expression of $\alpha_v\beta_3$ integrins by flow cytometry analysis

The expression of $\alpha_v\beta_3$ integrins was assessed by flow cytometry. Briefly, after trypsinization, 10^6 cells (HUVEC or EMT-6) were incubated with a monoclonal anti-$\alpha_v\beta_3$ integrin antibody coupled to phycoerythrin (LM609, Chemicon International, Temecula, USA) during 1 h at 4 °C, according to the manufacturer's recommendations. Analysis were performed on 10^4 cells (FACSCalibur, Becton–Dickinson, Meylan, France). Isotype-identical antibodies served as controls.

2.5.3. Dark cytotoxicity

Cell survival after incubation with photosensitizers in the dark was measured using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, cells were seeded at the initial density of 1×10^4 cells mL^{-1} in 96-well microtitration plates. TPP and the peptidic photosensitizers were dissolved in DMSO at a concentration of 10^{-3} mol/L, aliquoted and kept in the dark. Forty hours after plating, wells were then emptied, rinsed twice with phosphate buffered saline (PBS) and filled with 200 μL culture media containing various concentrations of photosensitizers (from 0.50 to 10.00 μM). After a 24-h incubation at 37 °C, wells were emptied, rinsed three times with PBS and filled with 200 μL culture media. Cell survival was measured 24 h later, as described previously [17]. Experiments were carried out in triplicates. Results were expressed as relative absorbance to untreated controls. Absorbance values for wells containing medium alone were subtracted from the results of test wells.

2.5.4. Photosensitizers uptake

Cells were seeded at the initial density of 1×10^4 cells mL^{-1} in 96-well microtitration plates. Forty hours after plating, wells were then emptied, rinsed twice with PBS and filled with 200 μL culture media containing various concentrations of photosensitizers for different times, ranging from 1 to 24 h. Medium was then removed, cells were rinsed three times with cold PBS and re-suspended in ethanol and a vigorous pipetting was performed. Photosensitizer was extracted by a 10-min sonication (Branson 1200, Roucaire Instruments Scientifiques, Les Ulis, France). Cell debris were removed by centrifugation (3500*g* for 15 min). Fluorescence (recorded at 650 nm following excitation at 415 nm) was measured on a flx-Xenius spectrofluorimeter (SAFAS, Monaco).

Experiments were carried out at least in triplicates. The fluorescence intensity of each sample was normalized to cell concentration, to molar extinction coefficient values at 415 nm and to fluorescence quantum yield assessed for each compound, respectively.

Experiments were performed with the conjugated chlorins **1**, **2** to only compare the influence of the peptidic moiety on the cellular uptake levels.

2.5.5. Photodynamic activity

Photodynamic activity was assessed by MTT assays. Cell survival was measured 24 h after photosensitization using MTT assay. Cells were seeded at the initial density of 1×10^4 cells mL^{-1} in 96-well microtitration plates. Forty-eight hours after plating, cells were exposed to photo-active compounds at 10^{-6} M. After 24-h incubation at 37 °C, the medium was removed and cells were then washed three times with cold PBS and fresh medium was added before cell irradiation. Results are given as the percentage of the result obtained with the control cultures exposed to photosensitizer alone. Light doses, yielding 50% growth inhibition (LD_{50}), were calculated using medium effect algorithm, and expressed as mean values of three independent experiments performed during different weeks. The dark toxicity of photosensitizers was assessed separately following a similar procedure. Irradiation was carried out at 652 nm, using a diode laser (fluence rate = 2.72 mW cm^{-2}, Coherent, France). Light doses ranged from 1.0 to 11.0 J/cm^2. Negative controls were photosensitizer-free medium without photoirradiation, photosensitizer-free medium with photoirradiation, photosensitizer-containing medium without photoirradiation. Experiments were carried out in triplicates at different days and performed for **1b**, **2** and TPP. Irradiation doses yielding 50% growth inhibition were determined using the medium effect method [20].

2.5.6. Statistical analysis

Mann and Whitney *U*-test was used to test for the significant level between independent variables. The level of significance was set to $P < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Chemistry

The synthesis of **1** and **1b** have been realized according to a classical Fmoc/*t*-Bu solid-phase methodology. To our knowledge, the synthesis of 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin-cyclo[RGDfK] (**2**) has never been described in literature. It is generally accepted that cyclic RGD peptides display a higher activity compared to the linear counterparts, and this beneficial effect may be due to the fact that the cyclic peptides are conformationally less flexible and metabolically more stable [21,22].

The cyclic pentapeptide c[RGDfK] first designed and synthesised by Kessler and co-workers [23] was selected as a vector because the lysine side chain which is not essential for the activity provides a convenient handle to link the photosensitizer. Different strategies have then been developed to synthesize cyclic pentapeptides containing a RGD sequence. The cyclization can been achieved in solution with the formation of an amide bond [24,25] or by Heck reaction with the formation of a carbon–carbon bond [26]. We can also relate the synthesis of cyclic RGD pseudopeptides containing D-Phe-Ψ[(E)—CHdbondCMe]-L-Val and D-PheΨ[(Z)—CH=CMe]-L-Val type alkene dipeptide isosteres cyclized in solution using DPPA and $NaHCO_3$ [27]. Cyclic hexapeptide that contains a RGD sequence has also been coupled to dimyristoylthioglyceryl anchor using a Fmoc/*t*-Bu chemistry and cyclization with DPPA and $NaHCO_3$ in solution [28].

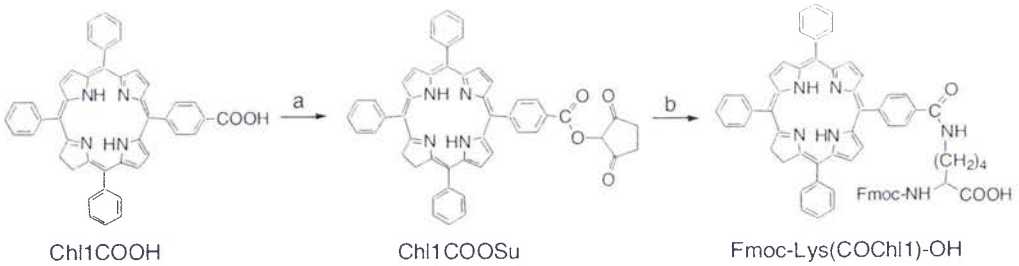
The cyclization can also been realized on solid phase, and this strategy was described in the work of Wang et al. [29]. They synthesized a fluorescent derivative of the cyclic pentapetide c[KRGDf], by carrying out a cyclization on the solid support in a Boc-Strategy using PyBOP, HOBt and DIEA, deprotecting selectively the lysine side chain and coupling carboxyfluorescein to c[Lys-Arg(Pbf)-Gly-Asp(resin)-Phe] using DIPCDI and HOBt. Another example is given by van Well et al. [30,31]. Cyclic RGD peptides containing either one or two furanoid sugar amino acids have been synthesized by cyclization and the cleavage of the corresponding linear sequence immobilised has been achieved on a solid support *via* the base labile *p*-nitrophenone oxime linker.

To the best of our knowledge, only one example concerning the synthesis of a cyclic RGD peptide coupled to a photosensitizer has been described, by Chaleix et al. [32]. They reported the synthesis of glucosylated porphyrins bearing a cyclic pseudopentapeptide incorporating a RGD sequence obtained by ring-closing metathesis.

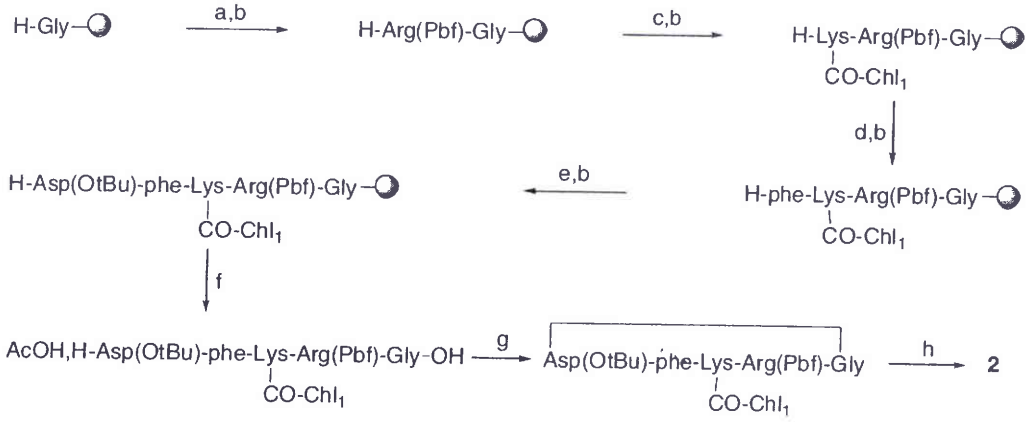
For synthesis of **2**, we adapted the improved synthesis based on Kessler's procedure developed by Dai et al. [33]. We chose to couple first in liquid phase the 4-carboxy phenylchlorin (Chl1COOH) to the amine function of the lysine lateral side chain to form the *N*-Fmoc protected lysine modified at the εN position (Scheme 1). Coupling of Fmoc-Lys-OH with *N*-hydroxysuccinimide activated 4-carboxyphenylchlorine afforded Fmoc-Lys(CO-Chl1)-OH. The assembly of the cyclic peptide was achieved on a H-Gly-2-chlorotrityl resin as previously described (Scheme 2). During the coupling of Fmoc-Lys(CO-Chl1)-OH and all the next steps, light exposure was minimized by sealing the reaction vessel in foil to limit the occurrence of unwanted side reactions.

The linear Chl1-CO-RGDfK peptide was cleaved from the resin without affecting other protecting groups with a mixture acetic acid, 2,2,2 trifluoroethane (TFE) and CH_2CL_2 (1/1/3). The head-to-tail cyclization was performed by slowly adding a solution of the linear peptide acetate to a solution of 1-propane-phosphonic acid cyclic anhydride (T3P) in EtOAc (50/50) in the presence of base.

1, **1b**, and **2** were obtained with a final purity greater than 95%, as assessed by analytical RP-HPLC. Two isomers, corresponding to the reduction of a double bond on either opposing side of the tetrapyrrolic macrocycle could be observed by analytical RP-HPLC (data not shown). These isomers arise from the asymmetrical character of the molecule and could also be observed in the commercial TPC used for synthesis. Identities of the compounds were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry and ^1H NMR experiments (Fig. 1A and B).



Scheme 1. Preparation of Fmoc-Lys(CO-Chl1)-OH. (a) DCCI, HOSu, CH_2Cl_2, 0 °C, (b) Fmoc-Lys-OH, NMM, DCM, rt.



Scheme 2. Synthesis of C-c(RGDfK) **2**. (a) Fmoc-Arg(Pbf)-OH, TBTU, HOBt, DIEA, DMF, (b) 20% piperidine in DMF, (c) Fmoc-Lys(CO-Chl1)-OH, TBTU, HOBt, DIEA, DMF, (d) Fmoc-phe-OH, TBTU, HOBt, DIEA, DMF, (e) Fmoc-Asp(*t*-Bu)OH, TBTU, HOBt, DIEA, DMF, (f) AcOH, TFE, CH_2Cl_2 (1/3/3), (g) 50% 1-propanephosphonic acid cyclic anhydride in EtOAc, TEA, DMAP, CH_2Cl_2, (g) phenol, 1,2-ethanedithiol, thioanisole, deionized H_2O, TFA (6/2/4/4,84).

3.2. Photophysical characteristics

The absorption spectra of **1** and **2** were typical of chlorin derivatives, with a Soret band at about 415 nm and a high extinction coefficient for this signal and four Q bands (516, 543, 598, and 648/650 nm; data not show). In all cases, conjugation induces a decrease in the molar extinction coefficients values, compared to TPP as it has already been observed previously [16,18] (Fig. 1C). The quantum yields of singlet oxygen production ($\Phi(^1O_2)$) for conjugates **1**, **1b**, and **2** were lower than for TPP (Fig. 1C) but still quite high.

3.3. Biological results

3.3.1. Expression of $\alpha_v\beta_3$ integrin by HUVEC and EMT-6 cell lines

The vascular effect can be potentiated by designing photosensitizers localizing primarily in the vascular compartment. Ideally, vascular targeting requires the identification of a target on the surface of angiogenic endothelial cells. Thus, $\alpha_v\beta_3$ integrin is a good candidate for vascular-targeting strategies. In order to validate the use of HUVEC as $\alpha_v\beta_3$-positive cells and EMT-6 line as $\alpha_v\beta_3$-negative cells, integrin expression was investigated. HUVEC strongly expressed $\alpha_v\beta_3$ as assessed by flow cytometry (Fig. 2). No expression was measured for EMT-6 cells. These results confirm that HUVEC express $\alpha_v\beta_3$ integrin which validates their use as an *in vitro* model for our study.

3.3.2. Dark cytotoxicity

A MTT test was used to evaluate the dark cytotoxicity of conjugated photosensitizers and TPP for concentrations ranging from 0.50 to 10.00 μM. A 24-h incubation of the two cell lines in the absence of light exposure with photoactive compounds yielded a surviving cell fraction higher than 85% for concentrations up to 1 μM (data not shown). However,

3.3.3. Photosensitizers uptake

The linear relationships between initial concentrations of TPP and conjugates, respectively, in the medium (0.5–10.0 μM), and the amount of photosensitizer after a 24-h incubation period, indicated that the uptake by the two cell lines was dependent on the concentration used and was always higher than TPP (Fig. 3). The cellular uptake of the conjugates **1**, **2** and TPP according to incubation time, was examined in the dark at a non-cytotoxic concentration of 1.0 μM. The accumulation of **1** and **2** was significantly higher $P < 0.05$ than the cellular uptake of TPP from 1 h to 24 h incubation time (Fig. 4). The conjugates accumulated on average 5 times more in HUVEC than in EMT-6 cells. The differences obtained on the different cell lines could be consistent with the dissimilar accumulation of the conjugates expected, if the uptake was receptor mediated.

The cellular uptake of **1** after a 24-h exposure was on average about 98-fold higher than the concentration of TPP and the accumulation of **2** reached 80-fold more, respectively. The intracellular uptake kinetics demonstrated that a steady state was reached at about 15-h exposure (Fig. 4). These results do not confirm that cyclic peptides containing an RGD motif adopt conformations showing a significant increased affinity for integrins [13,14]. It may be noted that accumulation can be related to the dye retention time values (Table 1), higher hydrophobicity (TPP) corresponding to lower uptake. For **1** and **2**, it is not so clear, as the nature of the peptidic moiety could also influence cellular uptake. Nevertheless, improvement of cellular uptake for the conjugated compounds was partly

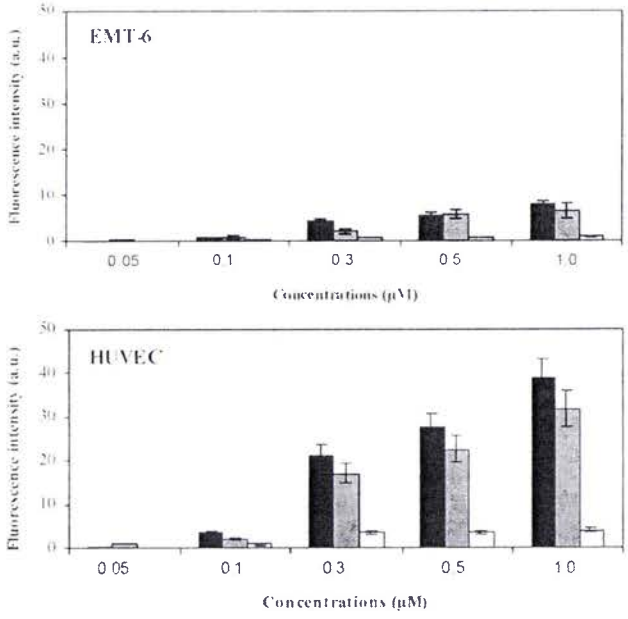


Figure 3. Concentration dependence of the uptake of **1** [black], **2** [grey] and TPP [white, 10-fold increased] in EMT-6 cells and HUVEC. Cells were incubated with photosensitizers for 24 h at concentrations ranging from 0.05 to 1.0 μM. Cellular fluorescence intensities after extraction were measured at 652 nm following excitation at 415 nm. These data represent the mean values from three independent experiments. Errors bars are standard deviations (SD).

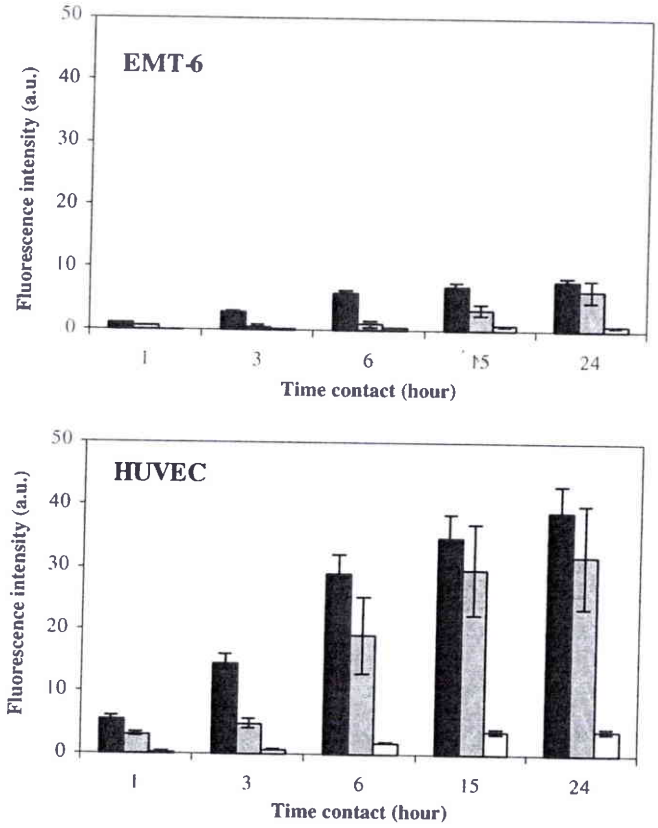


Figure 4. Uptake kinetics of **1** [black], **2** [grey] and TPP [white, 10-fold increased] in EMT-6 cells and HUVEC. Cells were incubated with photosensitizers at 1 μM. Intracellular concentrations were calculated as described in Fig. 3. Data points show the mean ± SD, $n = 3$.

Table 1
Retention times of conjugates **1**, **1b**, **2** and TPP assessed by HPLC

	1	**1b**	**2**	TPP
Retention times (min)	15.10 ± 0.05*	16.4 ± 0.05	17.70 ± 0.05	35.60 ± 0.04
	15.50 ± 0.05		18.20 ± 0.05	

* Mean ± SD, $n = 3$.

related to the increase of their hydrophilicity (Table 1). Thus, peptidic moiety also led to a non-specific increased cellular uptake by EMT-6 cells, lacking RGD binding receptors (Fig. 4, EMT-6). These results suggest that a part of the increased uptake of conjugates was related to non-specific mechanisms. Actually, most photosensitizers are hydrophobic, highly adsorptive, and tend to aggregate in aqueous media as a result of the propensity of the hydrophobic skeleton to avoid contact with water molecules [34]. In our *in vitro* experimental conditions, photosensitizers could not be diluted in compatible biological medium without forming insoluble aggregates, which could increase uptake in an aspecific manner, through passive diffusion or endocytosis of aggregated photosensitizer molecules,

depending on photosensitizer chemical structure and hydrophobicity [35]. Aspecific uptake was also evidenced in our previous work with photosensitizer conjugated to ATWLPPR [18].

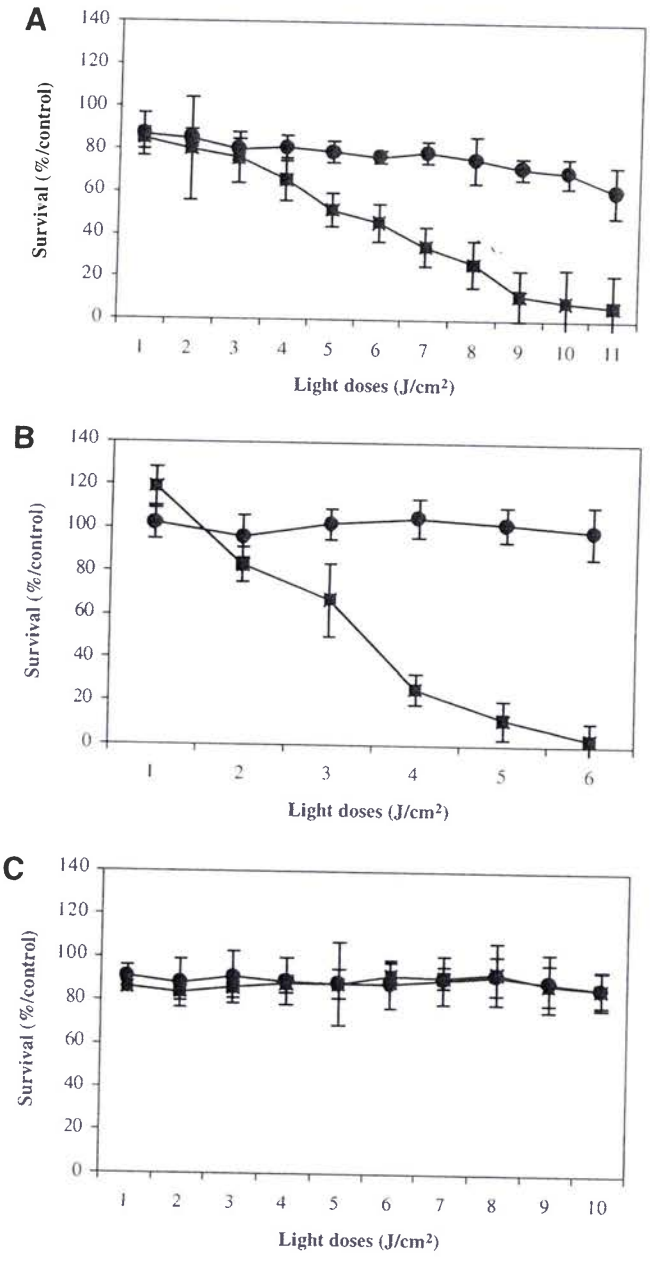


Figure 5. Measurement of photodynamic therapy sensitivity to conjugated photosensitizers with linear peptide **1b** (A), cyclic peptide **2** (B) and TPP (C) in HUVEC [square] and EMT-6 cells [circle]. Cells were incubated with photosensitizers at 1 μM for 24 h before light treatment. Survival curves, obtained by MTT, were obtained for cells exposed to increasing doses of light from 1.0 to 11.0 J/cm^2 (data points show the mean ± SD, $n = 3$).

3.3.4. Photodynamic activity

HUVEC and EMT-6 cells were incubated with the photo-active compounds at 1 μM and irradiated by red light. Because one aim of this work was to improve photosensitization to red light, which is a light wavelength able to enter deeply in living tissues, we compared the activity of conjugates with TPP. The LD_{50} values of photosensitizers with linear **1b** and cyclic peptide **2** were comparable with 3.8 and 3.1 J/cm^2, respectively (Fig. 5A and B). Fig. 5C shows that TPP control photosensitizer displayed no photocytotoxicity in our experimental conditions in HUVEC and EMT-6 cells. Conversely, survival measurements demonstrated that using conjugated compounds, the photosensitivity was not improved for EMT-6 cells (Fig. 5A and B). In HUVEC positive cells, the lowest uptake observed for TPP is consistent with the lack of photosensitivity and the most pronounced photodynamic activity measured for conjugated photosensitizers is in relation with the improvement of cellular uptake in the presence of peptidic moiety. Chaleix et al. reported the solid-phase synthesis of four porphyrins bearing the $\alpha_v\beta_3$ integrin ligand RGD [32]. Three of the conjugates prepared displayed photodynamic activity on the K562 leukemia cell line to a degree comparable to that of Photofrin II®. The authors later described the synthesis of a cyclic peptide containing the RGD motif and adopting conformations showing an increased affinity for integrins [36]. In the ring closing metathesis method used for synthesis, the enzymatically-sensitive disulfide bond of the cyclic[CRGDC] thiopeptide previously described, is replaced by a carbon–carbon double bond in order to increase the plasmatic lifetime of the peptide. A low substituted resin (0.1 mmol/g) was used in order to avoid intermolecular reactions and thus to increase the reaction yield. Carboxy-glucosylporphyrins coupled to this peptide *via* a spacer arm showed the same efficiency for $^1O_2$ production as hematoporphyrin but to the best of our knowledge, no *in vitro* study on these compounds has been reported yet.

In conclusion, we have used a convenient and simple synthetic pathway to prepare a new family of peptidic photosensitizers with cyclic[RGDfK] RGD motif. The higher photodynamic efficiency has been related to conjugates greater cellular uptake. Our results also show that peptidic moiety is obviously an interesting means to introduce such a balance between hydrophilicity and hydrophobicity, previous observations suggesting the requirement of amphiphilicity for efficient photodynamic activity [37]. RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenychlorin or tetraphenylporphyrin are much more potent photosensitizers that unconjugated photosensitizer in HUVEC over-expressing $\alpha_v\beta_3$ integrin. According to our *in vitro* results, photosensitizers with linear or cyclic RGD motif could comparatively target tumor endothelial cells and may efficiently potentate the vascular effect of PDT *in vivo*.

Acknowledgments

This work was supported by the research funds of the French "Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités Lorrains" and "La Région Lorraine".

References

[1] T. Patrice, D. Olivier, L. Bourre, J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol. 25 (2006) 467–486.
[2] T.J. Dougherty, Photochem. Photobiol. 45 (1987) 879–889.

[3] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, J. Natl. Cancer Inst. 90 (1998) 889–905.
[4] W.M. Sharman, J.E. van Lier, C.M. Allen, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (2004) 53–76.
[5] J. Folkman, Nat. Med. 1 (1995) 27–31.
[6] K. Ichikawa, T. Hikita, N. Maeda, S. Yonezawa, Y. Takeuchi, T. Asai, Y. Namba, N. Oku, Biochim. Biophys. Acta 1669 (2005) 69–74.
[7] G. Poste, G.L. Nicolson, Biomembranes 11 (1983) 341–364.
[8] A. Bamias, M.A. Dimopoulos, Eur. J. Int. Med. 14 (2003) 459–469.
[9] F.G. Giancotti, E. Ruoslahti, Science 285 (1999) 1028–1032.
[10] A. van der Flier, A. Sonnenberg, Cell Tissue Res. 305 (2001) 285–298.
[11] P.C. Brooks, R.A. Clark, D.A. Cheresh, Science 264 (1994) 569–571.
[12] R. Haubner, H.J. Wester, Curr. Pharm. Des. 10 (2004) 1439–1455.
[13] R. Haubner, H.-J. Wester, W.A. Weber, C. Mang, S.I. Ziegler, S.L. Goodman, R. Senekowistsch-Schmidtke, H. Kessler, M. Schwaiger, Cancer Res. 61 (2001) 1781–1785.
[14] N. Assa-Munt, X. Jia, P. Laakkonen, R. Ruoslahti, Biochemistry 40 (2001) 2373–2378.
[15] G.C. Tucker, Curr. Oncol. Rep. 8 (2006) 96–103.
[16] B. Di Stasio, C. Frochot, D. Dumas, P. Even, J. Zwier, A. Müller, J. Didelon, F. Guillemin, M.L. Viriot, M. Barberi-Heyob, Eur. J. Med. Chem. 40 (2005) 1111–1122.
[17] R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J.F. Muller, M. Barberi-Heyob, Bioorg. Med. Chem. 13 (2005) 2799–2808.
[18] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, J. Control. Release 11 (2006) 153–164.
[19] J. Neimark, J.P. Briand, Pept. Res. 6 (4) (1993) 219–228.
[20] T.C. Chou, P. Talalay, Adv. Enzyme Regul. 22 (1984) 37–64.
[21] A. Giannis, T. Kolter, Angew Chem. Int. Ed. Engl. 32 (1993) 1244–1267.
[22] S.J. Bogdanowich-Knipp, S. Chakrabarti, T.D. Williams, R.K. Dillman, T.J. Siahaan, J. Pept. Res. 53 (1999) 530–541.
[23] R. Haubner, W. Schmitt, G. Hölzemann, S.L. Goodman, A. Jonczyk, H. Kessler, J. Am. Chem. Soc. 118 (1996) 7881–7891.
[24] C.F. McCusker, P.J. Kocienski, F.T. Boyle, A.G. Schätzlein, Bioorg. Med. Chem. Lett. 12 (2002) 547–549.
[25] D. Boturyn, P. Dumy, Tetrahedron Lett. 42 (2001) 2787–2790.
[26] K. Akaji, K. Teruya, M. Akaji, S. Aimoto, Tetrahedron 57 (2001) 2293–2303.
[27] S. Oishi, T. Kamano, A. Niida, Y. Odagaki, N. Hamanaka, M. Yamamoto, K. Ajito, H. Tamamura, A. Otaka, N. Fujii, J. Org. Chem. 67 (2002) 6162–6173.
[28] B. Hu, D. Finsinger, K. Peter, Z. Guttenberg, M. Bärmann, H. Kessler, A. Escherich, L. Moroder, J. Böhm, W. Baumeister, S.f. Sui, E. Sackmann, Biochemistry 39 (2000) 12284–12294.
[29] W. Wang, Q. Wu, M. Pasuelo, J.S. McMurray, C. Li, Bioconjug. Chem. 16 (2005) 729–734.
[30] R.M. van Well, H.S. Overkleeft, M. Overhand, E.V. Carstenen, G.A. van der Marel, J.H. van Boom, Tetrahedron Lett. 41 (2000) 9331.
[31] R.M. van Well, H.S. Overkleeft, G.A. van der Marel, D. Bruss, G. Thibault, P.G. de Groot, J.H. van Boom, M. Overhand, Bioorg. Med. Chem. Lett. 13 (2003) 331–334.
[32] V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, Tetrahedron Lett. 45 (2004) 5295–5299.
[33] X. Dai, Z. Su, J.O. Liu, Tetrahedron Lett. 41 (2000) 6295–6298.
[34] I. Rosenthal, Photochem. Photobiol. 53 (1991) 859–870.
[35] R. Schneider, L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, J. Gravier, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Drugs 6 (2006) 469–488.
[36] V. Chaleix, V. Sol, Y.M. Huang, M. Guilloton, R. Granet, J.C. Blais, P. Krausz, Eur. J. Org. Chem. 8 (2003) 486–1493.
[37] A.S. Sobolev, D.A. Jans, A.A. Rosenkranz, Prog. Biophys. Mol. Biol. 73 (2000) 51–90.

DMD Fast Forward. Published on February 5, 2007 as doi:10.1124/dmd.106.013763

Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an *in vivo* and *in vitro* study

Loraine Tirand, Noémie Thomas, Marc Dodeller, Dominique Dumas, Céline Frochot, Benoît Maunit, François Guillemin and Muriel Barberi-Heyob

Centre Alexis Vautrin-CRAN, UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Nancy-University, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, France [L.T., N.T., F.G., M.B.H] ; Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Université Paul Verlaine-Metz, 1 Boulevard Arago, F-57078 Metz Technopole 2000 Cedex 03, France [M.D., B.M.] ; Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, UMR 7563 CNRS-INPL, LEMTA et IFR 111 CNRS-UHP-INPL-CHU, Nancy-University, F-54505 Vandœuvre-lès-Nancy Cedex [D.D.] ; DCPR-GRAPP, Groupe ENSIC-UMR 7630 CNRS-INPL, Nancy-University, 1 Rue Grandville, F-54000 Nancy, France [C.F.]

Copyright 2007 by the American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.

Running title: Metabolism of a peptide-chlorin conjugate

Address correspondence to:

Dr Muriel Barberi-Heyob

Laboratoire de Recherche

Centre Alexis Vautrin,

Avenue de Bourgogne,

F-54511 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

Telephone: +33 3 83 59 83 76

E-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Number of text pages, including references: 26

Number of figures: 9

Number of references: 26

Number of words in abstract: 242

Number of words in introduction: 544

Number of words in discussion: 1326

Non-standard abbreviations: Ahx, 6-aminohexanoic acid; a.i., arbitrary intensity; a.u., arbitrary units; $DiOC_6$, 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide; DLI, drug-light interval; EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; EGM2, endothelial growth medium; Fmoc, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; i.v., intravenous; LDL, Low-density lipoprotein; MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight; *m*THPP, 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)porphyrin; NRP-1, neuropilin-1; PBS,

phosphate-buffered saline; PDT, photodynamic therapy; PEG, polyethylene glycol, p.i., post injection; PS, photosensitizer; s.d., standard deviation; tBu, tertio-butyl; TEM buffer, Tris EDTA molybdate buffer; TPC, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

ABSTRACT

Since angiogenic endothelial cells of the tumor vasculature represent an interesting target to potentiate the anti-vascular effect of photodynamic therapy, we recently described the conjugation of a photosensitizer (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin, TPC), *via* a spacer (6-aminohexanoic acid, Ahx), to a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) receptor specific-heptapeptide (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH, noted ATWLPPR), and demonstrated that TPC-Ahx-ATWLPPR binds to neuropilin-1 (NRP-1). Since peptides often display low stability in biological fluids, we examined the *in vivo* and *in vitro* stability of this conjugate by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry. TPC-Ahx-ATWLPPR was stable *in vitro* in human and mouse plasma for at least 24h at 37°C but, following intravenous injection in glioma-bearing nude mice, was degraded *in vivo* to various rates, depending on the organ considered. TPC-Ahx-A was identified as the main metabolic product and biodistribution studies suggested that its appearance in plasma mainly resulted from the degradation of the peptidic moiety into organs of the reticuloendothelial system. According to *in vitro* cell culture experiments, TPC-Ahx-ATWLPPR was also significantly degraded after incorporation in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), mainly into TPC-Ahx-A and, to a lesser extent, into TPC-Ahx-AT and TPC-Ahx-ATWLPP. TPC-Ahx-ATWLPPR mostly localized into lysosomes and, when HUVEC were treated with the lysosomal enzymes inhibitor ammonium chloride, this resulted in a significant decrease of the peptide degradation. This study provides essential information for the choice of the time of activation of the photosensitizer (drug-light interval) not to be exceeded and for the future design of more stable molecules.

INTRODUCTION

The selectivity of photodynamic therapy (PDT) as an anti-cancer treatment relies on the local generation of cytotoxic reactive oxygen species in the tumor, due to both preferential uptake of the photosensitizer (PS) by malignant tissue and subsequent localized light irradiation. Indeed, the PS, at the concentrations used for PDT, is non-toxic in the dark and becomes photocytotoxic only when light at an appropriate wavelength is applied. However, the tumor selectivity of PSs used in the clinic is limited, as they tend to accumulate in normal tissue (Dougherty et al., 1998). This can be improved by using third generation PSs, which consist of PSs to which a tumor-targeting moiety is attached (Sharman et al., 2004). Among these tumor-targeting molecules, peptides are receiving increasing interest in the field of PDT (Schneider et al., 2006). They do not only exist in a natural form but can also be designed synthetically as novel molecules. In addition, the effective tissue penetration of short synthetic peptides, in combination with their selective binding and internalizing capacity by cancer cells, make peptides ideal candidates for the delivery of therapeutic agents such as PSs (Schneider et al., 2006).

We recently reported the synthesis and *in vitro* efficacy of a new peptide-conjugated PS (referred to hereafter as TPC-Ahx-ATWLPPR) having affinity for endothelial cells of the tumor neovasculature by targeting the Vascular Endothelial Growth Factor ($VEGF_{165}$) receptor neuropilin-1 (NRP-1), and not the type 2 VEGF receptor (VEGFR-2/KDR), as previously thought, through its peptidic moiety (Tirand et al., 2006). TPC-Ahx-ATWLPPR displayed enhanced uptake and photodynamic properties in endothelial cells, compared to its non-conjugated counterpart TPC. Destruction of the neovasculature of tumors may indirectly lead to tumor eradication, following deprivation of life-sustaining nutrients and oxygen (Folkman, 1995; Dougherty et al., 1998), and this anti-vascular

effect is thought to play a major part in the destruction of some vascularized tumors by PDT (Ichikawa et al., 2005).

Despite their numerous advantages over other molecules (*e.g.* antibodies, proteins) as targeting agents, the main disadvantage of peptides is related to their natural structural conformation which makes them extremely sensitive to endo- and exo-peptidases present in most tissues (Adessi and Soto, 2002). As a result, they often display low stability in biological fluids, which limits their use *in vivo*. While the PS moiety of TPC-Ahx-ATWLPPR is responsible for the photocytotoxic activity of the conjugate, the peptidic part is responsible for its selectivity. Degradation of the peptidic moiety of the molecule would impair the selectivity of the conjugate, and would both allow it to accumulate in normal tissues, where the activated PS could exert non-desirable photocytotoxicity, and decrease the amount of PS delivered to targeted diseased tissues. Therefore, in order to optimize the *in vivo* use of the new conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR that proved very effective *in vitro* (Tirand et al., 2006), we sought to investigate its stability after intravenous (i.v.) injection to mice bearing NRP-1-expressing tumors. The metabolic products were identified and quantified by Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and reverse phase High Performance Liquid Chromatography (HPLC), respectively. Besides, in order to gain mechanistic insight in the degradation process observed *in vivo*, the *in vitro* stability of TPC-Ahx-ATWLPPR was studied in human and mouse plasma as well as in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) that express NRP-1.

MATERIALS AND METHODS

Synthesis and purification. 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC) was purchased from Frontier Scientific (Logan, Utah). Wang resin, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc)-aminoacids and Fmoc-aminohexanoic acid were from Senn Chemicals International (Gentilly, France). The side chains of threonine and tryptophan were respectively protected by tertio-butyl (tBu) and N-*tert*-butoxy-carbonyl groups. The PS-peptide conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR (Fig. 1) was synthesized on a multichannel peptide synthesizer, according to a classical Fmoc/ tBu solid phase methodology and purified by reverse phase HPLC, as described previously (Tirand et al., 2006). Stock solutions of 2 mM in dimethyl sulfoxide, aliquoted and kept in the dark at –20°C, were used.

Chemical characterization. Purity and chemical identity of TPC-Ahx-ATWLPPR were assessed by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry analyses, respectively, as described in corresponding paragraphs. Hydrophobicity/hydrophilicity properties of TPC-Ahx-ATWLPPR were determined using the distribution coefficient $D_{pH\ 7.4} = C_{octanol} / C_{PBS}$ of the compound between the two immiscible solvents n-octanol and phosphate-buffered saline (PBS), that had previously been pre-saturated with each other. TPC-Ahx-ATWLPPR was mixed with an equal volume of octanol (1.5 mL) and PBS (1.5 mL) at room temperature. The mixture was agitated during 3h. When equilibrium between the two phases was achieved, the solvents were separated by centrifugation (2,500g ; 5 min). The amount of PS contained in each phase was determined by HPLC. The distribution coefficient $D_{pH\ 7.4}$ is expressed as log (mean ± standard deviation (s.d.), n=6).

Cell line and culture. For *in vitro* experiments, NRP-1-expressing Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC), pooled from several donors, were used (Cambrex, Verviers, Belgium) and routinely grown in endothelial growth medium (EGM2), as described previously (Tirand et al., 2006).

Animals and tumor model. Female athymic Foxn1 nude mice (*nu/nu*) were obtained from Harlan (Gannat, France), and used at 7–9 weeks old and weight of 20–25 g. Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines. The model of human malignant glioma was obtained using U87 cells, as described previously (Tirand et al., 2006).

***In vivo* metabolism of TPC-Ahx-ATWLPPR.** When tumors reached a volume of 70±30 mm^3 (15±5 days after tumor grafting), TPC–Ahx–ATWLPPR (2.8 mg/kg) dissolved in polyethylene glycol (PEG) 400–ethanol–water (30/20/50, v/v/v) was injected *via* the tail vein, and mice were kept in the dark. After a time ranging from 1 to 48h, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (Ketalar®, Panpharma, Fougères, France) at 60 mg/kg and xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France) at 8 mg/kg. Blood samples were collected in heparinized tubes (BD Vacutainer, Becton Dickinson, Plymouth, UK) by cardiac puncture, cooled on ice and the plasma was separated by centrifugation (700g ; 10 min) within 30 min of collection. Mice were sacrificed by cervical dislocation and the tissues were carefully excised, rinsed with saline and blotted dry. The tissues selected for dissection were tumor, liver, kidney, spleen and skin (removed from the back of the mice). At least three animals were used per time point. All samples were protected from light. Blood, tumor and organs samples were kept at

-80°C in polypropylene tubes, until analysis by HPLC and/or MALDI-TOF mass spectrometry.

***In vitro* stability of TPC-Ahx-ATWLPPR.** Human and mouse plasma were obtained from whole blood of human volunteers and nude mice, respectively. Mice and human blood samples were collected in heparinized tubes by heart puncture, or using an indwelling i.v. cannula placed in the arm, respectively. After immediate centrifugation at 700g for 10 min at 4°C, the supernatant (plasma) was withdrawn and frozen at -80°C in aliquots until required. TPC-Ahx-ATWLPPR was added to pre-warmed human or mouse plasma at a final concentration of 1 µM, and incubated up to 24h at 37°C. Samples were taken after 2, 6 and 24h, and kept at -80°C in polypropylene tubes, until analysis by HPLC.

For *in vitro* cell experiments, HUVEC were grown in T-25 flasks (initial seeding concentration: 5.10^4 cells/mL) for 3 days. EGM2 medium (3 mL) containing 1 µM TPC-Ahx-ATWLPPR (with or without 30 mM ammonium chloride, Merck Eurolab A.A., Fontenay-sous-Bois, France) was then added. At different times, ranging from 1 to 24h, the EGM2 cell medium was collected. Subsequently, cells were rinsed twice with cold PBS, trypsinized, counted, centrifuged (220g ; 5 min) and kept at -80°C in polypropylene tubes, until analysis by HPLC and/or MALDI-TOF mass spectrometry. All incubations were performed in triplicates.

Preparation of samples for HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry analyses. Extraction of the PS from plasma, tumor, organs, cells and cell medium was carried out as described previously (Barberi-Heyob et al., 2004; Tirand et al., 2006). To remove surface blood, tissue samples (tumor, organs) were rinsed in physiological saline, blotted dry and

weighted. They were crushed in 500 µL TEM buffer (10 mM Tris, 1.66 mM EDTA, 5 mM molybdate, pH 7.4) using an Ultra-Turrax® T25 device (IKA, Labortechnik, Janke & Kunkel, Germany). Then, all samples were spiked with 100 µL of 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)porphyrin (*m*THPP) (500 ng/mL in methanol) as an internal standard of extraction. Extraction involved solvent precipitation using methanol combined with dimethyl sulfoxide (5/0.1, v/v). Samples were then vortexed, homogenized for 30 min, and sonicated for 10 min (Branson 1200, Roucaire Instruments Scientifiques, Les Ulis, France). Tissue and cellular debris were removed by centrifugation (2,500g ; 15 min). The PS-containing organic phase was then concentrated by evaporation at room temperature for at least 3h with a Speedvac® apparatus (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) and re-suspended into 200 µL methanol.

Control (blank) plasma, tumor, organs, cells and cell medium (*i.e.* containing no exogenous PSs) were used in order to determine whether endogenous constituents coeluted with the PSs. Calibration samples, used to construct calibration curves, were prepared by mixing plasma, tumor, organs, cells or cell medium with appropriate concentrations of PS. For these control and calibration samples, the PS extraction procedure was identical to that described above.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC) analysis. The chromatographic system was composed of a programmable solvent module (System Gold 126, Beckman), an autosample injector (507e, System Gold, Beckman) and a scanning fluorescence detector (RF-10A XL, Shimadzu). Analyses were performed by reverse phase HPLC on a C18 analytical column (250 × 4.6 mm i.d., S-5µm, YMC, Interchim, France), under isocratic elution conditions with a mobile phase of methanol-H_2O (95/5, v/v) and a flow rate of 1 mL/min. Fluorescence emission was detected at 652 nm, with an excitation

wavelength set at 416 nm. These wavelengths correspond to the maximal intensities of the fluorescence emission and absorption spectra of TPC-Ahx-ATWLPPR, respectively (Tirand et al., 2006). All chemicals were of analytical grade quality. The chromatograms were acquired and analyzed using *GOLD™ Nouveau software version 1.6* (Beckman Coulter France A.A., Roissy CDG, France). Quantitations were based on peak areas and deduced from calibration curves.

Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight (MALDI-TOF) mass spectrometry analysis. 1 µL of a 2,5-dihydroxybenzoic acid solution (150 mg/mL in water/acetonitril, 1/1, v/v) was mixed with 1 µL of sample and spotted on the stainless steel MALDI targets. The solvent was evaporated prior to insertion in the source. Mass spectra were acquired over the range 0–2000 Da. Analyses were performed on a Bruker Reflex IV time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Bruker-Daltonic, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT 384 probe ion source. The system used a pulsed nitrogen laser (337 nm, model VSL-337ND, Laser Science Inc., Boston, MA) with a maximal energy of 400 µJ/pulse. The detector signals were amplified and transferred to the XACQ program on a SUN work station (Sun Microsystems Inc. Palo Alto, CA). Spectra were processed with the XMass 5.1 program (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). External calibration of MALDI mass spectra was carried out using sodic and potassic distribution of PEG 600 and PEG 1500 mixtures.

Intracellular localization by confocal laser scanning microscopy. Exponentially growing HUVEC were plated at 10^3 cells per well in Labtek-II® 8-chambered coverslips (Dutscher, Brumath, France). After a 48-h attachment and growth period at 37°C, the cells were incubated with TPC-Ahx-ATWLPPR (1 µM) for 24h and specific fluorescent

organelle markers (Molecular Probes-Europe, Leiden, The Netherlands), using the procedure adapted from the experimental protocol previously reported (Di Stasio et al., 2005). The endoplasmic reticulum was stained by incubating cells for 30 s at room temperature with 1 $\mu g\ mL^{-1}$ of 3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide ($DiOC_6$). Mitochondria were identified after staining the cells for 30 min at 37 °C with 0.5 μM MitoTracker® Green. LysoTracker® Green was used at a final concentration of 0.2 μM for 30 min to identify lysosomes. To visualize the Golgi apparatus, cells were labeled with 2 μM of *N*-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene-3-pentanoyl) sphingosine (BODIPY® FL C_5-ceramide, BPC) for 20 min at 4°C, and then further incubated in dye-free EGM2 medium at 37°C for 30 min. At the end of the double staining, the labeling solution was removed by gentle rinsing with EGM2 medium, and cells were imaged using a confocal laser scanning microscope (TCS SP2-AOBS, Leica microsystem, Germany) equipped with an x63, numerical aperture 1.3 oil immersion objective (Leica). A pinhole of 60.85 μm was used and each image recorded contained 512x512 pixels. An Argon laser was used as excitation light at 488 nm for all organelle probes and TPC-Ahx-ATWLPPR. Fluorescence of the organelles probes was detected on channel 1 with a 505–545 nm band pass emission filter. Channel 2 was used to detect the red fluorescence of TPC-Ahx-ATWLPPR with a 640–660 nm band pass emission filter. The fluorescence images were displayed in green and red "false" colors, for organelle markers and PS, respectively.

Statistical analysis. Unless otherwise indicated, all data are mean values ± s.d. calculated from at least three independent experiments. Mann and Whitney U test was used to test for the significant level between independent variables. The level of significance was set to $p<0.05$.

RESULTS

Chemical characterization of TPC-Ahx-ATWLPPR. The molecular structure of the conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR is shown on figure 1. The peptide-conjugated chlorin was obtained with a final purity greater than 95%, as assessed by analytical reverse phase HPLC (Fig. 2A). Several peaks can be observed on the chromatogram. The peak eluted at 5±1 min corresponds to mTHPP, used as an internal standard. The double peak with a retention time of about 21 min corresponds to TPC-Ahx-ATWLPPR. The two peaks arise from the presence of two isomers of the molecule, due to the reduction of a double bond on either opposing side of the tetrapyrrolic macrocycle. These isomers could also be observed in the commercial TPC used for synthesis. Identity was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (theoretical mass = 1596.81 Da, experimental mass = 1596.83 Da, Fig. 2B). The value of the octanol/ PBS distribution coefficient log $D_{pH\ 7.4}$ was equal to 2.6±0.2, arguing for the hydrophobic character of TPC-Ahx-ATWLPPR.

***In vivo* plasma stability.** No degradation product of TPC-Ahx-ATWLPPR could be observed *in vivo* in plasma up to 1h after i.v. injection (*not shown*). From 2h post injection (p.i.), peaks with shorter retention times (12 ± 2 min) than those corresponding to TPC-Ahx-ATWLPPR (21 ± 3 min) appeared on the HPLC chromatograms of plasma and increased as a function of time after injection (Fig. 3A1 and Fig. 3A2). We identified the predominant metabolic product as resulting from the enzymatic cleavage of the peptide bond between the alanyl and threonyl residues (Fig. 3B). This degradation product (TPC-Ahx-A) was detected in plasma at all time points from 2h p.i. (Fig. 3C). However, the amount of degradation product in plasma was relatively low (less than 20% of the total amount of PSs), up to 4h p.i.

***In vitro* stability in plasma.** In order to assess the involvement of the plasma compartment in the degradation process, we followed the *in vitro* stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in plasma. A concentration of 1 μM was chosen, as it represents a relevant *in vivo* concentration. Indeed, after injection of 2.8 mg/kg of TPC-Ahx-ATWLPPR in glioma-bearing mice, the *in vivo* plasma concentrations of this peptide-photosensitizer conjugate were in the range of 200 to 6,000 ng/mL (0.1 – 3.8 μM), from 1 to 48h p.i. (Figure 3C). TPC-Ahx-ATWLPPR was stable *in vitro* in human plasma, up to 24h at 37°C (Fig. 4). Likewise, no degradation could be observed in mouse plasma, up to 24h in the same conditions (*not shown*). This suggested that the degradation observed in mouse plasma *in vivo* did not involve plasma peptidases.

***In vivo* biodistribution and metabolism in glioma-bearing nude mice.** In order to explore the biodistribution and stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in tumor-bearing mice, PS concentrations were determined in the tumor and organs of mice (n=3 or 4) at different times. Following i.v. injection into tumor-bearing mice, PS accumulated to the highest levels in liver and spleen (Fig. 5A). It should be noted that part of the PSs quantities estimated in the liver, a highly vascularized organ, is due to PS present in the blood circulation, as our values have not been corrected for blood content of the tissue. Moreover, endogenous porphyrins (*e.g.* heme) are present at significant levels in the liver. These porphyrins could not be completely separated from our PSs ; indeed, part of their elution peaks superimposed to the ones of our PSs (*i.e.* similar retention times). As a result, the real PS quantities in the liver are in fact lower than those presented on figure 5A, but would remain much higher than the PS quantities in all the other organs considered. Total PS levels in the tumor were higher than in the skin at all time points (Fig. 5A).

Whereas TPC-Ahx-ATWLPPR was stable *in vitro* in plasma for at least 24h, a degradation product could be observed *in vivo* in plasma (Fig. 3A2), as well as in other organs (Fig. 5A). In the organs of the reticuloendothelial system, TPC-Ahx-ATWLPPR was rapidly degraded, and the major part of the hydrolysis of the peptide bond(s) occurred in the liver (Fig. 5A). Indeed, the degradation product represented more than 85% of the total amount of PS present in the liver as early as 2h p.i. TPC-Ahx-A was characterized as the main metabolic product from liver by MALDI-TOF analysis (Fig. 5B). On the contrary, the percentages of degradation measured at 2h and 4h p.i. in the tumor were inferior to 25% and 45%, respectively (Fig. 5A). Likewise, the extent and rate of degradation in the skin were very low, with no degradation observed up to 4h p.i. (Fig. 5A). Therefore, the degradation observed *in vivo* in the plasma likely resulted from a release from some organs (*i.e.* liver, spleen), where the degradation took place.

***In vitro* stability in cell medium and endothelial cells.** TPC-Ahx-ATWLPPR was stable in EGM2 medium up to 24h at 37°C (Fig. 6A). No degradation product could be observed in the cell medium, and the supernatant was progressively depleted in TPC-Ahx-ATWLPPR, due to its high rate of uptake in HUVEC (Fig. 6A). On the contrary, TPC-Ahx-ATWLPPR was progressively degraded inside HUVEC into products that were still fluorescent and, therefore, potentially photocytotoxic (Fig. 6B). The amount of degradation increased as a function of incubation time. TPC-Ahx-ATWLPPR was significantly degraded ($p<0.05$) from 6h after incorporation by HUVEC. By MALDI-TOF mass spectrometry, a main degradation product (TPC-Ahx-A) and two secondary metabolites (TPC-Ahx-AT and TPC-Ahx-ATWLPP) were identified (Fig. 7).

Localization of TPC-Ahx-ATWLPPR. Intracellular localization in HUVEC following incubation with TPC-Ahx-ATWLPPR (1 μM, 24h) was studied using fluorescent organelle probes, and confocal fluorescence microscopy. Yellow color on merged images from intracellular localization of the PS (red) and the probe (green) indicates colocalization of both (Fig. 8). TPC-Ahx-ATWLPPR mostly localized into lysosomes (Fig. 8A), compared to Golgi apparatus, mitochondria and endoplasmic reticulum (Fig. 8B, C and D, respectively).

***In vitro* stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in HUVEC in presence of an inhibitor of lysosomal enzymes.** Ammonium chloride is a lysosomotropic weak base that, as such, inhibits the action of lysosomal enzymes by increasing lysosomal pH. As shown on figure 9, the addition of this inhibitor to the cell medium significantly decreased the percentage of intracellular degradation of TPC-Ahx-ATWLPPR, arguing for the role of lysosomal enzymes in the degradation process.

DISCUSSION

It is well known that, following its *in vivo* administration, a drug is progressively cleared and/or metabolized into active or inactive metabolites. The photocytotoxic activity of the TPC-Ahx-ATWLPPR molecule is brought by the PS moiety, while selectivity for the tumor neovasculature is due to the presence of the peptidic component. Therefore, inactive metabolites would result from the breakdown of the macrocycle, while sole degradation of the peptide would be detrimental to selectivity but would still give rise to active molecules. Indeed, one of the main disadvantages of peptides is their sensitivity to proteolysis, which limits their use *in vivo* (Adessi and Soto, 2002). In this work, we first investigated the *in vivo* stability of TPC-Ahx-ATWLPPR following i.v. injection into tumor-bearing mice. A significant degradation could be observed in plasma from 4h p.i. We identified the main metabolic product as being TPC-Ahx-A. This metabolite would very probably have lost any selectivity for angiogenic endothelial cells that line the neovessels of the tumor, since the arginyl residue at the C-terminus of the ATWLPPR peptide has been shown to be essential for affinity for NRP-1 (Tournaire et al., 2001). Therefore, for future *in vivo* assessments of photodynamic activity of TPC-Ahx-ATWLPPR, the drug-light interval (DLI, *i.e.* the time interval between PS injection and its subsequent activation by light) should preferably, according to this study, be inferior or equal to 4h. Indeed, after that time, more than 20% of the PSs present in plasma is TPC-Ahx-A, which does not possess any specificity for endothelial cells lining the tumor vessels, contrary to TPC-Ahx-ATWLPPR. Using a DLI longer than 4h would certainly allow PS accumulation in non-targeted tissues (*e.g.* skin), with potential skin photosensitivity problems, but would probably not improve much its uptake in target tissues (*i.e.* endothelium of tumor vessels).

The PSs (TPC-Ahx-ATWLPPR and TPC-Ahx-A) accumulated at much higher levels in the liver than in the tumor. This has also been observed for other hydrophobic photosensitizers, including Foscan®, with tumor to liver ratios of PS concentrations as low as 0.03 (Jones et al, Br J Cancer, 2003), but only PSs present in the tumor will be activated, due to localized light irradiation. It should be noted that PSs present at the time of irradiation in plasma and endothelial cells lining the tumor vessels, and not only in tumor cells, also play a major part in tumor eradication by PDT, by inducing vascular damage and occlusion of tumor vessels, which leads to tumor deprivation in nutrients and oxygen (Cramers, Br J Cancer, 2003).

A variety of proteases are present in human plasma, including both exopeptidases and endopeptidases (McDonald and Barrette, 1980; McDonald and Barrette, 1986). Therefore, we assessed the *in vitro* stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in mouse and human plasma and did not observe any degradation during at least 24h at 37°C, thus discarding any role of the plasma peptidases in the degradation phenomenon. The conjugated PS accumulated to high levels into organs of the reticuloendothelial system (*i.e.* liver, spleen), in agreement with its hydrophobic character, like other lipophilic PSs, *e.g.* Foscan® (Jones et al., 2003; Jori and Fabris, 1998). Indeed, upon administration into the bloodstream, most PSs associate with various serum proteins including both high and low density lipoproteins (LDLs) and albumin (Hopkinson et al., 1999). LDLs are believed to be important in the transportation of hydrophobic PSs. α2-Macroglobulin/LDL receptors are widely found in cells of various types, with LDL uptake most pronounced in adrenals, liver and spleen (Rosenkranz et al., 2000).

The conjugated PS was rapidly degraded in organs of the reticuloendothelial system, as soon as 1h p.i. Some degradation also occurred quite rapidly in the tumor, less than in metabolic organs but more than in plasma. All these results strongly suggested that the

degradation product TPC-Ahx-A identified in plasma resulted from the degradation of the peptide in organs of the reticuloendothelial system, mainly liver, and subsequent release into the bloodstream.

In order to gain mechanistic insight into the degradation phenomenon, we undertook *in vitro* studies in HUVEC. TPC-Ahx-ATWLPPR was not degraded into the cell culture medium, thus allowing it to accumulate at high levels into cells through active targeting of NRP-1, as confirmed by the high depletion rate of the PS observed in the medium. On the contrary, following internalization by HUVEC, the peptide moiety of TPC-Ahx-ATWLPPR was progressively degraded, mostly into TPC-Ahx-A, as observed *in vivo*, but also, to a lesser extent, into TPC-Ahx-AT and TPC-Ahx-ATWLPP. Degradation of the peptidic moiety inside cells is not detrimental to our strategy, since the peptide has already played its targeting role, and that, at this stage, only the PS moiety is involved in the photocytotoxic effect.

The distribution of a PS within cells depends on the route by which it enters, as well as on its physicochemical properties, *e.g.* its hydrophobicity/hydrophilicity; the type, number and arrangement of its charged groups; the presence of a central atom in the tetrapyrrole structure; its aggregation state *etc* (Rosenkranz et al., 2000). For example, LDL-bound PSs can enter target cells *via* receptor-mediated endocytosis. Chlorin e6 covalently bound to LDLs has been detected in enzymatically active lysosomes (Schmidt et al., 1992). We showed that TPC-Ahx-ATWLPPR also mostly localized into lysosomes, in agreement with the fact that TPC-Ahx-ATWLPPR targets NRP-1 and should be incorporated into cells by a receptor-mediated endocytosis mechanism. Lysosomes are known to contain a large variety of hydrolytic enzymes, which degrade proteins and other substances taken up by endocytosis. The main proteolytic activities experienced by endocytosed peptides and proteins in the endosomal/lysosomal pathway belong to a family of papain-like proteases

called cathepsins (Roberts, 2005). pH rate profiles indicate that the low pH of the lysosomes (approximately 5.5) is optimal for the majority of cathepsins. Treatment with the lysosomotropic weak base ammonium chloride significantly decreased the extent of intracellular degradation.

Since some peptides can be significantly stabilized by glycosylation or the addition of D-aminoacids at the N-terminus (Powell et al., 1993), the relatively slow rate of degradation observed in plasma may be due, at least in part, to the steric protection afforded by the PS moiety at the N-terminus, which may prevent the peptide from being degraded by aminopeptidases. Moreover, no oxidation into a porphyrin, that would present less interesting photophysical properties than the corresponding chlorin, could be observed on the PS moiety in any experiment, as assessed by MALDI-TOF analysis, contrary to what has been observed with other PSs (Laville et al., 2004).

In order to achieve higher selective delivery to the tumor neovessels, the *in vivo* stability of the peptide moiety of the conjugate may be increased through formulation and/or chemical modification. The first strategy encompasses the use of pegylated liposomes, which will impact on the pharmacokinetics of the PS and which may limit its accumulation in the reticuloendothelial system. For instance, Ichikawa *et al* encapsulated benzoporphyrin derivative monoacid ring A in pegylated liposomes modified with the H-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly-OH (APRPG) pentapeptide, which had earlier been isolated as a peptide specific to angiogenic endothelial cells. Pegylation of liposomes aims to avoid opsonization in the bloodstream, which is a prerequisite for the clearance of the liposomes by the reticuloendothelial system, such as liver and spleen (Ichikawa et al., 2005). The second method implies the generation of modified peptides with improved stability properties, through *e.g.* cyclisation, the use of D- amino acids and reduced peptide bonds

etc. (Adessi and Soto, 2002), for which the knowledge of the site of degradation on the peptide that were determined in this study is essential.

The ATWLPPR peptide has already been used in several *in vitro* and *in vivo* studies (Janssen et al., 2003; Rodrigues et al., 2003; Perret et al., 2004; Renno et al., 2004), but, to the best of our knowledge, none has reported on its instability. The present study draws attention to this potential problem with peptides, especially in the case of targeting strategies, and provides useful information for the choice of the DLI for *in vivo* assessments of photodynamic activity and for the future design of more stable molecules.

References

Adessi C and Soto C (2002) Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem* **9**:963-978.

Barberi-Heyob M, Vedrine PO, Merlin JL, Millon R, Abecassis J, Poupon MF and Guillemin F (2004) Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis. *Int J Oncol* **24**:951-958.

Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, Vassy R, Rouyre S, Kraemer M, Plouet J, Derbin C, Perret G and Mazie JC (2000) Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *Embo J* **19**:1525-1533.

Di Stasio B, Frochot C, Dumas D, Even P, Zwier J, Muller A, Didelon J, Guillemin F, Viriot ML and Barberi-Heyob M (2005) The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem* **40**:1111-1122.

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J and Peng Q (1998) Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* **90**:889-905.

Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1**:27-31.

Hopkinson HJ, Vernon DI and Brown SB (1999) Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma. *Photochem Photobiol* **69**:482-488.

Ichikawa K, Hikita T, Maeda N, Yonezawa S, Takeuchi Y, Asai T, Namba Y and Oku N (2005) Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochim Biophys Acta* **1669**:69-74.

Janssen AP, Schiffelers RM, ten Hagen TL, Koning GA, Schraa AJ, Kok RJ, Storm G and Molema G (2003) Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *Int J Pharm* **254**:55-58.

Jones HJ, Vernon DI and Brown SB (2003) Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br J Cancer* **89**:398-404.

Jori G and Fabris C (1998) Relative contributions of apoptosis and random necrosis in tumour response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn(II)-phthalocyanines. *J Photochem Photobiol B* **43**:181-185.

Konan YN, Gurny R and Allemann E (2002) State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **66**:89-106.

Laville I, Pigaglio S, Blais JC, Loock B, Maillard P, Grierson DS and Blais J (2004) A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells: a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. *Bioorg Med Chem* **12**:3673-3682.

McDonald JK and Barrette AJ (1980) *Mammalian proteases: A glossary and bibliography. 1. Endopeptidases*. Academic Press, London.

McDonald JK and Barrette AJ (1986) *Mammalian proteases: A glossary and bibliography. 2. Exopeptidases*. Academic Press, London.

Perret GY, Starzec A, Hauet N, Vergote J, Le Pecheur M, Vassy R, Leger G, Verbeke KA, Bormans G, Nicolas P, Verbruggen AM and Moretti JL (2004) In vitro

evaluation and biodistribution of a 99mTc-labeled anti-VEGF peptide targeting neuropilin-1. *Nucl Med Biol* **31**:575-581.

Powell MF, Stewart T, Otvos L, Jr., Urge L, Gaeta FC, Sette A, Arrhenius T, Thomson D, Soda K and Colon SM (1993) Peptide stability in drug development. II. Effect of single amino acid substitution and glycosylation on peptide reactivity in human serum. *Pharm Res* **10:**1268-1273.

Renno RZ, Terada Y, Haddadin MJ, Michaud NA, Gragoudas ES and Miller JW (2004) Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arch Ophthalmol* **122**:1002-1011.

Roberts R (2005) Lysosomal cysteine proteases: structure, function and inhibition of cathepsins. *Drug News Perspect* **18**:605-614.

Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, Gespach C and Emami S (2003) Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *Faseb J* **17**:7-16.

Rosenkranz AA, Jans DA and Sobolev AS (2000) Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol Cell Biol* **78**:452-464.

Schmidt U, Birngruber R and Hasan T (1992) [Selective occlusion of ocular neovascularization by photodynamic therapy]. *Ophthalmologe* **89**:391-394.

Schneider R, Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Gravier J, Guillemin F and Barberi-Heyob M (2006) Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **6**:469-488.

Sharman WM, van Lier JE and Allen CM (2004) Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* **56**:53-76.

Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, Pinel S, Viriot ML, Guillemin F and Barberi-Heyob M (2006) A peptide competing with VEGF(165) binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* **111**:153-164.

Tournaire R, Demangel C, Derbin C, Perret G, Mazie J-C, Plouet J and Vassy R (2001) Peptides blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis polynucleotides encoding said peptides and methods of use thereof. WO-01/72829.

Footnotes

This work was supported by the research funds of the French "Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités Lorrains".

This work was presented in part at the 97th annual meeting of the American Association for Cancer Research (Washington, DC, USA, April 1-5, 2006).

Send reprint request to:

Dr Muriel Barberi-Heyob, Laboratoire de Recherche du Centre Alexis Vautrin, CRAN UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France.

Legends for Figures

Figure 1. Molecular structure of one of the isomers of the peptide-chlorin conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR. Arrows indicate the two possible sites of double bond reduction during synthesis of a chlorin from a porphyrin, leading to a mixture of two isomers.

Figure 2. ***A.*** HPLC chromatogram of TPC-Ahx-ATWLPPR (retention time, 21 ± 3 min) after synthesis and purification, supplemented with *m*THPP (retention time, 5 ± 1 min) as an internal standard. The two peaks corresponding to TPC-Ahx-ATWLPPR arise from the presence of two isomers of the molecule, due to its asymmetrical character. ***B.*** MALDI-TOF mass spectrum of TPC-Ahx-ATWLPPR after synthesis and purification (theoretical mass = 1596.81 Da, experimental mass = 1596.83 Da).

Figure 3. ***A.*** Representative HPLC chromatograms of plasma extracts 2h (**1**) and 4h (**2**) after i.v. administration of 2.8 mg/kg of TPC-Ahx-ATWLPPR to glioma-bearing nude mice, supplemented with *m*THPP (retention time, 5 ± 1 min) as an internal standard. Peaks eluted at shorter times (12 ± 2 min) than TPC-Ahx-ATWLPPR (21 ± 3 min) appear on the chromatograms; their intensity increases as a function of the time after i.v. injection. For chromatographic conditions and extraction procedure, see Materials & Methods. ***B.*** MALDI-TOF mass spectrum of plasma extracts 4h p.i. ***C.*** *In vivo* plasma stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in nude mice. Plasma concentrations, determined by HPLC, of TPC-Ahx-ATWLPPR [circle] and TPC-Ahx-A [triangle] are expressed as a function of time p.i. (data points show the mean ± s.d., $n \geq 3$).

Figure 4. Representative HPLC chromatograms of human plasma extracts following 2h (**A**), 6h (**B**) and 24h (**C**) *in vitro* incubation at 37°C with TPC-Ahx-ATWLPPR (1 μM), supplemented with *m*THPP (retention time, 5 ± 1 min) as an internal standard.

Figure 5. ***A***. Biodistribution of the PSs (*black*, TPC-Ahx-ATWLPPR; *light grey*, degradation product) in different organs, according to time after i.v. administration of 2.8 mg/kg of TPC-Ahx-ATWLPPR in tumor-bearing mice. The data presented are the mean percentages of injected dose per gram of tissue (n=3 or 4). Values were not corrected for blood content of the tissue. Some of the high levels of PSs in liver and spleen are written in brackets at the top of the corresponding bars. PSs in plasma and endogenous molecules (*e.g.* heme) account for a non-negligible part of the PSs quantities estimated in the liver, a highly vascularized organ. ***B.*** MALDI-TOF mass spectrum of liver extract 24h p.i. of TPC-Ahx-ATWLPPR.

Figure 6. *In vitro* stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in EGM2 cell medium and inside HUVEC, after its incorporation. Amount of TPC-Ahx-ATWLPPR [circle] and TPC-Ahx-A [triangle], expressed as a function of time in EGM2 medium (***A***) and inside cells, after extraction (***B***), at different times, ranging from 1 to 24h (data points show the mean ± s.d., n=3).

Figure 7. MALDI-TOF mass spectrum of the PS incorporated by HUVEC, following incubation with 1 μM of TPC-Ahx-ATWLPPR during 24h, after extraction.

Figure 8. Confocal fluorescence microscopy images of HUVEC double stained with TPC-Ahx-ATWLPPR (*in red*) and an organelle probe (*in green*). ***A***. LysoTracker® Green-

stained lysosomes. ***B.*** BPC-stained Golgi apparatus. ***C.*** MitoTracker® Green-probed mitochondria. ***D.*** DiOC6-stained endoplasmic reticulum.

Figure 9. Percentage of degradation product inside HUVEC following incubation with TPC-Ahx-ATWLPPR (1 μM; 6h or 24h), with (*light grey bars*) or without (*white bars*) lysosomal peptidase inhibitor (ammonium chloride 30 mM) treatment, as assessed by reverse phase HPLC.

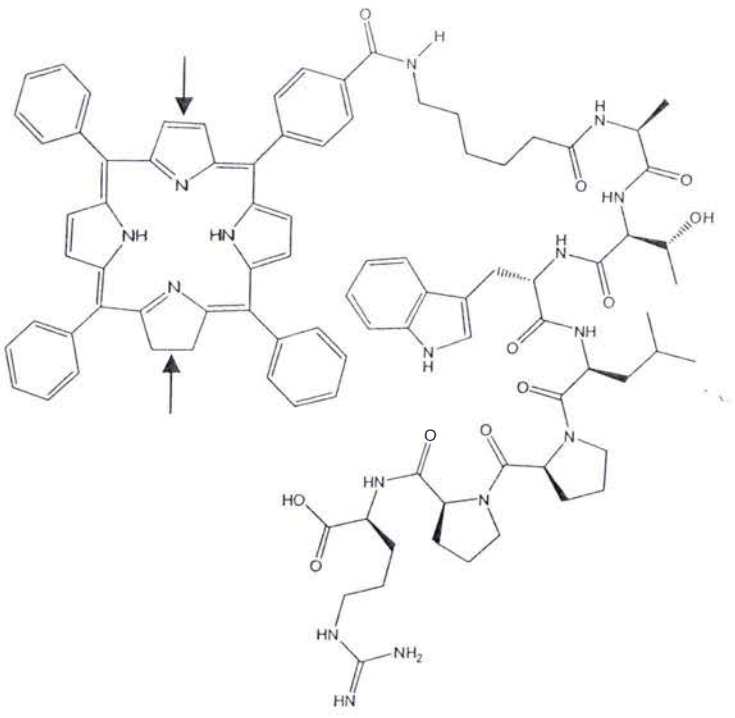
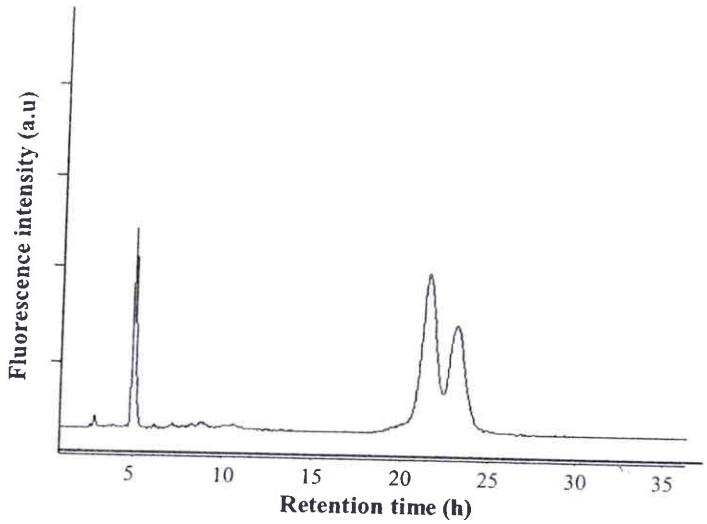


Fig. 1

A


Fluorescence intensity (a.u)
5
10
15
20
25
30
35
Retention time (h)

B

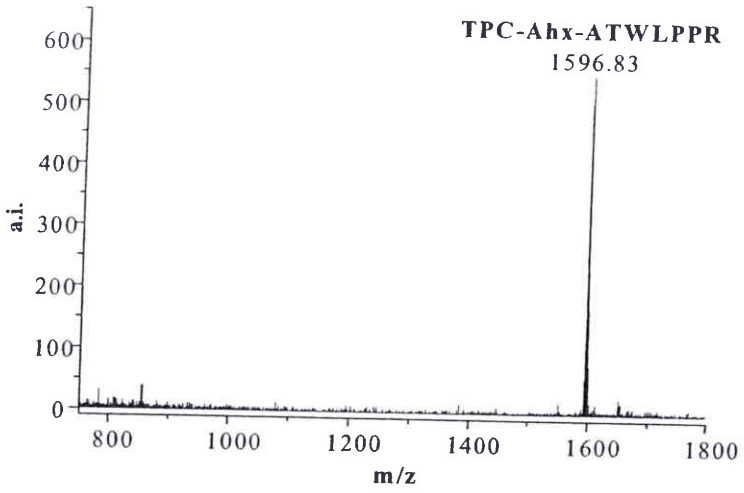
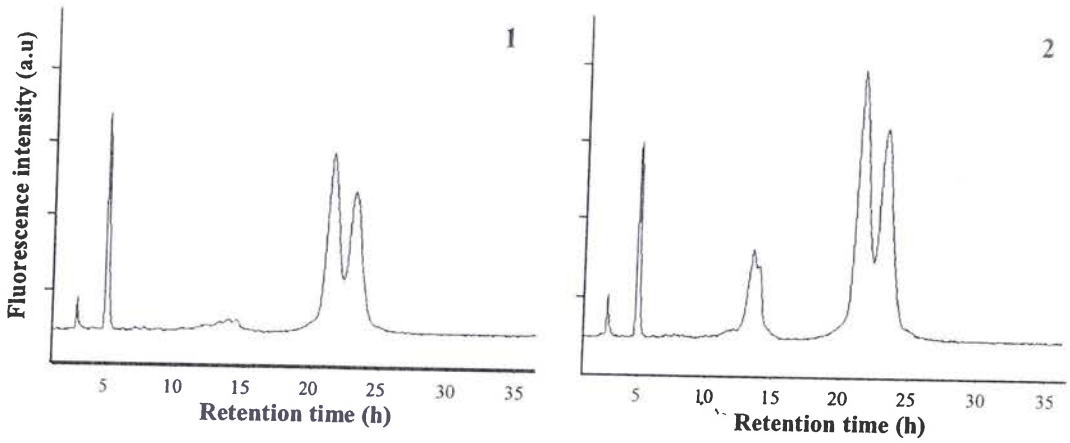
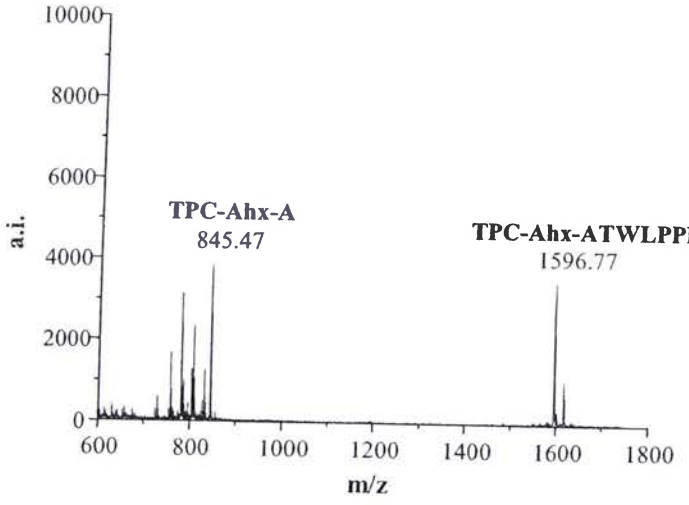

TPC-Ahx-ATWLPPR
1596.83
600
500
400
300
200
100
0
a.i.
800
1000
1200
1400
1600
1800
m/z

Fig. 2

A


Fluorescence intensity (a.u)
1
2
5
10
15
20
25
30
35
Retention time (h)
Retention time (h)

B


10000
8000
6000
4000
2000
0
a.i.
TPC-Ahx-A
845.47
TPC-Ahx-ATWLPPR
1596.77
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
m/z

C

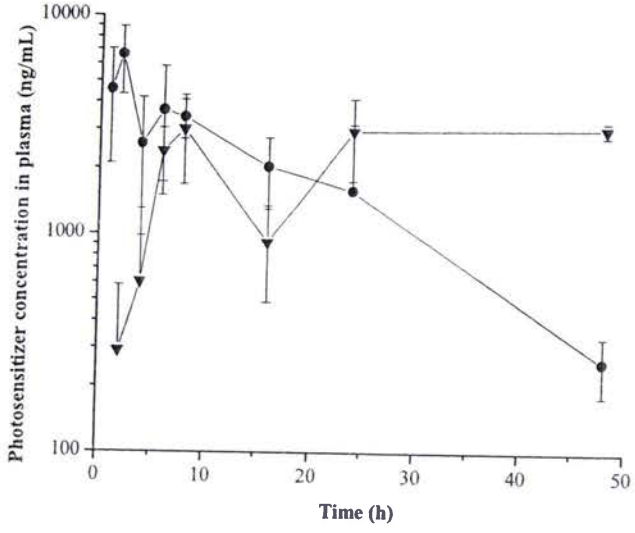

10000
1000
100
Photosensitizer concentration in plasma (ng/mL)
0
10
20
30
40
50
Time (h)

Fig. 3

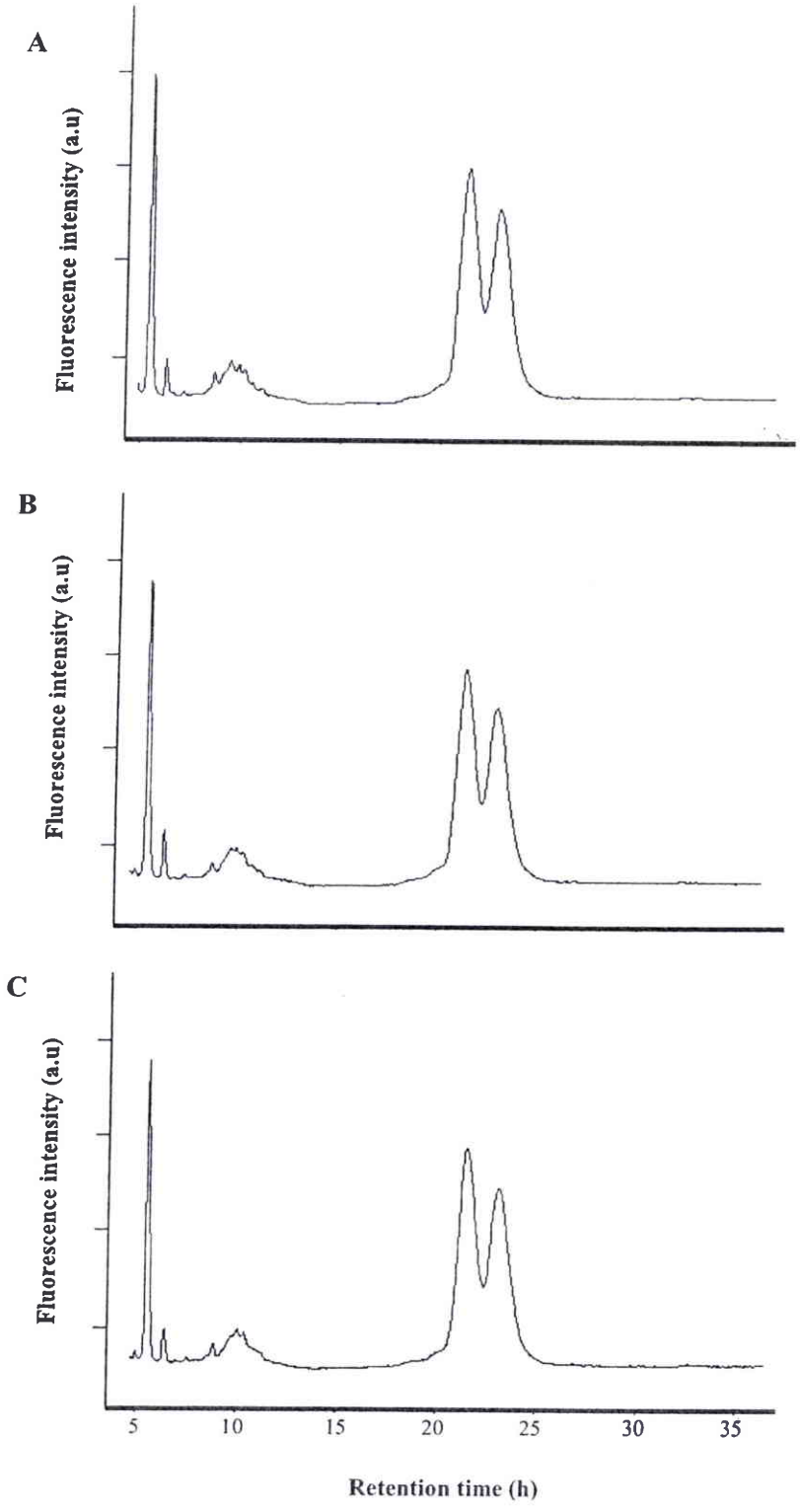
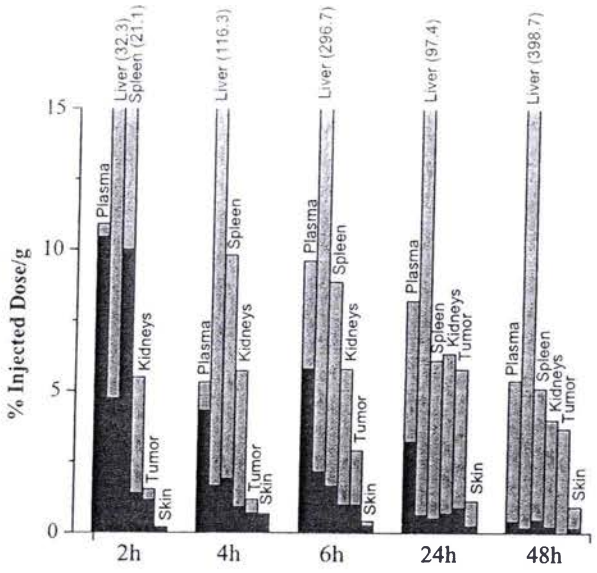

A
Fluorescence intensity (a.u)
B
Fluorescence intensity (a.u)
C
Fluorescence intensity (a.u)
5
10
15
20
25
30
35
Retention time (h)

Fig. 4

A


% Injected Dose/g
15
10
5
0
Liver (32.3)
Spleen (21.1)
Plasma
Kidneys
Tumor
Skin
Liver (116.3)
Spleen
Plasma
Kidneys
Tumor
Skin
Liver (296.7)
Spleen
Plasma
Kidneys
Tumor
Skin
Liver (97.4)
Spleen
Plasma
Kidneys
Tumor
Skin
Liver (398.7)
Spleen
Plasma
Kidneys
Tumor
Skin
2h
4h
6h
24h
48h

B

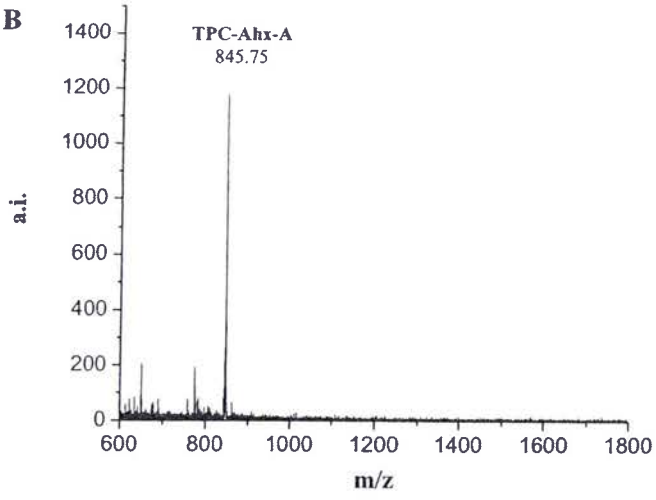

TPC-Ahx-A
845.75
a.i.
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
m/z

Fig. 5

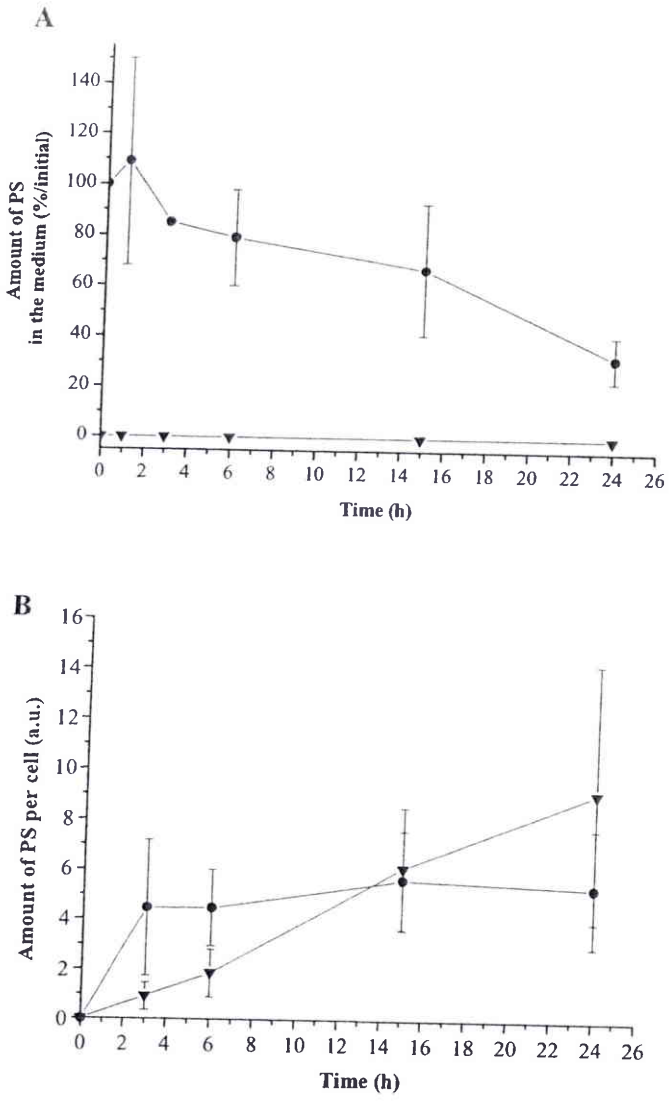

A
Amount of PS
in the medium (%/initial)
0
20
40
60
80
100
120
140
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26
Time (h)
B
Amount of PS per cell (a.u.)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24 26
Time (h)

Fig. 6

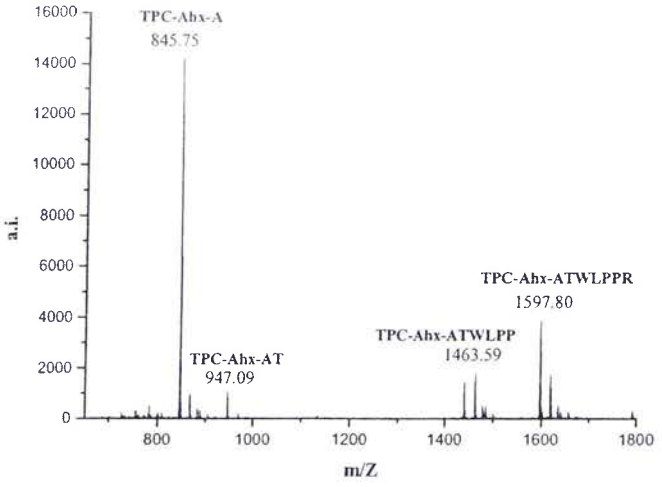

16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
a.i.
TPC-Ahx-A
845.75
TPC-Ahx-AT
947.09
TPC-Ahx-ATWLPP
1463.59
TPC-Ahx-ATWLPPR
1597.80
800
1000
1200
1400
1600
1800
m/Z

Fig. 7

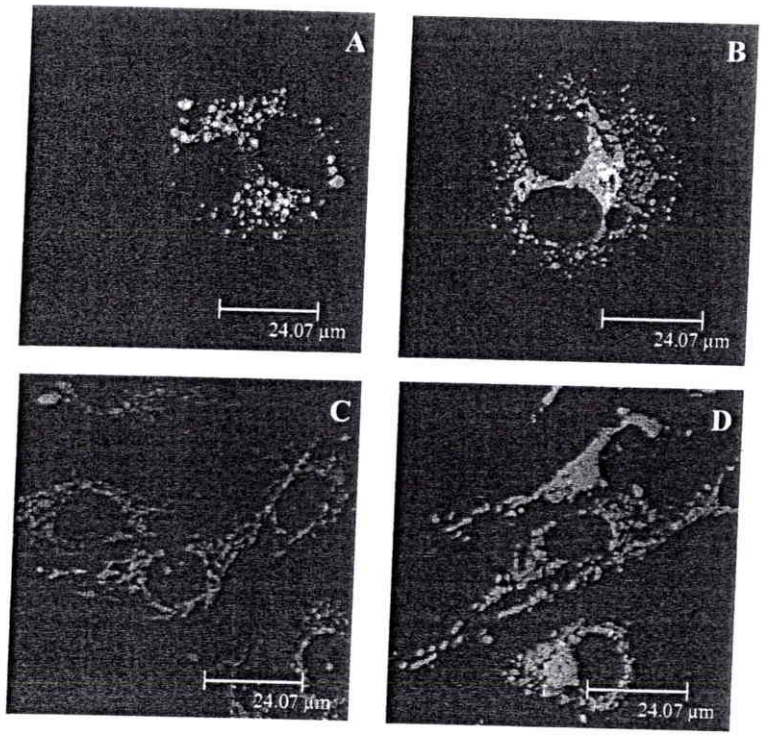


Fig. 8

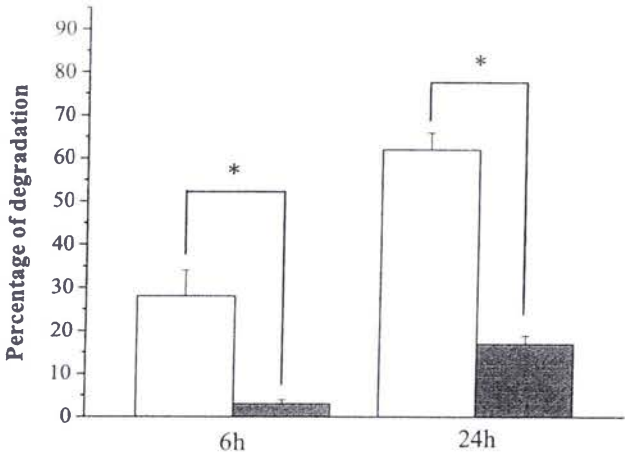


Fig. 9

ABSTRACT of PH.D DISSERTATION

(Marc Dodeller 2003-2007)

Photodynamic therapy (PDT), uses a photosensitizing molecule which is specially targeted to the tumoural tissue with some selectivity, light and oxygen, inducing the cell death by necrosis or apoptosis. The main characteristic of a good photosensitizer for PDT purpose it to absorb at a wavelength with deeply penetrates in tissues. 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) chlorin (m-THPC, Foscan®), a second generation photosensitizer absorbs at 650 nm, gives a high quantum yield of triplet formation, has a good cytotoxic oxygen species generation specially molecular singlet oxygen and exhibits no dark toxicity.

Firstly, our studies consist to detect by MALDI-TOF/MS, in intact HT29 cells (adenocarcinoma human colon), singlet oxygen generated by Foscan® (biolitec pharma ltd, Dublin, Irlande) irradiated by laser turned out to λ = 655 nm and the protein cells distribution after PDT treatment. A MALDI-TOF mass spectrometer was used to highlight ortho-benzoïlbenzene (o-BB) generated from the reaction between singlet oxygen generated by Foscan® during PDT treatment and 1,3-DiPhenylisoBenzoFurane (1,3-DPBF, a specific singlet oxygen quencher). This technique allows the following of the *in situ* behaviour of the photosensitizer and to detect the presence of singlet oxygen directly in intact HT29 cells.

Further to these studies, we work to the oxidative stress induced by PDT treatment on HT29 cells. These cells, incubated with Foscan®, are illuminated by laser (λ=632 nm). After 2D gel SDS-PAGE step in order to observe the protein distribution, proteomic approach is carried out by MALDI-FTICR mass spectrometry (9.4 T, Ion Spec Varian, California). We compare the proteins distribution of treated and untreated HT29 cells in order to highlight certain proteins implied in the PDT effect. Thanks to ImageMaster 2D Platinum software, we

are able to visualize under expression of some proteins. The proteinic finger printings are then characterized by MALDI-FT-ICR/MS and the first results indicate that proteins of Disulfide Isomerase family should be implied in PDT processes.

MALDI-TOF/MS and MALDI-FTICRMS (9.4 T) appear to be a sensitive and reliable analytical tool to add to UV/Visible and fluorescence spectroscopy for the mechanism of PDT understanding.

RESUME DE THESE

(Marc Dodeller 2003-2007)

La Thérapie Photodynamique (PDT) repose sur un agent photosensible disposant d'une grande affinité avec les tissus tumoraux, la lumière et l'oxygène, dont l'action commune induit la mort cellulaire soit par la nécrose, soit par l'apoptose. La caractéristique principale d'un bon photosensibilisateur, destinée à la PDT, est d'absorber à une longueur d'onde qui pénètre profondément dans les tissus. La 5.10.15.20 tetrakis (m-hydroxyphenyl) chlorine (m-THPC, Foscan®) est un photosensibilisateur de deuxième génération ne présentant pas de toxicité à l'obscurité et absorbant à 650 nm. De plus, son rendement quantique élevé de l'état triplet permet la génération d'espèces oxygénées cytotoxiques, notamment l'oxygène moléculaire singulet.

Nos premières études ont reposé sur la détection par MALDI-TOF/MS, dans des cellules HT29 intactes (adénocarcinome du colon humain), de l'oxygène moléculaire singulet produit par le Foscan® (Biolitec Pharma Ltd, Dublin, Irlande) irradiés à λ = 655 nm. Parallèlement à cette approche, une étude sur la distribution protéique de cellules HT29 intactes a été menée afin d'évaluer les répercussions du traitement PDT.
Un spectromètre de masse MALDI-TOF a été utilisé pour mettre en évidence l'ortho-benzoylbenzène (o-BB) produit de la réaction entre 1,3-DiPhenylisoBenzoFurane (1,3-DPBF, sonde spécifique de l'oxygène moléculaire singulet) avec l'oxygène moléculaire singulet généré par l'illumination du Foscan® pendant le traitement PDT. Cette technique permet non seulement le suivi du comportement du photosensibilisateur *in situ* mais également la détection directe de l'oxygène moléculaire singulet au sein de cellules HT29 intactes.

Suite à ces études, nous avons étudié le stress oxydatif induit aux cellules HT29 par le traitement de PDT. Ces cellules, incubées avec Foscan®, sont illuminées par laser (λ = 652 nm). Après l'utilisation d'une technique séparative adaptée, à savoir les gels 2D SDS-PAGE,

il a été possible d'observer la distribution des protéines des cellules, permettant d'initier des études protéomiques par la spectrométrie de masse de MALDI-FT-ICR (9.4 T, IonSpec. Varian, Californie, USA). L'analyse de la distribution de protéines de cellules HT29 traitées et non traitées a permis d'observer certaines protéines sensibles au traitement photodynamique. Grâce au logiciel ImageMaster 2D platinum, la visualisation de la sous expression de quelques protéines a été possible. La caractérisation de l'empreinte protéique a pu être effectué via MALDI-FT-ICR/MS et les premiers résultats indiquent que des protéines "impliquées" dans les processus de PDT appartiennent à la famille des disulfides isomérases. La spectrométrie de masse MALDI-TOF et MALDI-FT-ICR (9.4 T) renforcé la spectroscopie UV/Visible et de fluorescence s'avère être des techniques analytiques sensibles, fiables et incontournables pour la compréhension des mécanismes PDT.