



HAL
open science

Caractérisation par spectrométrie de masse d'extraits de millepertuis potentiellement utilisables en photodiagnostic et photothérapie des cancers : étude de leurs propriétés photochimiques en solution et en milieu cellulaire

Audrey Hecka

► To cite this version:

Audrey Hecka. Caractérisation par spectrométrie de masse d'extraits de millepertuis potentiellement utilisables en photodiagnostic et photothérapie des cancers : étude de leurs propriétés photochimiques en solution et en milieu cellulaire. Autre. Université Paul Verlaine - Metz, 2009. Français. NNT : 2009METZ052S . tel-01752925

HAL Id: tel-01752925

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01752925>

Submitted on 29 Mar 2018

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

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



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>

THESE

Ecole doctorale SESAMES

Présentée

A L'UNIVERSITE DE METZ

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Spécialité : Chimie

Par

Audrey HECKA

**Caractérisation par Spectrométrie de Masse d'extraits de
Millepertuis potentiellement utilisables en Photodiagnostic et
Photothérapie des cancers**

**Etude de leurs propriétés photochimiques en solution et en
milieu cellulaire**

20 mars 2009

Rapporteurs :

Catherine Lange, Professeur et directeur du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Université de Rouen

David Rondeau, Maître de Conférences HDR, Laboratoire de Chimie et Ingénierie Moléculaire, Université d'Angers

Examineurs :

Lina Bezdetsnaya-Bolotina, Professeur Associé, Centre Alexis Vautrin, Université Nancy I.

Isabelle Fournier, Maître de Conférences HDR, Laboratoire de Neuroimmunologie des Annélides, Université Sciences et Technologies de Lille

Anne Poutaraud, Ingénieur de Recherche, INRA, Colmar

Benoît Maunit, Professeur, Institut de Chimie Organique et Analytique, Université d'Orléans.

Directeur de thèse :

Jean-François Muller, Professeur émérite, Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Université de Metz.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de l'Université Paul Verlaine à Metz. Je tiens ici à exprimer mes remerciements à tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à l'avancée de ces travaux, que ce soit sur un plan scientifique ou humain.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le Professeur Jean-François Muller, pour m'avoir accueillie au sein de son équipe et fait découvrir le métier de chercheur ; son enthousiasme communicatif et ses idées novatrices sont un moteur pour ses étudiants.

Je souhaite remercier avec un intérêt tout particulier Monsieur Benoît Maunit, désormais Professeur à l'Université d'Orléans, avec qui j'ai eu un réel plaisir à travailler, pour ses qualités humaines et scientifiques, son appui et ses conseils.

Je remercie vivement Madame Catherine Lange, Professeur à l'Université de Rouen, et Monsieur David Rondeau, Maître de Conférences à l'Université d'Angers, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ce travail en cette période de rentrée déjà très chargée.

Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à Madame Anne Poutaraud, Ingénieur de Recherche à l'INRA de Colmar, non seulement pour avoir accepté de juger ce travail en tant qu'examinatrice, mais également pour l'avoir initié en nous fournissant le Millepertuis et en partageant avec nous ses connaissances étendues sur les métabolites secondaires de cette fleur.

Que Madame Lina Bolotine soit ici remerciée pour sa participation à ce jury et pour l'accueil chaleureux qu'elle et les membres de l'équipe du CAV m'ont toujours réservé.

Un grand merci à Madame Isabelle Fournier pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Ma reconnaissance va également à tous les enseignants-chercheurs, actuels ou anciens, du LSMCL, Madame Rachel Chety, Monsieur le Professeur Eric Millon, Monsieur le Professeur Jean-Jacques Gaumet, Monsieur Vincent Carré, pour leurs encouragements. Un grand merci à Frédéric Aubriet pour m'avoir expliqué avec patience de nombreuses notions de Spectrométrie de Masse...

Je remercie également Messieurs Gabriel Krier et Lionel Vernex-Loset, respectivement Ingénieur de Recherche et Ingénieur d'Etudes, pour leur assistance technique et leur sympathie.

J'adresse mes plus sincères remerciements à Fidélia, notre secrétaire, pour avoir été comme une seconde mère pour moi pendant ces années de Thèse. Au-delà de son assistance administrative, ce sont ses qualités humaines qui m'ont permis de tenir le coup dans les moments difficiles. Son franc-parler et ses tirades féministes manqueront au LSMCL...

Enfin, mes derniers remerciements s'adressent à tous les étudiants qui ont apporté d'une façon ou d'une autre leur pierre à cet édifice : Natacha (une femme et une chercheuse exceptionnelle), Jérôme (le juke-box humain), Marc (jamais stressé...un grand mystère pour moi !), Sébastien (le plus beau de tous les kikis), et Paul (et sa roulette de souris magique). Je ne saurais oublier les inimitables et indispensables "p'tits kneckes" : Didier (le "Président" officiellement mais "Didi" pour les intimes), David (qui eût cru qu'un portugais me ferait mourir de rire en imitant les asiatiques), Nicolas (le seul homme dont les manifestations gastriques me font marrer), Grégory (toujours fourré chez sa mamie), Cyril (l'homme aux pizzas malodorantes) et Junien (un jour il faudra que tu te lèves le matin...). Leur humour - toujours d'une grande finesse !-, et leur inconditionnelle bonne humeur m'ont été d'un grand secours durant ces dernières semaines. Qu'ils restent toujours aussi soudés, et à bientôt pour de nouvelles parties de Counter Strike (qui sait une fois docteur je jouerai peut-être moins mal...).

A mes parents et à mon frère,

SOMMAIRE

Introduction générale.....	1
----------------------------	---

Chapitre I : Hypéricine et Thérapie Photodynamique

INTRODUCTION.....	5
I. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PDT)	6
I. A. Intérêt	6
I. B. Mécanismes	6
I. C. Sources lumineuses utilisées.....	11
I. D. Agents photosensibles utilisés.....	11
II. L'HYPERICINE	12
II. A. Occurrence de l'hypéricine et des phénanthropérylènes quinones	12
II. B. Voies de synthèse possibles	15
II. C. Propriétés physico-chimiques	17
II. C. 1. Propriétés acido-basiques	17
II. C. 2. Absorption, fluorescence, phosphorescence et production d'oxygène singulet.....	19
III. UTILISATION DES PROPRIETES PHOTOCHIMIQUES DE L'HYPERICINE EN ONCOLOGIE.....	22
III. A. Historique	22
III. B. Mode d'action	23
III. B. 1. Influence de l'oxygène	23
III. B. 2. Internalisation de l'agent photosensible	23
III. B. 3. Type de mort cellulaire induit.....	25
III. C. Application : photodiagnostic et photothérapie des cancers de la vessie.....	27
III. C. 1. Thérapie photodynamique et cancer de la vessie.....	27
III. C. 2. Diagnostic par fluorescence et cancer de la vessie	27
III. C. 3. Apport de l'hypéricine pour le photodiagnostic et la photothérapie des cancers de la vessie....	28
III. D. Restrictions.....	29
CONCLUSIONS	34

Chapitre II : Le Millepertuis

INTRODUCTION :.....	35
I. HISTORIQUE DE L'UTILISATION DU MILLEPERTUIS ET DESCRIPTION DE LA PLANTE	36

II. COMPOSITION CHIMIQUE	37
II. A. L'huile essentielle	37
II. B. Les métabolites secondaires.....	37
II. B. 1. Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique.....	37
II. B. 2. Les xanthones.....	38
II. B. 3. Les polyphénols	38
II. B. 4. Les caroténoïdes	43
II. B. 5. Les phloroglucinols	44
II. B. 6. Les naphtodianthrones	47
III. EXTRACTION DU MATERIEL VEGETAL	51
IV. FORMULATIONS DE MILLEPERTUIS.....	52
V. STABILITE DES FORMULATIONS DE MILLEPERTUIS.....	53
V. A. Stabilité du matériel végétal.....	53
V. B. Stabilité des solutions	55
VI. EFFETS COOPERATIFS ENTRE LES COMPOSES PRESENTS DANS LE MILLEPERTUIS.....	56
VI. A. Propriétés antidépressives de la plante.....	56
VI. B. Cytotoxicité de l'hyperforine	57
VI. C. Solubilité aqueuse de l'hypericine	57
VII. PROPRIETES PHOTOSENSIBILISATRICES DU MILLEPERTUIS	58
CONCLUSIONS	60

Chapitre III : Matériels et méthodes

INTRODUCTION.....	61
I. LE MATERIEL VEGETAL ET LES COMPOSES DE REFERENCE	62
I. A. Mode de culture des fleurs de Millepertuis.....	62
I. B. Protocole d'extraction des fleurs	62
II. LA QUANTIFICATION DES HYPERICINES DANS LES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS.....	63
II. A. Par spectrophotométrie UV-Visible.....	63
II. B. Par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection UV-Visible (CLHP-UV).....	67
III. LA SPECTROMETRIE DE MASSE	68
III. A. Le MALDI-TOF.....	68
III. A. 1. La Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI).....	68
III. A. 2. La Spectrométrie de Masse à Temps de Vol.....	71
III. B. La Spectrométrie de Masse Très Haute Résolution	74
III. B. 1. Les techniques d'ionisation utilisées	74
III. B. 1. i. Le ProMALDI.....	74

III. B. 1. ii. L'Ionisation par Electrospray	74
III. B. 2. La FTICRMS	78
III. B. 2. i. Principe et description de l'appareillage	78
III. B. 2. ii. Performances	83
III. B. 2. iii. Séquence typique	84
III. B. 3. Techniques de fragmentation	85
III. B. 3. i. SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation-Collision-Induced Dissociation)	85
III. B. 3. ii. L'IRMPD (Infrared MultiPhoton Dissociation)	86
IV. L'ETUDE DES PROPRIETES DE L'EXTRAIT DE MILLEPERTUIS	87
IV. A. La quantification de la production d'oxygène moléculaire singulet	87
IV. B. L'activité de l'extrait de Millepertuis en milieu cellulaire	89
IV. B. 1. L'internalisation des naphthodianthrones par les cellules cancéreuses	89
IV. B. 1. i. Protocole d'incubation et d'extraction des cellules	89
IV. B. 1. ii. Microscopie de fluorescence	89
IV. B. 2. La photocytotoxicité des extraits de Millepertuis	91
IV. B. 2. i. L'illumination laser des cellules cancéreuses	91
IV. B. 2. ii. La détermination du taux de mortalité	91

Chapitre IV : Caractérisation par Désorption/Ionisation Laser couplée à la Spectrométrie de Masse des extraits de Millepertuis

INTRODUCTION :	93
I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'ANALYSE DES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS	94
II. ANALYSES PAR DESORPTION-IONISATION LASER (ASSISTEE PAR MATRICE)	98
II. A. Analyse du composé de référence par MALDI-TOF	98
II. B. Analyse d'un extrait méthanolique de Millepertuis par MALDI-TOF	100
II. B. 1. Mode négatif	100
II. B. 2. Mode positif	101
II. B. 2. i. Empreinte spectrale de la 2,5-DHB	102
II. B. 2. ii. Analyse de l'extrait méthanolique de Millepertuis	103
II. B. 2. iii. Identification des chlorophylles	104
II. B. 2. iv. Propositions de structures pour les espèces lipidiques	107
II. B. 3. Conclusions	109
II. C. Analyse de l'extrait par MALDI-FTICRMS	110
II. C. 1. Mode négatif	110
II. C. 2. Mode positif	111
II. C. 2. i. Spectre obtenu pour l'extrait méthanolique de Millepertuis	111
II. C. 2. ii. Caractérisation de l'espèce détectée à m/z 539	112
II. C. 2. iii. Identification des autres espèces présentes sur le spectre MALDI-FTICRMS	115
II. D. Analyse du matériel végétal in situ	118
II. D. 1. L'Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS)	118
II. D. 2. IMS sur les échantillons végétaux	120

II. D. 3. Analyses in situ et IMS sur les pétales de fleurs de Millepertuis	121
CONCLUSIONS DU CHAPITRE :	130

Chapitre V : Caractérisation par Ionisation Electrospray couplée à la Spectrométrie de Masse des extraits de Millepertuis

INTRODUCTION :	131
I. EMPREINTES SPECTRALES OBTENUES EN INJECTION DIRECTE	132
<i>I. A. Influence des tensions appliquées.....</i>	<i>132</i>
I. A. 1. Potentiel appliqué à l'extrémité de la pointe électrospray.....	132
I. A. 2. Différence de potentiel entre les cônes	133
I. A. 3. Influence de la valeur du shutter DC.....	136
<i>I. B. Influence de la durée d'accumulation dans Q3.....</i>	<i>136</i>
<i>I. C. Composition des extraits méthanoliques.....</i>	<i>137</i>
I. C. 1. Analyse en mode négatif.....	137
I. C. 2. Analyse en mode positif	140
I. C. 3. Bilan des espèces non identifiées.....	142
II. APPORT DE L'ANALYSE DE COMPOSES STANDARD ET DES TECHNIQUES DE FRAGMENTATION POUR L'IDENTIFICATION DES COMPOSES AU SEIN DES EXTRAITS	144
<i>II. A. Les hyperforines.....</i>	<i>144</i>
II. A. 1. Analyse par ESIFTICRMS du composé de référence.....	144
II. A. 2. Techniques de fragmentation	145
<i>II. B. Les flavonoïdes.....</i>	<i>151</i>
<i>II. C. Les lipides</i>	<i>153</i>
<i>II. D. Les naphthodianthrones.....</i>	<i>156</i>
II. D. 1. L'hypéricine	157
II. D. 2. La pseudohypéricine.....	163
II. D. 3. L'isopseudohypéricine	167
II. D. 4. La protohypéricine et la protopseudohypéricine	169
II. D. 5. Conclusion.....	170
CONCLUSIONS DU CHAPITRE :	172

Chapitre VI : Production d'oxygène moléculaire singulet par l'extrait de Millepertuis

INTRODUCTION :	175
-----------------------------	------------

I. ETUDE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LA PHOTOCHEMIE DE L'HYPERICINE, DE LA PSEUDOHYPERICINE ET DE LA PROTOHYPERICINE	176
II. MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'EVALUATION DE LA QUANTITE D'OXYGENE MOLECULAIRE SINGULET..	177
II. A. Données bibliographiques concernant les méthodes de détection de l'oxygène moléculaire singulet.....	177
II. B. Technique de détection choisie pour l'étude.....	178
II. C. Influence potentielle des antioxydants du Millepertuis sur la détection de l'oxygène moléculaire singulet.....	179
II. D. Choix des paramètres expérimentaux	180
II. E. Validation et mise en évidence des limites du protocole.....	181
III. EVALUATION DE LA PRODUCTION D'OXYGENE MOLECULAIRE SINGULET PAR LES HYPERICINES, PURES EN SOLUTION ETHANOLIQUE ET PAR UN EXTRAIT DE MILLEPERTUIS.....	185
III. A. Préparation de l'extrait de Millepertuis.....	185
III. B. Préparation de la protohypéricine.....	185
III. B. 1. Intérêt : Ratio protopigments/pigments des extraits de Millepertuis	185
III. B. 2. Synthèse de la protohypéricine.....	187
III. C. Résultats.....	188
CONCLUSIONS DU CHAPITRE :	192

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

INTRODUCTION :.....	193
I. CULTURES CELLULAIRES	194
I. A. Choix de la lignée cellulaire étudiée	194
I. B. Mode de culture	195
II. STABILITE ET ETAT D'AGREGATION DU PHOTOSENSIBILISANT DANS LES DIFFERENTS MILIEUX D'INCUBATION POSSIBLES	195
II. A. Etat d'agrégation des composés de référence dans un milieu d'incubation ne contenant pas de protéines.....	195
II. B. Influence de l'état d'agrégation de l'hypéricine sur son internalisation par les cellules.....	196
III. CYTOTOXICITE DES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS.....	197
III. A. Choix de la concentration en hypéricines pour les incubations.....	197
III. B. Préparation d'extraits dépourvus d'hyperforine	198
III. C. Choix du protocole	201
III. C. 1. Type de test de cytotoxicité	201
III. C. 2. Limitations concernant les extraits végétaux	202
III. C. 3. Durée d'incubation.....	202
III. C. 4. Extraits de Millepertuis testés	203
III. D. Résultats et discussion.....	203

IV. ABSORPTION DES COMPOSES PHOTOACTIFS PAR LES CELLULES CANCEREUSES	206
IV. A. <i>Microscopie de fluorescence</i>	206
IV. B. <i>Protocole d'extraction des hypéricines et analyse des lysats par spectroscopie UV-Vis</i> .	207
IV. B. 1. Cinétiques d'absorption de l'hypéricine et d'un extrait de Millepertuis réalisé directement dans le DMSO.....	207
IV. B. 2. Comparaison des cinétiques d'internalisation de l'hypéricine et de la pseudohypéricine.....	209
IV. B. 3. Internalisation de la pseudohypéricine sur les lignées cellulaires MCF7, HT29 et A549.....	211
IV. B. 4. Influence de l'hypéroside et de la procyanidine B2 sur l'internalisation de l'hypéricine	213
IV. B. 5. Influence de l'hyperforine	215
IV. B. 6. Influence du solvant d'extraction du Millepertuis sur l'internalisation des composés photoactifs	215
IV. B. 7. Conclusions	216
V. CARACTERISATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DES COMPOSES INTERNALISES PAR LES CELLULES AY-27 MISES EN CONTACT AVEC LES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS.....	218
VI. EFFICACITE PHOTODYNAMIQUE IN VITRO DES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS	225
VI. A. <i>Protocole d'évaluation</i>	225
VI. B. <i>Comparaison de la phototoxicité de l'hypéricine et de la pseudohypéricine</i>	227
VI. C. <i>Phototoxicité des extraits de Millepertuis</i>	230
VI. D. <i>Conclusions</i>	231
CONCLUSIONS :	233
Conclusion générale.....	237
Perspectives.....	241
Listes des figures et des tableaux	
Annexes	

Introduction générale

Introduction générale

La thérapie photodynamique associe une lumière de longueur d'onde spécifique à un médicament appelé agent photosensibilisateur sensible à cette même longueur d'onde. Celui-ci peut être injecté dans la circulation sanguine ou appliqué localement. Dans l'idéal, il se localise préférentiellement dans les tissus cancéreux. Dans un deuxième temps, la zone tumorale est illuminée par la lumière visible, et le médicament produit de l'oxygène moléculaire singulet ou des espèces radicalaires toxiques pour la cellule tumorale. L'intérêt principal de ce mode thérapeutique réside dans le fait que les molécules utilisées ne sont pas mutagènes et que la toxicité reste limitée à la zone illuminée ; elle n'induit donc pas les effets secondaires que l'on connaît avec la chimiothérapie, à condition toutefois que le patient ne soit pas exposé au soleil. De plus, les propriétés d'émission de fluorescence des photosensibilisateurs peuvent permettre la détection de lésions néoplasiques, sous réserve d'une accumulation assez sélective dans ces tissus : il s'agit du photodiagnostic.

Parmi les agents photosensibles utilisés, l'hypéricine est un composé naturel initialement extrait de la fleur de Millepertuis. Ce composé a fait l'objet de très nombreuses investigations concernant ses propriétés photochimiques et son efficacité concernant la production de l'oxygène moléculaire singulet toxique a rapidement conduit à son évaluation pour la photothérapie ainsi que pour le photodiagnostic de certains cancers, et notamment ceux de la vessie pour lesquels elle s'est avérée particulièrement intéressante. L'objectif de notre travail a été d'évaluer les extraits de Millepertuis en tant que formulation possible de l'hypéricine, notamment en caractérisant ces extraits par Spectrométrie de Masse, en mesurant leur capacité à produire de l'oxygène singulet et en effectuant des essais préliminaires en milieu cellulaire.

Dans ce contexte, notre étude s'articule autour de trois axes :

- i) Nous avons tout d'abord caractérisé un extrait méthanolique de Millepertuis par diverses techniques de spectrométrie de masse faisant intervenir les méthodes d'Ionisation par Désorption Laser et par Electronébullition. Il est à noter que ces techniques n'ont jamais été employées pour l'analyse de ces extraits, et que leur utilisation a nécessité la mise au point de méthodes analytiques spécifiques.
- ii) Dans un second temps, nous avons mis au point un protocole permettant l'évaluation de la production d'oxygène moléculaire singulet par les agents photosensibilisateurs susceptibles d'intervenir dans les mécanismes de phototoxicité des extraits de Millepertuis.

Introduction générale

- iii) Dans une dernière partie, nous avons effectué les premiers essais en milieu cellulaire, en nous focalisant sur l'étape d'internalisation des molécules photosensibilisatrices, la cytotoxicité des extraits ainsi que leur photocytotoxicité envers les cellules de cancer de la vessie AY-27.

Le mémoire présenté s'articulera autour de six chapitres et sera organisé de la façon suivante :

Après un bref rappel des atouts et mécanismes de la Thérapie Photodynamique (PDT), nous parlerons dans le **Chapitre I** de l'occurrence de l'hypéricine, de ses propriétés photochimiques ainsi que des méthodes de synthèse existant pour ce composé. Enfin, nous mettrons en avant les mécanismes d'action principaux de ce composé en milieu cellulaire et son intérêt dans le cadre du photodiagnostic et de la photothérapie, notamment en ce qui concerne les lésions de la vessie.

Le **Chapitre II** sera consacré aux propriétés de la fleur de Millepertuis. Nous exposerons de façon succincte les caractéristiques de ce végétal, puis nous effectuerons un rappel des familles de molécules entrant dans sa composition en mettant l'accent sur les propriétés qui pourraient s'avérer importantes dans le cadre de notre étude, notamment les effets photocytotoxiques, cytotoxiques et antioxydants. Nous aborderons également les différentes méthodes d'extraction envisageables pour le matériel végétal et leur influence sur la composition des extraits, puis effectuerons une synthèse des données disponibles concernant la stabilité des extraits sous leurs différentes formes. Enfin, nous décrirons les effets de synergie déjà observés au sein de ces extraits et effectuerons un bilan concernant les données disponibles sur leur phototoxicité.

Les techniques analytiques et protocoles employés au cours de cette étude seront décrits dans le **Chapitre III**. La spectroscopie d'absorption UV-Visible a permis la normalisation des extraits en hypéricines. L'analyse qualitative des extraits de Millepertuis a été réalisée en MALDI-TOF, MALDI-FTICRMS et ESI-FTICRMS. La quantification de l'oxygène moléculaire singulet sous illumination avec un laser pulsé Nd-YAG à colorants ($\lambda=591$ nm) a été évaluée via le suivi par GC-MS de la dégradation de la sonde moléculaire 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF) en milieu éthanol. Nous préciserons également dans ce chapitre les protocoles utilisés pour les études en milieu cellulaire.

Introduction générale

Le **Chapitre IV** fera l'objet des analyses que nous avons effectuées sur un extrait méthanolique de Millepertuis, avec les techniques de Désorption Laser couplée à la Spectrométrie de Masse du Laboratoire. Les analyses MALDI ($\lambda=337$ nm) feront d'abord l'objet d'optimisation sur composé standard avant d'être appliquées à l'extrait. La même analyse conduite en MALDI-FTICRMS ($\lambda=355$ nm) permettra d'une part de mettre en avant l'influence de la longueur d'onde d'ionisation sur l'empreinte spectrale obtenue, d'autre part de confirmer certaines attributions faites par MALDI-TOF grâce à la très haute résolution de la FTICRMS. Le potentiel de la technique d'ionisation MALDI pour l'analyse des métabolites directement au niveau du végétal sera également évalué.

Le **Chapitre V** sera dévolu aux analyses conduites en ESI-FTICRMS. L'influence des paramètres analytiques principaux sera étudiée afin de se placer dans les conditions optimales permettant d'obtenir le maximum d'informations sur la composition des extraits. Afin de pouvoir identifier la totalité des signaux, l'analyse de composés standard viendra préciser leur comportement, tandis que l'utilisation des techniques de dissociation IRMPD et SORI-CID permettra de mettre en évidence de processus de fragmentation spontanée des composés lors de l'analyse des extraits de Millepertuis. Par ailleurs, ces techniques de dissociation seront utilisées afin d'obtenir des empreintes spectrales spécifiques de composés jugés d'intérêt dans l'étude et d'en préciser les voies de fragmentation encore non décrites dans la littérature.

Dans le **Chapitre VI**, nous nous attèlerons à quantifier la production d'oxygène singulet des différents photosensibilisateurs en présence, à savoir l'hypéricine, la pseudohypéricine, la protohypéricine et l'extrait de Millepertuis. Ces expériences feront intervenir l'utilisation d'une sonde réagissant spécifiquement avec l'oxygène moléculaire singulet, dont le taux d'oxydation sera mesurée par GC-MS.

Enfin, des études préliminaires menées en milieu cellulaire seront présentées dans le **Chapitre VII**. Les cinétiques d'internalisation des composés photoactifs y seront détaillées dans différentes conditions, ainsi que la localisation intracellulaire obtenue pour ces composés. L'ESI-FTICRMS sera utilisée afin d'analyser des lysats de ces cellules incubées avec les extraits de Millepertuis. Enfin, nous mesurerons la cytotoxicité et la phototoxicité de divers extraits afin de fournir des pistes qui permettront de déterminer quel type d'extrait est le plus adapté à une utilisation en photodiagnostic et photothérapie.

Chapitre I

Hypéricine et Thérapie Photodynamique

INTRODUCTION	5
I. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE (PDT)	6
I. A. Intérêt	6
I. B. Mécanismes	6
I. C. Sources lumineuses utilisées	11
I. D. Agents photosensibles utilisés	11
II. L'HYPERICINE	12
II. A. Occurrence de l'hypéricine et des phénanthropérylènes quinones	12
II. B. Voies de synthèse possibles	15
II. C. Propriétés physico-chimiques	17
II. C. 1. Propriétés acido-basiques	17
II. C. 2. Absorption, fluorescence, phosphorescence et production d'oxygène singulet	19
III. UTILISATION DES PROPRIETES PHOTOCHIMIQUES DE L'HYPERICINE EN ONCOLOGIE.....	22
III. A. Historique	22
III. B. Mode d'action	23
III. B. 1. Influence de l'oxygène	23
III. B. 2. Internalisation de l'agent photosensible	23
III. B. 3. Type de mort cellulaire induit	25
III. C. Application : photodiagnostic et photothérapie des cancers de la vessie.....	27
III. C. 1. Thérapie photodynamique et cancer de la vessie.....	27
III. C. 2. Diagnostic par fluorescence et cancer de la vessie	27
III. C. 3. Apport de l'hypéricine pour le photodiagnostic et la photothérapie des cancers de la vessie....	28
III. D. Restrictions.....	29
CONCLUSIONS	34

Introduction :

Le système chromophorique des phénanthropérylènes quinones leur confère de nombreuses propriétés, qui en font des pigments photosensibles et photosensibilisateurs, par le biais de substitutions multiples tant par des groupements hydroxyles que par des groupements alkyles. Parmi ces composés se trouve l'hypéricine (1,3,4,6,8,13-hexahydroxy-10,11-diméthylphénanthro[1,10,9,8-opqra]pérylene-7,14-dione), une molécule responsable du syndrome d'hypéricisme, sensibilité à la lumière pouvant générer des lésions cutanées graves aux sujets en absorbant oralement de grandes quantités. Les propriétés photosensibilisantes de l'hypéricine ont rapidement conduit à son étude en vue d'une utilisation pour le traitement photochimique du cancer,¹ appelée « thérapie photodynamique » (PDT).

Le principe de la PDT repose sur la rétention, par les cellules ou les tissus tumoraux, d'un agent chimique exogène appelé photosensibilisateur. Ces photosensibilisateurs sont administrés systémiquement ou topiquement. Ils ont pour propriété d'être non toxiques à l'obscurité et sont retenus plus ou moins sélectivement par les tissus malins. Selon la même hypothèse de spécificité et en se basant sur les propriétés d'émission de fluorescence du photosensibilisateur, l'analyse du signal de fluorescence permet la détection de lésions néoplasiques ; il s'agit du photodiagnostic. Les photosensibilisateurs deviennent toxiques après absorption lumineuse à une longueur d'onde appropriée, généralement dans le visible ou le proche du visible. Ainsi, l'illumination de la cible cancéreuse entraîne la formation de radicaux hydroxyles OH^\bullet ou d'oxygène moléculaire singulet $^1\text{O}_2$ (état excité de l'oxygène), ces oxydations induisant la mort des tissus.

Les données présentées dans ce chapitre visent, d'une part, à préciser l'ensemble des propriétés physico-chimiques de l'hypéricine ainsi que les principes généraux de la thérapie photodynamique, et d'autre part, à faire un point sur les données disponibles concernant l'utilisation de l'hypéricine dans le cadre de ce type de thérapie, en mettant clairement l'accent sur les avantages et les inconvénients qu'elle présente.

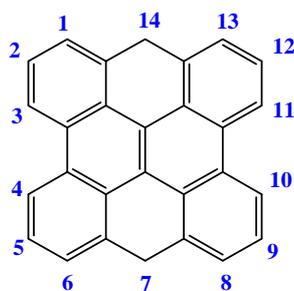


Figure I. 1 : Squelette générique des phénanthropérylènes quinones

¹ Hadjur, C., et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1995, **27**, 2, p 139

I. La thérapie photodynamique (PDT)

I. A. Intérêt

D'un point de vue clinique, la PDT présente de multiples avantages. Les agents photosensibles sont captés préférentiellement par les tissus cancéreux qui les éliminent plus lentement que les tissus normaux. Les gènes de la résistance multidrogue (MDR) n'ont pas d'influence sur l'élimination de ces photosensibilisateurs. De plus, le laser utilisé pour le traitement est dirigé sous contrôle de la vue ou à partir de renseignements obtenus par les systèmes d'imagerie modernes, il n'y a que peu de risque de perforation d'un organe creux et comparé à la radiothérapie, le rayonnement utilisé par la PDT, de moindre énergie, est inoffensif en tant que tel et non mutagène.² On peut ajouter que la PDT n'interdit pas un autre type de traitement anticancéreux. De plus, les photosensibilisateurs, en raison de l'illumination localisée et du confinement des espèces toxiques générées dans les cellules traitées, n'induit pas les effets indésirables des drogues utilisées en chimiothérapie (chute de cheveux, toxicité hématologique). Un des points essentiels est le faible coût du matériel utilisé, du moins comparé aux installations de radiothérapie. Enfin, plusieurs études montrent que la PDT, en induisant des modifications au niveau des membranes des cellules cancéreuses, réduit le rendement métastatique des cancers.³

I. B. Mécanismes

Lors d'une absorption de photon par un photosensibilisateur, trois chemins sont envisageables :

i) La première étape concerne l'excitation du photosensibilisateur (P) par émission lumineuse (Figure I. 2). L'absorption d'un photon 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 peut être promu à un état singulet excité (S_2). Puis en un temps très court, la molécule photosensible va subir un processus de conversions internes non-radiatif pour revenir à l'état singulet excité (S_1), dont la durée de vie réelle est évaluée en général entre 10^{-12} et 10^{-7} s, selon le type de molécule. Deux voies sont alors possibles pour retrouver l'état fondamental : l'une directe et l'autre par le passage d'un état triplet excité T_1 .

² Brown, S. B., *et al.*, *The Lancet Oncology*, 2004, **5**, 8, p 497

³ Rousset, N., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1999, **52**, 1-3, p 65

ii) A partir de 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, car la relaxation vibrationnelle est très rapide (10^{-13} à 10^{-12} s).

iii) Le photosensibilisateur peut aussi passer par une transition intersystème qui nécessite que la durée de vie de l'état singulet soit suffisamment longue. Celle-ci est relative à un processus non-radiatif durant lequel il y a une inversion de spin. Ces processus de désactivation sont souvent appelés processus de *quenching* ou d'inhibition de fluorescence ou de phosphorescence dans ce cas.

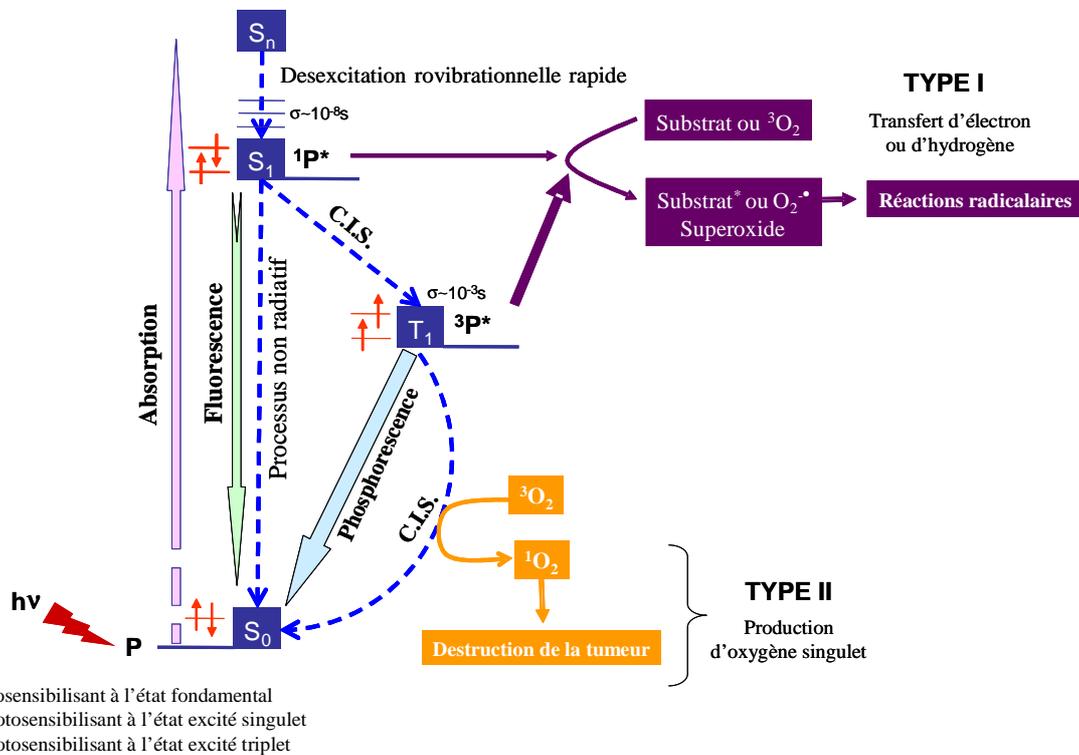


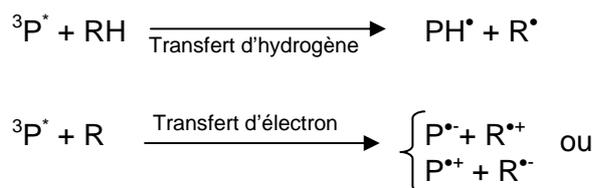
Figure I. 2 : Mécanisme photochimique de la Thérapie Photodynamique ($h\nu$: rayonnement lumineux, CIS : croisement inter-système)

On passe alors d'un état singulet excité S_1 à un état triplet excité T_1 qui correspond à l'état « photoactif » dont la durée de vie est plus longue que celle de l'état singulet et peut être comprise entre 10^{-3} et quelques secondes. Cet état « photoactif » est alors appelé un état métastable. Cette longue durée de vie laisse au photosensibilisateur le temps de réagir

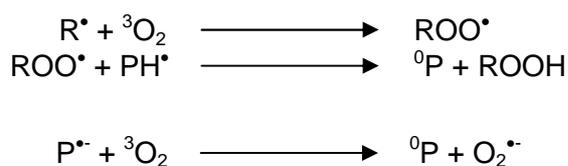
chimiquement avec une molécule environnante (réactions de type I et II) ; le photosensibilisateur perd ainsi son excédent d'énergie et revient à son état fondamental.

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, transition théoriquement interdite, est très lent. Le photosensibilisateur peut se désactiver par phosphorescence (émission radiative qui a lieu entre deux états de multiplicité différente) ou en réagissant avec son environnement selon deux types de mécanismes.

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 et le transfert d'électron génère une forme ionique chargée :



Après interaction avec l'oxygène moléculaire, ces produits fournissent des espèces réactives de l'oxygène comme des ions superoxydes $O_2^{\bullet-}$. Cette combinaison va aboutir à la formation de produits de photooxydation très puissants.



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 : l'oxygène moléculaire singulet (1O_2). L'oxygène moléculaire présente en effet deux états singulets $^1\Delta_g$ et $^1\Sigma_g^+$, dont les structures électroniques ne diffèrent que par la structure des orbitales π -antiliantes (Figure I. 3).

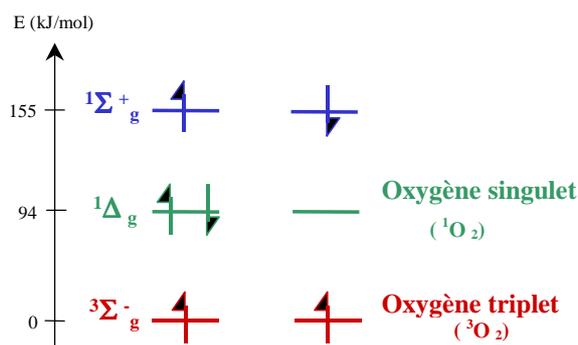
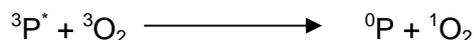


Figure I. 3 : Configurations électroniques de l'oxygène moléculaire (HOMO)

La transition de $^1\Delta_g$ vers $^3\Sigma_g^-$ est interdite (spin), par conséquent la durée de vie de l'état $^1\Delta_g$ est relativement longue. Cependant l'état $^1\Delta_g$ est métastable, donc la transition $^1\Delta_g \leftrightarrow ^3\Sigma_g^-$ à 1270 nm est observée dans les spectres d'absorption et d'émission. Le second état excité de l'oxygène est moins stable car sa transition vers l'état $^1\Delta_g$ est permise. Cette réaction n'est possible que si l'énergie de $^3PS_1^*$ est supérieure à l'énergie E_Δ de $^1O_2^*$, qui est de 94,5 kJ/mole.⁴



Une fois l'oxygène moléculaire singulet généré, il peut être désactivé par d'autres espèces et retourner à son état fondamental, selon deux types de procédés : l'un est physique et ne provoque ni consommation de l'oxygène, ni création d'un autre produit (Equation I. 1, k_p : constante de quenching physique), l'autre est chimique et conduit à la formation d'un nouveau produit (Equation I. 2, k_c : constante de quenching chimique).



L'oxygène moléculaire singulet formé dans les cellules peut diffuser sur de courtes distances (10-45 nm)⁵ et réagir avec des substrats environnants (RH) comme, par exemple, certains

⁴ Wilson, B. C., Van Lier, J. E., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1989, **3**, 3, p 459

⁵ Moan, J., Berg, K., *Photochemistry and Photobiology*, 1991, **53**, 4, p 549

acides aminés⁶ (notamment la cystéine, la méthionine, le tryptophan, la tyrosine et l'histidine, du fait de leur constante de réaction avec l'oxygène moléculaire singulet et de leur abondance) pour former des substrats oxydés (ROOH) très actifs. L'oxygène moléculaire singulet peut en effet oxyder des molécules non affectées par l'oxygène dans son état fondamental ; en effet le potentiel oxydoréducteur de l'oxygène dans son état singulet est supérieur d'environ 1V à celui de l'état triplet. De plus, l'oxygène moléculaire singulet est plus électrophile et réagit rapidement notamment avec les insaturations Carbone-Carbone, les sulfates et les amines, ainsi qu'avec les anions ; il est ainsi capable d'altérer un grand nombre de protéines comme de peroxyder les lipides insaturés membranaires.

L'ensemble de ces processus va provoquer l'inactivation d'un grand nombre de constituants cellulaires importants (mitochondries,⁷ lysosomes,⁸ noyau⁹), d'un point de vue structural mais aussi métabolique, ce qui entraîne la mort de la cellule.

Finalement, la réaction photochimique est oxygéno-dépendante dans les procédés liés à la PDT ; il est maintenant couramment admis que l'oxygène moléculaire singulet est l'agent toxique principal en PDT.

Pour cette raison l'efficacité des agents photosensibles est souvent calculée via leur rendement quantique en oxygène moléculaire singulet Φ_{Δ} , qui correspond au nombre de molécules d'oxygène moléculaire singulet générées suite à l'absorption d'un photon par l'agent photosensible ;

- la première étape consiste en la formation de l'état triplet du photosensibilisant, le rendement de cette étape est appelé rendement triplet (Φ_T) ;
- la seconde étape est la réaction de cet état triplet avec l'oxygène moléculaire singulet : la fraction d'état triplet capté par l'oxygène moléculaire singulet est notée f_T ;
- la probabilité de transfert d'énergie entre l'état triplet du photosensibilisant et l'oxygène moléculaire singulet est notée S_{Δ} .

Alors le rendement quantique en oxygène moléculaire singulet vaut $\Phi_{\Delta} = \Phi_T f_T S_{\Delta}$. Il est en général calculé par rapport à un photosensibilisant de référence, le plus souvent le Rose Bengal ($\Phi_{\Delta}=0,86$ dans l'éthanol¹⁰).

⁶ Wright, A., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2002, **76**, 1, p 35

⁷ Agostinis, P., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2004, **3**, p 721

⁸ Cirman, T., *et al.*, *Journal of Biological Chemistry*, 2003, **279**, 5, p 3578

⁹ Macecek, J., *et al.*, *Acta Medica*, 2004, **47**, 4, p 327

¹⁰ Gandin, E., *et al.*, *Photochemistry and photobiology*, 1983, **37**, 3, p 271

I. C. Sources lumineuses utilisées

Les lasers peuvent avoir, en fonction de leur longueur d'onde, puissance et durée d'émission, quatre types d'effets tissulaires : effet thermique (hyperthermie, coagulation et volatilisation), mécanique (la diffusion n'est pas progressive et on observe un confinement de la zone chauffée qui induit la formation d'un plasma dont l'expansion va se faire de façon brutale, sous forme d'une onde de choc), photoablatif (ablation pure de matériel sans lésion thermique sur les berges, comme le ferait un scalpel), ou photochimique.

La notion de dose de lumière délivrée lors d'une illumination laser est donc primordiale : un excès aura pour conséquence des effets secondaires importants, un sous-dosage aura pour résultante un sous-traitement. Ainsi, de la connaissance de la dose de lumière délivrée et absorbée au niveau de la cible tumorale, dépend l'efficacité du traitement photodynamique.

I. D. Agents photosensibles utilisés

Les mécanismes de la photosensibilisation sont dépendants de plusieurs variables : les caractéristiques photophysiques du photosensibilisateur, la localisation et la pharmacocinétique. Les propriétés idéales requises par le photosensibilisateur pour aboutir à une action photodynamique efficace sont :

- ✓ Pureté chimique, composition constante, facilité de synthèse ;
- ✓ Toxicité à l'obscurité faible, voire nulle ;
- ✓ Caractéristiques photophysiques intéressantes ;
 - coefficient d'extinction molaire élevé, à des longueurs d'onde situées dans la «fenêtre thérapeutique», c'est-à-dire décalé dans la région rouge du spectre de la lumière visible, voire dans le proche infrarouge (600-850 nm), afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption de lumière par le PS optimales ;
 - rendement quantique en oxygène singulet élevé (Φ_{Δ}) ; pour ce faire, le rendement quantique en état triplet du PS (Φ_{CIS_1}) doit être élevé ; la durée de vie de $^3\text{PS}_1^*$ doit être élevée, et son énergie suffisante pour permettre le transfert d'énergie à l'oxygène de façon la plus efficace possible (caractérisé par Φ_{TE}) ;
- ✓ Solubilité dans l'eau, afin de faciliter l'administration systémique ;
- ✓ Clairance élevée (volume apparent de plasma artériel totalement débarrassé d'une substance donnée par unité de temps) ;
- ✓ Sélectivité pour le tissu tumoral.

Afin de répondre à toutes ces conditions de nombreux efforts ont été réalisés pour développer des nouveaux photosensibilisateurs. Les agents photosensibilisateurs peuvent être classés en trois générations :

- la première génération de photosensibilisateur est représentée par l'hématoporphyrine (Hp) et l'hématoporphyrine dérivée (HpD). L'amélioration de l'HpD a conduit à la production du Photofrin®, qui est une fraction oligomérique de l'HpD, un photosensibilisateur plus actif, utilisé notamment dans le cadre du traitement du cancer de l'oesophage.¹¹ Même si le Photofrin® a contribué à l'essor de la PDT, il présente certains inconvénients notamment dus à sa complexité chimique (mélange de porphyrines), et à son coefficient d'épuration plasmatique faible (clairance : volume apparent (virtuel) de plasma artériel totalement débarrassé d'une substance donnée par unité de temps).¹²

- la seconde génération a vu le jour avec l'utilisation en PDT de photosensibilisateurs chimiquement purs. Ces agents thérapeutiques peuvent être aussi bien des porphyrines (Verteporfin®) que des chlorines (Temoporfin®)¹³ ou des bactérochlorines (bacteriochlorin a)¹⁴. Ils présentent une activité photochimique plus élevée et une augmentation de leur sélectivité pour les cellules tumorales, de part le choix de leurs substituants. Principalement dans le cas des chlorines, un des atouts de ces photosensibilisateurs est leur forte absorption dans la région spectrale du rouge et leur faible phototoxicité - voire nulle – en absence de lumière.

- enfin la troisième génération est apparue avec les modifications chimiques apportées aux porphyrines ou à leurs dérivés. Il est avéré que certaines propriétés des cellules cancéreuses, anatomiques, physiologiques ou biochimiques, sont très différentes de celles des cellules normales. Cette troisième génération a pour but d'induire une spécificité biologique en ciblant des molécules déjà synthétisées au cœur des cellules tumorales grâce au greffage d'un vecteur sur le photosensibilisateur, et ainsi de minimiser l'accumulation de l'agent photosensible au sein des cellules saines.

II. L'hypéricine

II. A. Occurrence de l'hypéricine et des phénanthropérylènes quinones

L'hypéricine est un pigment que l'on trouve non seulement dans des végétaux, mais aussi dans le règne animal.

¹¹ Wolfsen, H. C., *et al.*, *Mayo Clinic Procedures*, 2002, **77**, p 1176

¹² Dougherty, T., *et al.*, *Lasers in Surgery and Medicine*, 1990, **10**, 5, p 485

¹³ Sharman, W., *et al.*, *Drug Discovery Today*, 1999, **4**, 11, p 507

¹⁴ Schuitmaker, J., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1998, **47**, 2-3, p 211

Les quantités les plus importantes se trouvent dans quelques 300 espèces d'*Hypericum*, telles *Hypericum Perforatum* et *Hypericum Hirsutum*.¹⁵ Dans ces végétaux, on trouve l'hypéricine sous la forme de son bay-hypericinate (Figure I. 4), avec comme contre-ion le potassium.¹⁶ La quantité d'hypéricine dans l'*Hypericum* (en moyenne 0,05% en masse) varie en fonction de l'espèce, mais aussi en fonction de l'endroit où la plante pousse et de sa maturité.

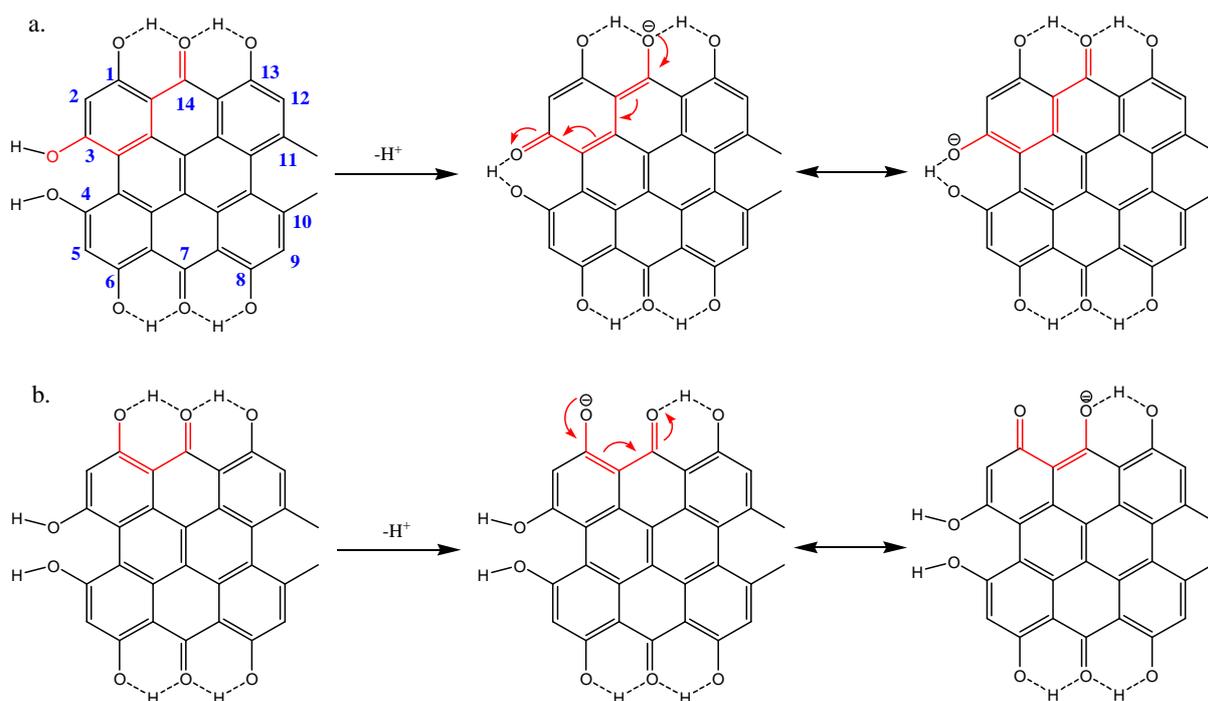


Figure I. 4 : Acidités bay (a.) et peri (b.) de l'hypéricine

Dans un premier temps, on a pensé que l'hypéricine était aussi présente dans une fougère des forêts d'eucalyptus australiennes, appelée *Dermocybe Austroveneta* ; cependant une isolation réalisée à l'abri de la lumière a uniquement permis d'obtenir le skyrin et la protohypéricine (Figure I. 5), molécules qui toutefois sont les ultimes intermédiaires de la biosynthèse de l'hypéricine.¹⁷

¹⁵ Kitanov, G. M., *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, **29**, 2, p 171

¹⁶ Falk, H., Schmitzberger, W., *Monatshefte fuer Chemie*, 1992, **123**, 8-9, p 731

¹⁷ Gill, M., et al., *Journal of Natural Products*, 1988, **51**, 6, p 1251

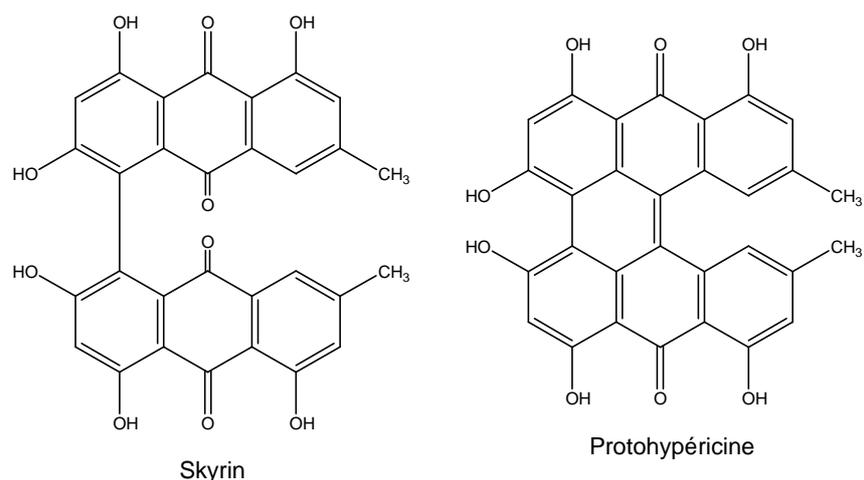


Figure I. 5 : Structure du skyrin et de la protohypéricine isolés de *Dermocybe Austroveneta*

Au sein du règne végétal, l'hypéricine est une molécule qui présente pour principale fonction de défendre la plante des insectes. Il a en effet été démontré que l'hypéricine jouait un rôle d'insecticide face à un des parasites du tabac, le *Manduca Sexta*.¹⁸ De plus, il est intéressant de noter que certains insectes, notamment le papillon *Platynota Flavedana*, ont développé des stratégies leur évitant l'issue fatale due à l'ingestion de Millepertuis, notamment en recourbant les pétales de la fleur afin de se trouver à l'ombre lors de l'ingestion des composés photosensibles.¹⁹

Concernant la présence de l'hypéricine dans le règne animal, on sait que la molécule est présente dans un insecte australien, le *Nipaecoccus aurilatanus*, et que dans le cas de cet organisme, la présence d'hypéricine n'est pas due à une cause exogène. Cependant le rôle de l'hypéricine chez cet animal est encore relativement peu connu, mais on suspecte que le composé protège l'organisme de la lumière en contribuant à la coloration foncée de son épiderme.

De nombreuses molécules possédant une structure similaire à l'hypéricine ont été découvertes dans divers organismes. Le plus proche est la pseudohypéricine, découverte en 1943 par Brockmann et Sanne,²⁰ dérivé ω -hydroxylé de l'hypéricine, que l'on trouve également dans la plupart des espèces d'*Hypericum*.

En 1943, le fagopyrin (Figure I. 6), a été isolé des pétales d'une variété de sarrasin de couleur rouge, le *Fagopyrum Esculentum*, une plante que l'on connaissait depuis 1833 par le fait qu'elle induisait elle aussi une photosensibilité chez les sujets en absorbant de grandes quantités. L'acide hypéricinique (Figure I. 6) résulte lui de l'oxydation d'un des groupements méthyle de l'hypéricine. On retrouve ce composé dans la coccinelle

¹⁸ Samuels, R., Knox, P., *Journal of Chemical Ecology*, 1989, **15**, 3, p 855

¹⁹ Sandberg, S. L., Berenbaum, M. R., *Journal of Chemical Ecology*, 1989, **15**, 875-885, p

²⁰ Brockmann, H., Sanne, W., *Naturwissenschaften*, 1953, **V40**, 17, p 461

australienne *Nipaecoccus aurilatanus*.²¹ Un autre dérivé comportant des chaînes carbonées plus longues a été découvert dans les *Lamprometra Palmata* et d'autres crinoïdes (invertébrés du groupe des échinodermes) apparentés.²²

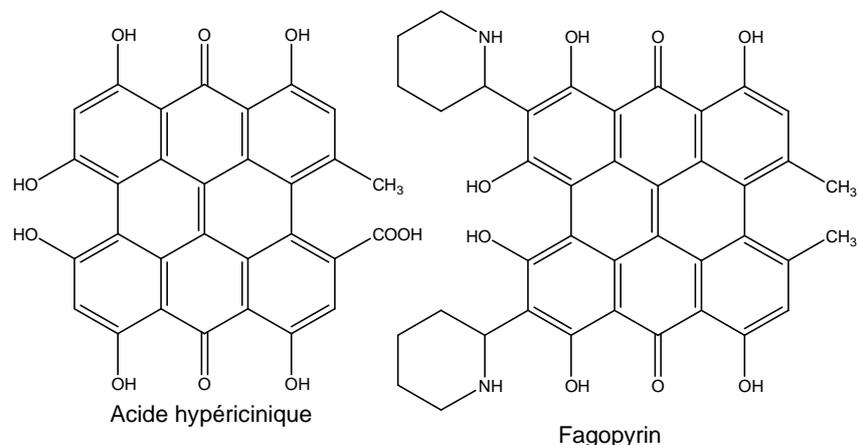


Figure I. 6 : Structures de l'acide hypéricinique et du fagopyrin

De même, une famille de dérivés bromés de l'hypéricine a été découverte dans un crinoïde des bas fonds marins, *Gymnocrinus Richeri*,²³ ainsi que des dérivés chlorés isolés de certains lichens tels que *Nephroma Laevigatum*.²⁴ Tous ces composés, ainsi que leurs précurseurs biosynthétiques, semblent agir en tant que protecteurs des organismes contre les prédateurs.

II. B. Voies de synthèse possibles

La difficulté d'extraire l'hypéricine des espèces d'*Hypericum* à un haut degré de pureté et les volumes de solvants très importants mis en œuvre dans ce type de procédés²⁵ ont rapidement conduit à l'élaboration de plusieurs voies de synthèse pour l'hypéricine. Initialement une méthode de synthèse totale²⁶ avait été proposée mais ses 12 étapes et son rendement global de 6-9% ont rapidement conduit à une réorientation vers des voies semi-synthétiques. La plus couramment utilisée est celle décrite en 1993 par Falk *et al.*²⁷ Elle consiste à extraire l'émodine de l'écorce de l'espèce *Cortex Frangulae*. L'émodine (Figure I. 7, 1.) est ensuite réduite en émodine anthrone (Figure I. 7, 2.). Ce composé est ensuite

²¹ Banks, H. J., *et al.*, *Australian Journal of Chemistry*, 1976, **29**, 7, p 1509

²² Rideout, J. A., Sutherland, M. D., *Australian Journal of Chemistry*, 1985, **38**, 5, p 793

²³ De Riccardis, F., *et al.*, *Journal of Organic Chemistry*, 1991, **56**, p 6781

²⁴ Cohen, P. A., Towers, G. H. N., *Phytochemistry*, 1996, **42**, p 1325

²⁵ Meruelo, D., *et al.*, *Medical Science*, 1988, **85**, p 5230

²⁶ Brockmann, H., *et al.*, *Chemische Berichte*, 1957, **90**, 10, p 2302

²⁷ Falk, H., *et al.*, *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 1993, **V124**, 3, p 339

dimérisé, et la protohypéricine (Figure I. 7, 3.) obtenue est précipitée dans l'hexane et purifiée sur silice puis sur Sephadex[®]. Son irradiation avec une lampe halogène permet sa photocyclisation en hypéricine (Figure I. 7, 4.). Le rendement, initialement d'environ 60%, a été récemment amélioré de 15% par l'utilisation de micro-ondes lors de la dimérisation.²⁸

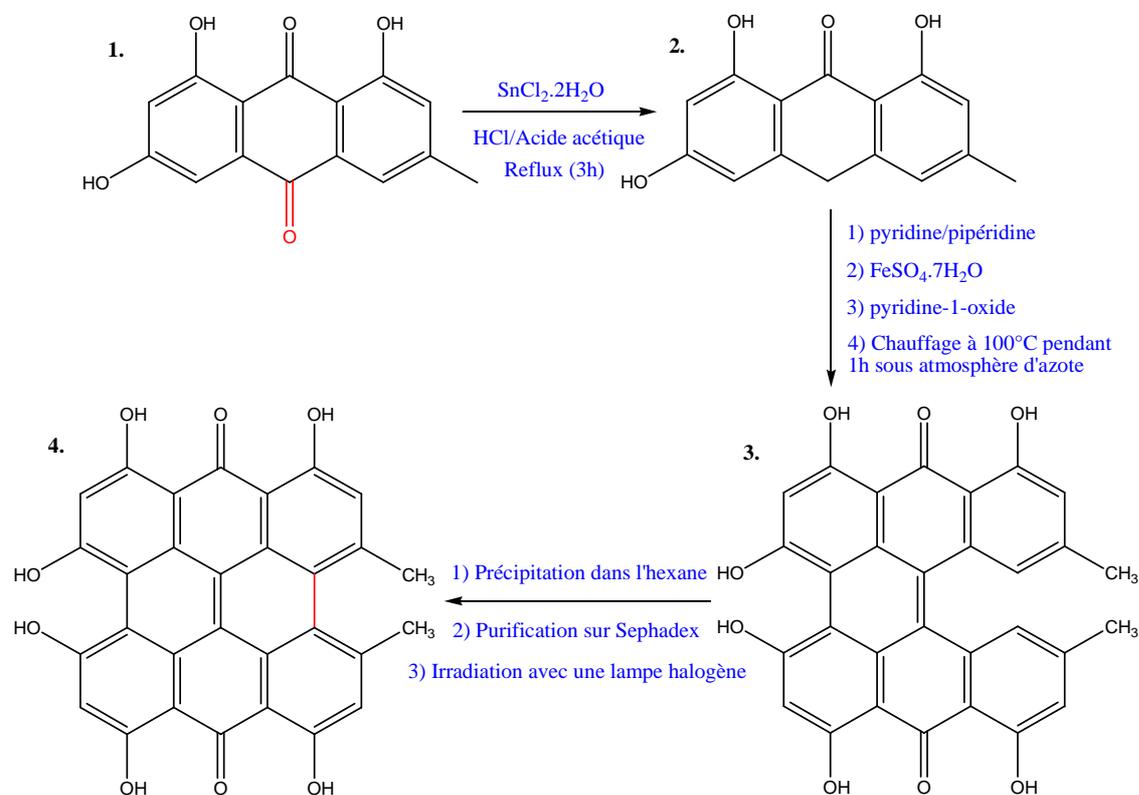


Figure I. 7 : Voie de semi-synthèse proposée pour l'hypéricine par Falk *et al.*

Une voie de synthèse radicalement différente a été proposée par Gruszecka-Kowalik et Zalkow. Celle-ci consistait en un couplage réducteur de l'émodyne avec l'hydroquinone en milieu basique. Le rendement obtenu était d'environ 50% (Figure I. 8).²⁹

²⁸ Aigner, S., Falk, H., *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 2008, **139**, 8, p 991

²⁹ Gruszecka-Kowalik, E., Zalkow, L. H., *Organic Preparations and Procedures International*, 2000, **32**, 1, p 57

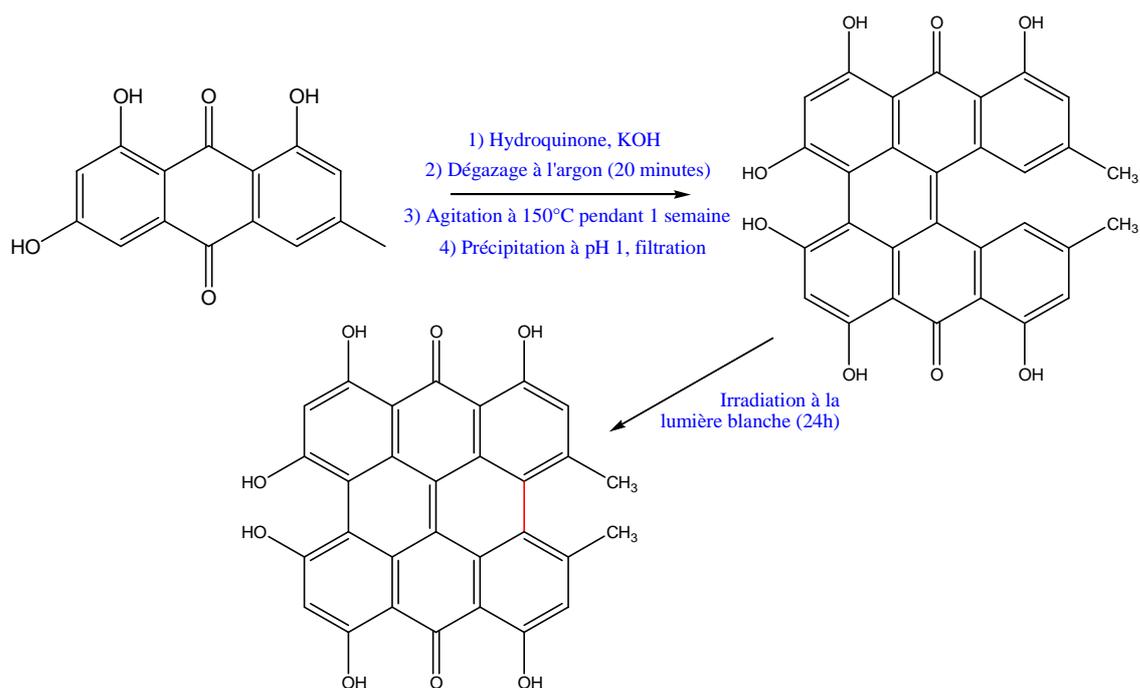


Figure I. 8 : Voie de semi-synthèse proposée pour l'hypericine par Zalkow *et al.*

II. C. Propriétés physico-chimiques

II. C. 1. Propriétés acido-basiques

L'intérêt pour les propriétés acido-basiques de l'hypericine est né de l'observation du phototropisme (attraction par la lumière) de certains protozoaires, tels que *S. Coeruleus* et *B. Japonicum*, contenant certains analogues de l'hypericine (blépharismine et oxyblépharismine), et dont le mouvement est provoqué par une diminution de pH au niveau de récepteurs.³⁰ Les valeurs de pKa ont fait l'objet de nombreuses controverses pour ce composé. Une liste chronologique non exhaustive des diverses études publiées sur le sujet est présentée dans le Tableau I. 1.

Le point sensible concernant les valeurs de pKa déterminées pour l'hypericine est celui trouvé à 7 par deux des équipes ayant travaillé sur le sujet ; il semble aujourd'hui, d'après des arguments avancés par le Professeur Heinz Falk, que la modification observée à ce pH soit un artéfact dû au tampon utilisé ; en effet l'équipe du Professeur Falk, au cours de travaux non publiés, est parvenue à observer cet effet à un pH de 7 lors d'un titrage réalisé avec l'acide chlorhydrique, alors que la même expérience réalisée avec l'acide acétique a conduit à observer une modification à un pH de 5,5. De plus, lors de leurs travaux en ESI-

³⁰ Plaza, P., *et al.*, *Photochemical and Photobiological Sciences*, 2005, 4, 9, p 754

MS, ils n'ont pas détecté d'espèce chargée positivement lorsque la solution d'hypéricine injectée présentait un pH acide, ce qui va à l'encontre d'une protonation de la fonction carbonyle. Il semble donc que l'hypéricine possède deux pKa de déprotonation, le premier à pH=2, correspond à l'acidité *bay*, et le second, à pH=11, à l'acidité *peri*. Concernant le pKa de protonation, il est négatif (environ -6), et ce phénomène n'est observable que dans des solutions d'acide sulfurique concentré.

Publication	pKa ₁	pKa ₂	Milieu	Méthode
Yamazaki <i>et al.</i> (1993) ³¹		11,7	Micelles de Triton X	Titration spectrophotométrique
Eloy <i>et al.</i> (1996) ³²	7	11	Micelles de Brij 35	Titration spectrophotométrique (méthode de Förster)
Burel <i>et al.</i> (1997) ³³	7		Solution liposomique DMSO	Méthode électrochimique
Altmann <i>et al.</i> (1997) ³⁴	1,8	9,2	Eau	Synthèse d'un dérivé PEG-hypéricine soluble dans l'eau, titration spectrophotométrique
Ahrer <i>et al.</i> (1998) ³⁵	2	12	EtOH 80%	API-MS (mode de détection négatif)
Leonhartsberger <i>et al.</i> (2002) ³⁶	2	11	EtOH 80% tamponné DMSO-d ₆ Acétone	ESI-MS (modes de détection négatif et positif) RMN du proton Indicateurs colorés

Tableau I. 1 : Données publiées concernant les valeurs de pKa mesurées pour l'hypéricine

Il a longtemps été question d'une action phototoxique de l'hypéricine via une acidification du milieu dans lequel elle est illuminée. Ces interrogations ont conduit de nombreuses équipes à tenter de déterminer les valeurs de pKa de l'hypéricine dans ses états excités ; là encore les résultats sont divergents, cependant il est désormais acquis que les vitesses de déprotonation en milieu biologique sont faibles par rapport aux autres modes de désactivation de l'état triplet, et que par conséquent ceci est peu probable. En revanche, l'observation par Dumas et al d'un transfert intermoléculaire de proton entre l'hypéricine

³¹ Yamazaki, T., *et al.*, *Journal of Physical Chemistry*, 1993, **97**, p 7870

³² Eloy, D., *et al.*, *Journal de chimie physique*, 1996, **93**, 3, p 442

³³ Burel, L., *et al.*, *New Journal of Chemistry*, 1997, **21**, 3, p 399

³⁴ Altmann, R., Falk, H., *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 1997, **128**, 6, p 571

³⁵ Ahrer, W., *et al.*, *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 1998, **129**, 6, p 643

³⁶ Leonhartsberger, J. G., Falk, H., *Monatshefte für Chemie*, 2002, **133**, 2, p 167

monoanionique dans l'état triplet et son dianion dans l'état fondamental peut efficacement provoquer une protonation d'un site basique situé à proximité.³⁷

II. C. 2. Absorption, fluorescence, phosphorescence et production d'oxygène singulet

Le spectre d'absorption de l'hypéricine dans les solvants organiques neutres révèle deux types de transition : de S_0 vers S_1 , avec des bandes comprises entre 500 et 600 nm (cette attribution résulte de la symétrie observée entre cette partie du spectre d'absorption et le spectre de fluorescence de la molécule, cf Figure I. 9), et de S_0 vers S_2 , avec des bandes comprises entre 425 et 485 nm. La transition de longueur d'onde la plus élevée a été attribuée à la première transition $\pi \rightarrow \pi^*$, polarisée selon l'axe le plus court de la molécule d'hypéricine. Cette première transition correspond à trois niveaux de vibration (dans l'éthanol, $\lambda=591$ nm pour $v=0$, $\lambda=547$ nm pour $v=1$ et $\lambda=510$ nm pour $v=2$), chacun étant divisé en deux niveaux (épaulements sur les bandes à 591 et 547 nm, le pic à 510 nm est trop faible pour observer l'épaulement). La seconde transition, $S_0 \rightarrow S_2$, est polarisée le long de l'axe le plus long de la molécule (celui qui contient les groupements carbonyle).

Dans la plupart des solvants organiques (acétone, acétonitrile, THF, dioxane, diméthylformamide, alcools), le spectre d'absorption de l'hypéricine est dominé par la bande la plus rouge. Un shift peut alors être observé concernant les bandes des transitions $S_0 \rightarrow S_1$ et $S_0 \rightarrow S_2$ selon le solvant (shift de 10 nm vers le rouge en passant de l'éthanol au DMSO, shift vers le bleu dans les solvants favorisant les liaisons hydrogène). En revanche la position des bandes présentes dans l'UV varie peu.

Dans des solvants apolaires (hexane, chloroforme, toluène) et dans l'eau, le spectre d'absorption de l'hypéricine est fortement modifié, avec une diminution marquée des coefficients d'extinction molaires, et un élargissement des bandes. Il est également à noter que la transition $S_0 \rightarrow S_1$ correspondant à $v=0$ n'est plus la plus intense ; dans l'eau, le cyclohexane et le toluène, c'est la transition correspondant à $v=1$ qui domine ; dans l'hexane et le chloroforme elles sont comparables. L'hypéricine est très peu soluble dans ces milieux, En milieu acide (acide acétique, concentration non précisée), les bandes dans le rouge sont déplacées vers le bleu, en raison de la stabilisation de la molécule par protonation, et les bandes correspondant à la transition $S_0 \rightarrow S_2$ s'intensifient ; un léger hyperchromisme est observé dans la région des UV. Les modifications subies par l'hypéricine en milieu acide sont réversibles et la neutralisation par une base permet de revenir au spectre classique de l'hypéricine.

³⁷ Dumas, S., *et al.*, *New Journal of Chemistry*, 2000, **24**, p 711

La transformation subie par l'hypéricine en milieu basique est elle aussi réversible, et conduit aux modifications présentées sur la Figure I. 10 ; une deuxième fonction hydroxyle, numérotée 3, se trouve alors déprotonée (numérotation présentée sur la Figure I. 4)

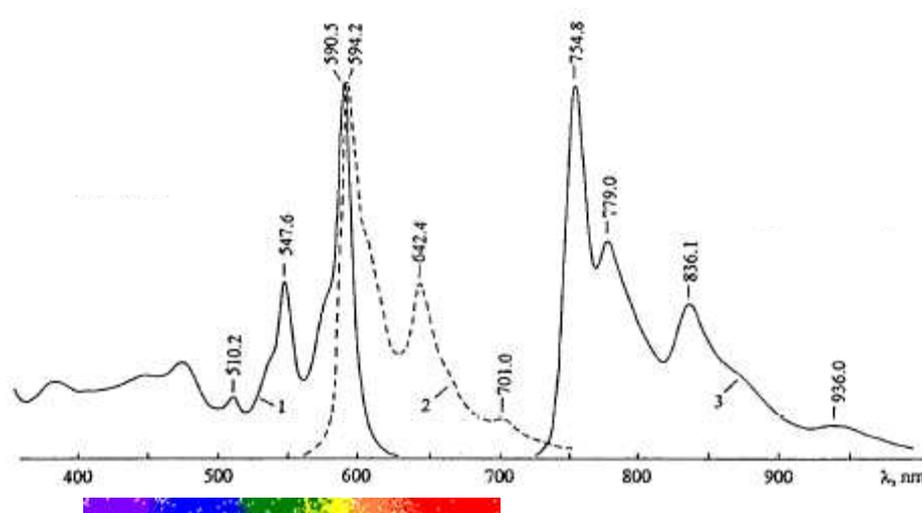


Figure I. 9 : Spectres d'absorption (1), de fluorescence (2 : excitation par un laser Ar⁺ à 293K), et de phosphorescence (3 : excitation à 549nm, $\Delta\lambda_{exc} = 2,5nm$, 77K) de l'hypéricine dans l'éthanol

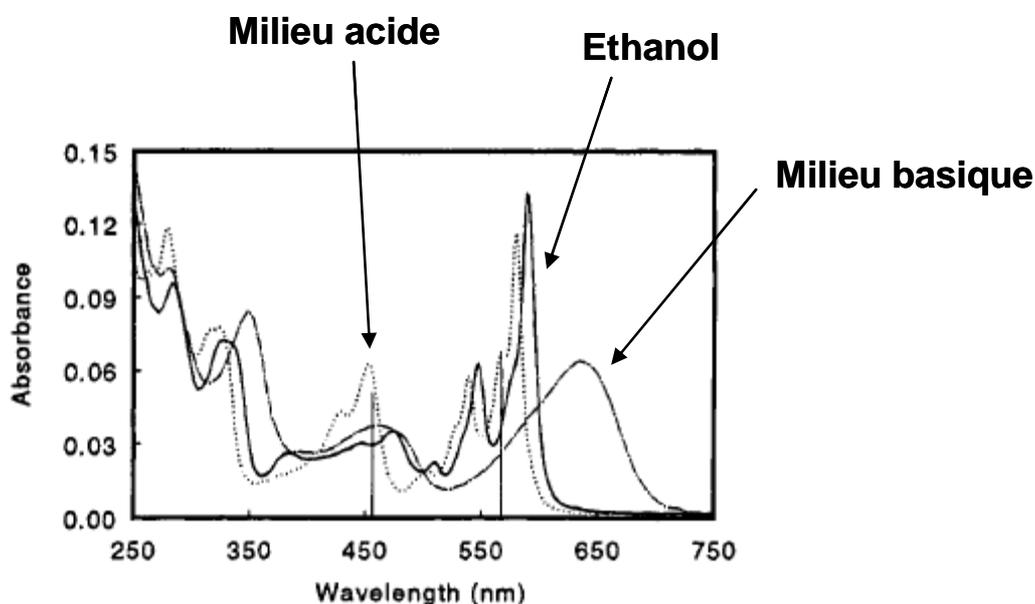
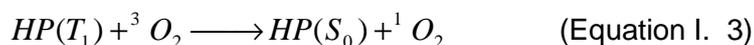


Figure I. 10 : Spectres d'absorption de l'hypéricine ($3.8 \times 10^{-6}M$) dans l'éthanol - trait continu : éthanol neutre, trait pointillé : éthanol acide, traits+points : éthanol basique

Le faible rendement quantique de phosphorescence calculé pour l'hypéricine à température ambiante ($\Phi_P = 10^{-3}$) nécessite d'enregistrer les spectres à basse température, afin de limiter le quenching de l'état triplet de l'hypéricine par l'oxygène moléculaire ou d'autres impuretés ;

le spectre présenté sur la Figure I. 9, enregistré à 77K, permet de calculer l'énergie du premier état triplet de l'hypéricine dans l'éthanol, 13250 cm^{-1} .³⁸

Son niveau d'énergie supérieur à celui de l'oxygène moléculaire singulet, 132,5 kJ/mol dans l'éthanol, lui permet de réagir selon l'équation suivante (Equation I. 3) :



Milieu	Valeur trouvée	Méthode	Référence
MeOH	0,37	spectrofluorimètre- laser IR	39
EtOH	0,36		
CH ₃ CN	0,26		
DMF	0,17		
THF	0,23		
D ₂ O	0,23		
H ₂ O	<0,22		
MeOH	0,39	Piège moléculaire à ¹ O ₂ : 9,10- dimethylantracene, référence : Rose Bengal	40
Vésicules de léthicine	0,35		

Tableau I. 2 : Rendements quantiques de production d'oxygène moléculaire singulet mesurés pour l'hypéricine dans divers milieux

Le Tableau I. 2 présente quelques valeurs de rendement quantique en oxygène moléculaire singulet mesurés pour l'hypéricine ; à cet égard, l'hypéricine est un photosensibilisant efficace, présentant un Φ_{Δ} supérieur à ceux observés pour d'autres agents photosensibilisants, par exemple la m-THPC dont le Φ_{Δ} dans l'éthanol vaut 0,30.⁴¹

³⁸ Arabei, S. M., *et al.*, *Chemical Physics Letters*, 1997, **270**, 1-2, p 31

³⁹ Darmanyar, A. P., *et al.*, *Journal de Chimie Physique*, 1994, **91**, 11-12, p 1774

⁴⁰ Roslaniec, M., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2000, **57**, 2-3, p 149

⁴¹ Hadjur, C., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1998, **45**, 2-3, p 170

III. Utilisation des propriétés photochimiques de l'hypéricine en oncologie

III. A. Historique

Dès 1992, Thomas *et al.* évaluent la phototoxicité de l'hypéricine sur des cellules EMT6 (cellules de carcinomes mammaires de souris). L'année suivante, Diwu *et al.* montrent que la photoactivation de l'hypéricine conduit à la formation du radical semiquinone et d'oxygène moléculaire singulet, dans des proportions qui dépendent de la concentration en hypéricine et de l'oxygénation du milieu.⁴² In vitro, la PDT avec l'hypéricine s'est révélée très efficace, et sur certains types de cellules, les résultats obtenus étaient bien meilleurs qu'avec le Photofrin ou la meso-tetrahydroxyphenyl-chlorin (m-THPC) ; en effet Pieslinger *et al.* ont comparé la phototoxicité de ces trois molécules sur les cellules A431 (cellules humaines de carcinomes épidermoïdes), lorsqu'elles étaient illuminées avec un système de diodes laser (longueur d'onde : 660 nm pour la m-THPC, 630 nm pour le Photofrin et 610 nm pour l'hypéricine) : les résultats révèlent que le taux de survie des cellules devient inférieur à 10% avec une dose de lumière de 3 J/cm² pour la m-THPC, 1,2 J/cm² pour le Photofrin, et seulement 0,45 J/cm² pour l'hypéricine.⁴³

La première utilisation de l'hypéricine sur un patient date de 1996, et concerne un individu sujet à un mésothéliome malin récurrent, et qui avait déjà été traité par chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, et photothérapie (Photosan®).⁴⁴ L'hypéricine a également montré une supériorité à d'autres photosensibilisateurs sur des modèles d'études in vivo.⁴⁵

Le fait que l'hypéricine soit présente dans les extraits d'*Hypericum Perforatum*, qui avaient été utilisés pour le traitement clinique de la dépression sur des milliers de patients sans effets secondaires majeurs,⁴⁶ a permis de mettre rapidement en évidence l'inoffensivité de la molécule aux doses thérapeutiques, et de débiter des essais cliniques de type I et II dans le cadre du traitement de maladies de la peau telles que le psoriasis, les verrues et les lymphomes cutanés à cellules T,⁴⁷ ainsi que pour le traitement du glioblastome (cancer du cerveau).⁴⁸

⁴² Diwu, Z., William Lown, J., *Free Radical Biology and Medicine*, 1993, **14**, 2, p 209

⁴³ Pieslinger, A., *et al.*, *Medical Laser Application*, 2006, **21**, 4, p 277

⁴⁴ Koren, H., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1996, **36**, 2, p 113

⁴⁵ Luksiene, Z., De Witte, P. A., *Acta Medica Lituanica*, 2002, **9**, 3, p 195

⁴⁶ Linde, K., *et al.*, *British Medical Journal*, 1996, **313**, p 253

⁴⁷ VIMRX Pharmaceuticals, 1997, VIMRX Successfully Completes Phase I Clinical Studies for VIMRxyn – synthetic hypericin – as Topical Phototherapy for Skin Diseases

⁴⁸ VIMRX Pharmaceuticals, 1998, VIMRX Successfully Completes Phase I/II Clinical Study Of VIMRxyn – synthetic hypericin – for the Treatment of Glioblastoma Brain Cancer

III. B. Mode d'action

III. B. 1. Influence de l'oxygène

La photosensibilisation par l'hypéricine est généralement décrite comme étant oxygène-dépendante. En effet en milieu hypoxique, l'hypéricine ne présente ni photocytotoxicité⁴⁹ ni effet inhibiteur sur les mitochondries. Hadjur *et al.* ont employé divers quenchers et scavengers des espèces réactives de l'oxygène, qui leur ont permis de déterminer que l'oxygène singulet (mécanisme de type II) était un élément-clé dans la phototoxicité de l'hypéricine.⁵⁰ Cependant, les effets des mécanismes de type I ne sont pas à écarter totalement. En milieu hypoxique, l'hypéricine conserve tout de même des propriétés virucidales, probablement dues à une baisse de pH induite par le composé,⁵¹ ou à la formation de radicaux d'hypéricine.⁵²

III. B. 2. Internalisation de l'agent photosensible

Les sels d'hypéricine sont absorbés par les membranes cellulaires lipidiques et leur caractère fortement hydrophobe permet à l'hypéricine de se localiser essentiellement dans les membranes cytoplasmiques. De nombreuses équipes ont utilisé des marqueurs spécifiques à chaque organelle cellulaire afin de déterminer dans quel compartiment cellulaire se localisait préférentiellement l'hypéricine. Les résultats présentés dans le Tableau I. 3 montrent que la localisation subcellulaire de l'hypéricine varie selon le type de cellules, ce qui explique probablement les différences de phototoxicité qui ont pu être observées.

L'internalisation de l'hypéricine par les cellules avait été décrite dans un premier temps comme étant un phénomène passif (diffusion et solubilité) ; en effet, elle était peu affectée par l'inhibition de la pinocytose, que ce soit par exposition des cellules à la température de 4°C,⁵³ ou par inhibition du système de l'ATP par hypoxie du système ;⁵⁴ toutefois, à l'inverse, l'inhibition de la pinocytose par voie chimique a affecté de façon

⁴⁹ Delaey, E., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2000, **56**, 1, p 19

⁵⁰ Hadjur, C., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1995, **27**, 2, p 139

⁵¹ Park, J., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 1998, **68**, 4, p 693

⁵² Weiner, L., Mazur, Y., *Journal of Chemical Society*, 1992, **29**, p 1439

⁵³ Uzdensky, A., *et al.*, *Lasers in Medical Science*, 2001, **16**, 4, p 276

⁵⁴ Thomas, C., Pardini, R. S., *Photochemistry and Photobiology*, 1992, **55**, 6, p 831

importante l'internalisation du photosensibilisateur,⁵⁵ ce qui montre que celle-ci est en partie au moins réalisée via des processus actifs.

Références	Type de cellules	Conditions d'incubation	Marqueurs utilisés	Résultats
Uzdensky <i>et al.</i> ⁵⁶	WiDR, NHIK 3025, D54Mg	1µM pendant 1h	LysoTrackerBlue DND-22, MitoTracker Green FM, ERTracker Blue-White DPX	Hypéricine exclue des mitochondries et des lysosomes, concentrée dans le cytoplasme périnucléolaire, du côté du réticulum endoplasmique (RE) et de l'appareil de Golgi (AG) (+ enveloppe nucléaire parfois)
Ali <i>et al.</i> ⁵⁷	CNE2, TW0-1, CCL220.1, SD	1,25µM pendant 2h	LysoTracker Green DND-26, MitoTracker Green FM	Hypéricine localisée dans les mitochondries et les lysosomes
Ritz <i>et al.</i> ⁵⁸	U373MG	2,5µM pendant 2h	Rhodamine 123 (mitochondries), acrydine orange (lysosomes)	Hypéricine localisée ni dans les mitochondries, ni dans les lysosomes
Theodossiou <i>et al.</i> ⁵⁹	PAM212	5µM pendant 3h	LysoTracker Green DND26	Hypéricine localisée dans les lysosomes
English <i>et al.</i> ⁶⁰	Neurones d'embryons de rats	20µM pendant 30 minutes	DAPI (noyau) + microscopie confocale	Hypéricine localisée à côté du noyau, dans une zone compatible avec la localisation de l'appareil de Golgi
Agostinis <i>et al.</i> ⁶¹	HeLa	0,5µM pendant 16 h	Rhodamine 123	Hypéricine non colocalisée avec les mitochondries
Olivo <i>et al.</i> ⁶²	RT112, SD	1µM pendant 30 minutes	MitoTracker Green FM, LysoTracker, DAPI	Hypéricine localisée dans les mitochondries et les lysosomes, exclue du noyau

Tableau I. 3 : Données bibliographiques concernant la localisation subcellulaire de l'hypéricine

Concernant la distribution de l'hypéricine *in vivo*, il a été montré que l'efficacité de la thérapie était corrélée avec la concentration plasmatique de l'hypéricine, plutôt qu'avec la concentration globale dans la tumeur. Ainsi, une étude en microscopie de fluorescence a montré qu'une éradication quasi-complète de la tumeur par traitement photodynamique avec

⁵⁵ Weber, N., *et al.*, *Antiviral Chemistry & Chemotherapy*, 1994, **5**, 2, p 83

⁵⁶ Uzdensky, A., *et al.*, *Lasers in Medical Science*, 2001, **16**, 4, p 276

⁵⁷ Ali, S. M., Olivo, M., *International Journal of Oncology*, 2002, **21**, 3, p 531

⁵⁸ Ritz, R., *et al.*, *International Journal of Oncology*, 2007, **30**, p 659

⁵⁹ Theodossiou, T., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2004, **80**, 3, p 438

⁶⁰ English, D. S., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 1999, **69**, 3, p 301

⁶¹ Agostinis, P., *et al.*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, **34**, 3, p 221

⁶² Olivo, M., *et al.*, *International Journal of Oncology*, 2003, **23**, p 983

l'hypéricine ne pouvait être obtenue que si la concentration intravasculaire de l'hypéricine est élevée au moment de l'irradiation.⁶³

Un des éléments concernant l'internalisation des agents photosensibles utilisés en thérapie photodynamique est la sélectivité de la molécule vis-à-vis des cellules cancéreuses. Concernant l'hypéricine, des études ont été menées sur des lignées de cellules cancéreuses (J-82, Y-24) et non cancéreuses de l'urothélium (HEL229, RPE, PHK), afin de déterminer si cette sélectivité de l'hypéricine était due aux propriétés des cellules cancéreuses.⁶⁴ Les concentrations intracellulaires d'hypéricine obtenues pour les différentes lignées étant sensiblement égales, il est apparu que d'autres facteurs interviennent ; le manque d'adhésion entre les cellules cancéreuses qui permet aux cellules cancéreuses de s'échapper de leur site d'origine et de métastaser, en est probablement responsable. Il est en général dû à une sous expression des cadhérines, glycoprotéines responsables de l'adhésion cellulaire, et des intégrines, ainsi que l'importante vascularisation des zones tumorales.

L'un des facteurs affectant l'accumulation de l'hypéricine au sein des cellules est la concentration dans le milieu d'incubation : en effet Theodossiou *et al.*⁶⁵ ont montré sur des kératinocytes de souris (PAM212) que lors d'une incubation à 5µM d'hypéricine, la fluorescence des cellules était corrélée avec le fluorescence obtenue après extraction des cellules au DMSO ; en revanche, lors d'une incubation à 50µM, dès 2h d'incubation, on observe une différence importante entre ces deux fluorescences, qui montre une agrégation intracellulaire de l'hypéricine. Le taux de confluence des cultures cellulaires (taux de recouvrement de la surface par les cellules en %) peut également influencer la concentration intracellulaire d'hypéricine comme l'ont montré Delaey *et al.*⁶⁶

Enfin, il est à noter que l'état d'agrégation de l'hypéricine dans la formulation utilisée peut également modifier d'une part la biodistribution de l'hypéricine, que l'on retrouvera plus facilement dans les organes tels que le foie, la rate et les poumons lorsqu'elle est injectées sous forme de suspension d'agrégats.⁶⁷

III. B. 3. Type de mort cellulaire induit

Les cellules des organismes multicellulaires peuvent mourir de différentes façons : les plus connues sont l'apoptose, un procédé bien régulé et ordonné, et la nécrose, une mort

⁶³ Chen, B., *et al.*, *International Journal of Oncology*, 2001, **18**, 4, p 737

⁶⁴ Kamuhabwa, A. R., *et al.*, *Anticancer Research*, 2000, **20**, 4, p 2579

⁶⁵ Theodossiou, T., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2004, **80**, 3, p 438

⁶⁶ Delaey, E. M., *et al.*, *International Journal of Oncology*, 1999, **14**, 4, p 759

⁶⁷ Van De Putte, M., *et al.*, *International Journal of Oncology*, 2006, **28**, 3, p 655

cellulaire plus rapide, moins ordonnée et qui se produit après un stress physique ou chimique de la cellule.

On nomme apoptose (ou mort cellulaire programmée, ou suicide cellulaire), le processus par lequel des cellules déclenchent leur auto destruction en réponse à un signal. C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Les cellules qui sont en train de mourir par apoptose présentent des changements structuraux qui sont caractéristiques de ce processus, et qui sont indépendants du signal qui l'a déclenché : rétrécissement, condensation de la chromatine, fragmentation de l'ADN, ... La cellule se sépare ensuite en vésicules entourées d'une membrane (corps apoptotiques) qui sont rapidement et proprement ingérées par les cellules voisines et les phagocytes. Afin que la phagocytose soit plus rapide, la cellule expose sur le feuillet externe de sa membrane plasmique de la phosphatidylsérine, un phospholipide normalement constitutif de son feuillet interne) qui permettra sa phagocytose par les globules blancs. Un des points-clés de la mort par apoptose est qu'elle permet de ne jamais rendre le contenu de la cellule accessible au système immunitaire, ce qui minimise les réactions inflammatoires.

Ce dernier point contraste fortement avec la mort par nécrose, caractérisée par un gonflement du cytoplasme et des organelles, qui cause l'éclatement de la membrane plasmique. Le contenu de la cellule est alors déversé dans la matrice extracellulaire, ce qui cause une réaction inflammatoire.

L'apoptose est un point-clé dans le traitement des cancers ; en effet la plupart des cellules malignes présente une incapacité à déclencher leur apoptose, qui est par conséquent devenue un objectif thérapeutique attractif. Il s'agit essentiellement d'optimiser les effets phototoxiques des agents utilisés afin de contrecarrer les processus prolifératifs et anti-apoptotiques se produisant au sein des cellules cancéreuses.

L'apoptose induite par l'hypéricine a été décrite pour la première fois en 1994 par Couldwell *et al.*⁶⁸ sur des cellules de gliomes, qui ont montré rapidement des signes de mort par apoptose (fragmentation de l'ADN). Ces constatations ont ensuite été étendues à d'autres lignées cellulaires : cellules d'adénome de l'hypophyse (Hamilton *et al.*⁶⁹), cellules épithéliales pigmentaires de la rétine (Harris *et al.*⁷⁰), cellules humaines de neuroblastome SK-N-SH (Wei *et al.*⁷¹). L'inhibition de la protéine kinase C est un élément essentiel du déclenchement de l'apoptose par l'hypéricine.

⁶⁸ Couldwell, W., *et al.*, *Neurosurgery*, 1994, **35**, 4, p 709

⁶⁹ Hamilton, H. B., *et al.*, *Journal of Neurosurgery*, 1996, **85**, 2, p 329

⁷⁰ Harris, M. S., *et al.*, *Current Eye Research*, 1996, **15**, 3, p 255

⁷¹ Wei, Z., *et al.*, *Cancer Letters*, 1995, **96**, 5, p 31

III. C. Application : photodiagnostic et photothérapie des cancers de la vessie

III. C. 1. Thérapie photodynamique et cancer de la vessie

La résection transurétrale est la modalité de base pour le traitement des tumeurs de la vessie. Elle consiste à éliminer toutes les lésions visibles durant la cystoscopie. Cependant cette modalité est limitée par le taux des tumeurs résiduelles qui restent lors d'une résection incomplète, ce qui présente une source de récurrence et de progression. L'association de la chimiothérapie intravésicale à la résection transurétrale conduit à la diminution du taux de récurrences de 14% à court terme. Cependant cette modeste réduction ne se transmet pas à long terme et ne permet pas de prévenir le risque de progression. L'immunothérapie par instillation intravésicale de Bacille de Calmette et Guérin (BCG) réduit elle le taux de progression de 26%, cependant des cystites sévères et des réactions inflammatoires extravésicales avec le risque de « BCGite » générale peuvent apparaître. Dans le cas de lésions superficielles résistant à la chimiothérapie et à l'immunothérapie, la thérapie photodynamique peut être une alternative à la cystectomie radicale.

Pour la thérapie photodynamique de la vessie, deux modalités d'illumination existent : l'irradiation intégrale de la vessie en utilisant un diffuseur sphérique ou l'utilisation d'un milieu de diffusion (Intralipid) pour permettre le traitement des tumeurs avec une fibre à diffusion frontale. Hisazumi *et al.*⁷² ont développé un système de rotation motorisé permettant une irradiation circulaire de la vessie. La dosimétrie de la lumière en PDT de la vessie pose quelques problèmes en raison d'une part de l'utilisation de diffuseurs, d'autre part de l'effet sphère d'intégration exercé par la paroi de la vessie. L'utilisation d'un système de dosimétrie *in situ* est donc conseillée. En effet la dose de lumière totale reçue par la vessie et en général 2 à 7 fois supérieure à la valeur calculée en sortie de fibre.

III. C. 2. Diagnostic par fluorescence et cancer de la vessie

La cytologie urinaire, la cystoscopie conventionnelle en lumière blanche et la biopsie au hasard sont les techniques principales appliquées dans le diagnostic du cancer de la vessie. La cytologie urinaire est une technique non invasive mais malheureusement moins sensible à la présence des tumeurs de bas grade. La cystoscopie conventionnelle est elle peu adaptée à la détection de lésions ne présentant pas d'anomalies architecturales.

⁷² Hisazumi, H., *et al.*, *Journal of Urology*, 1984, **131**, 5, p 884

Une technique plus sensible que la cystoscopie conventionnelle est donc nécessaire pour permettre de localiser les lésions tumorales et de guider le praticien dans la résection de ces lésions afin de réduire le risque de récurrence et d'éviter le risque de progression. La combinaison de la technique de cystoscopie au phénomène de fluorescence présente une avancée importante dans le domaine du diagnostic du cancer de la vessie.

III. C. 3. Apport de l'hypéricine pour le photodiagnostic et la photothérapie des cancers de la vessie

L'hypéricine est principalement utilisée pour le diagnostic et le traitement des lésions de la vessie. En effet la sélectivité et la phototoxicité de l'hypéricine pour les cellules cancéreuses sont satisfaisantes dans cet organe.⁷³ Il est à noter que certaines cellules sont plus atteintes que d'autres par les dommages générés par la photoactivation de l'hypéricine ; par exemple les cellules MCF7 (cellules humaines d'adénocarcinome du sein) et RT-4 (cellules de neurotumeurs périphériques induites chez le rat par l'éthylnitrosourée) sont relativement résistantes au traitement par l'hypéricine.⁷⁴

De plus, l'hypéricine permet d'effectuer un diagnostic précis sans que les concentrations plasmatiques constatées à proximité des lésions ne puissent causer de photosensibilisation excessive du patient ou d'autres effets indésirables.⁷⁵

A l'heure actuelle les trois agents photosensibles utilisés pour le photodiagnostic des lésions de la vessie sont l'acide 5-aminolevulinique, l'hexaminolevulinate, et l'hypéricine. L'efficacité de ces molécules est déterminée via le calcul de la spécificité et de la sensibilité du diagnostic. La sensibilité est définie comme étant la proportion d'individus diagnostiqués positifs parmi les malades, et la spécificité est la proportion d'individus diagnostiqués négatifs parmi le groupe des individus sains. Dans le cas d'une étude portant sur 87 patients présentant des tumeurs papillaires de la vessie ou des carcinomes, l'hypéricine a montré un haut degré de sensibilité (94%) et de spécificité (95%) (Figure I. 11).

⁷³ Kamuhabwa, A. A. R., *et al.*, *International Journal of Cancer*, 2001, **97**, 2, p 253

⁷⁴ Kamuhabwa, A. R., *et al.*, *Anticancer Research*, 2000, **20**, 4, p 2579

⁷⁵ Kamuhabwa, A. A. R., *et al.*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2005, **59**, 3, p 469

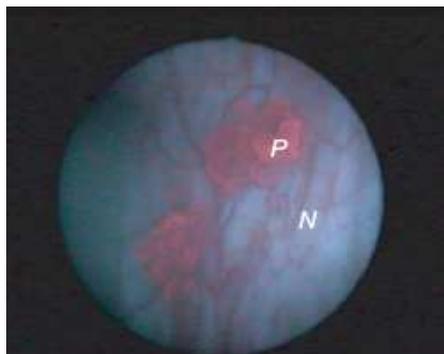


Figure I. 11 : Image endoscopique de la vessie après instillation d'hypéricine (40mL d'une solution à 8 μ M pendant 2 heures : P, lésion papillaire ; N, muqueuse normale)⁷⁶

III. D. Restrictions

La réaction normale de fluorescence est de réémettre l'énergie absorbée sous forme de photons de longueur d'onde plus grande que celle qui a servi à l'excitation. Toutefois, en présence d'une intensité très forte de lumière, une forte proportion de molécules existe dans des états excités de haute énergie. Celles-ci peuvent perdre des électrons pour donner des radicaux libres. Ces derniers sont également très réactifs. Les molécules initialement fluorescentes sont donc profondément modifiées par ces réactions annihilent leur fluorescence de façon irréversible. On appelle ce phénomène "photoblanchiment".

Le photoblanchiment de l'hypéricine a été étudié par Uzdensky *et al.*⁷⁷ dans trois milieux : dans une solution contenant de l'albumine humaine, dans des cultures de cellules d'adénocarcinomes et dans la peau de souris nude. L'exposition prolongée de l'hypéricine (1 μ M) à une lumière à 596 nm a conduit à son photoblanchiment dans les trois cas ; cette dégradation n'était pas oxygène-dépendante, et l'oxygène singulet généré par la molécule n'était pas la cause de sa dégradation. En 2003, Bettina Schwarzingler et Heinz Falk⁷⁸ montrent qu'étonnamment, l'hypéricine est moins photoblanchie lorsqu'elle est complexée par l'albumine bovine qu'avec l'albumine humaine ; cependant l'étude du photoblanchiment de l'hypéricine dans des systèmes mimant ceux qui seraient potentiellement actifs au sein de ces macromolécules (tyrosine, tryptophane, lysine, ...), n'a pas permis de mettre en évidence de photoréaction. Des expériences réalisées en spectrométrie de masse (ionisation par électrospray) et en Résonance de Spin Electronique n'ont pas permis de caractériser d'éventuels photoproduits, que ce soit après récupération de l'hypéricine photoblanchie (précipitation de la protéine puis extraction de l'hypéricine par l'acétone), ou lors d'analyses

⁷⁶ D'Hallewin, M. A., *et al.*, *British Journal of Urology International*, 2002, **89**, 7, p 760

⁷⁷ Uzdensky, A. B., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2002, **76**, 3, p 320

⁷⁸ Schwarzingler, B., Falk, H., *Monatshefte fur Chemie / Chemical Monthly*, 2003, **134**, 10, p 1353

directes du système hypéricine/protéine. Il a été conclu que celle-ci devait être une photoréduction ou une photoaddition de stabilisation de l'hypéricine par la protéine, mais qui permettait une reconversion partielle de l'hypéricine lors de la destruction du complexe. Ils convient tout de même de noter que l'hypéricine est plus stable sous illumination que certains photosensibilisateurs tels que la m-THPC ; en effet, lors des expériences réalisées par Uzdensky *et al.* sur la peau de souris nude, la dose de lumière nécessaire pour blanchir 50% du photosensibilisateur a été estimée à 140 J/cm² pour l'hypéricine, alors que Ma *et al.*⁷⁹ ont trouvé une valeur de 0,1-0,2 J/cm² pour la m-THPC.

De plus, comme la plupart des agents photosensibles utilisés en thérapie photodynamique, l'hypéricine est une molécule très lipophile. Bien que cette propriété soit intéressante pour la sélectivité qu'elle procure au composé vis-à-vis des tissus néoplasiques, elle engendre une insolubilité dans tous les milieux physiologiquement acceptables.

Une pratique commune permettant d'éviter les problèmes de solubilité aqueuse de ces composés consiste à utiliser des solvants organiques comme co-solvants. Dans le cas de l'hypéricine, le diméthylsulfoxyde est de loin le plus utilisé ; toutefois ces solvants ne peuvent pas être utilisés *in vivo*, le DMSO par exemple est mutagène dès 1% lorsqu'une injection intraperitonéale est réalisée sur des rats.⁸⁰

Une autre approche est l'utilisation de protéines, telles que la BSA (bovine serum albumin). L'hypéricine a en effet été utilisée solubilisée dans 1% de protéines de plasma dans la cadre de la détection des cancers de la vessie. Or, il a été reporté que l'hypéricine se lie assez fortement à l'albumine humaine, et que par conséquent, la quantité d'hypéricine disponible pour être transportée via la membrane cellulaire était réduite. Dans le cas des cancers de la vessie, la solution d'instillation devait être en contact avec chaque partie de la vessie pendant deux heures, ce qui est une durée relativement élevée, afin de permettre de détecter efficacement les lésions. De plus, la liaison hypéricine-protéine affecte les propriétés photophysiques de l'hypéricine : Das *et al.* ont montré que bien que liée solidement à albumine de sérum humain (HSA), l'hypéricine est tout de même le siège d'un transfert intramoléculaire de proton dans son état excité, si le ratio hypéricine :HSA vaut 5 :1. En revanche si ce même rapport est de 1 :1, ce transfert de proton ne peut plus se faire.⁸¹

Plus récemment, Lay Lay Saw *et al.* ont étudié des formulations d'hypéricine utilisant comme solvant la N-méthylpyrrolidone, un solvant biocompatible ; certaines études avaient en effet démontré que ce solvant permettait d'augmenter la solubilité d'un médicament quasi

⁷⁹ Ma, L., *et al.*, *Proc. SPIE, Photochemotherapy: Photodynamic Therapy and Other Modalities II*, Stanley B. Brown; Benjamin Ehrenberg; Johan Moan; Eds., 1996, **2924**, p 219

⁸⁰ Kapp Jr, R., Eventoff, B., *Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis*, 2005, **1**, 2, p 141

⁸¹ Das, K., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 1999, **69**, 6, p 633

insoluble, la zidovudine (AZT), ainsi que sa pénétration à travers l'épiderme.⁸² De plus, ce solvant avait été utilisé pour formuler un médicament utilisé pour le traitement des cancers de la prostate, et cette formulation avait été approuvée aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration. L'hypéricine solubilisée dans la N-méthylpyrrolidone (NMP) a été étudiée sur un modèle biologique, la membrane chorioallantoïque du poussin (Chick chorioallantoic membrane CAM). Le sac chorioallantoïque, qui entoure l'embryon, permet la récupération et la modification des fluides qu'il excrète ; sa membrane permet le transport actif du sodium, des chlorures et du calcium vers l'embryon, et a été utilisée comme modèle *in vivo* pour l'étude du transport des molécules, des échanges de gaz, de la toxicité et de l'angiogénèse. L'avantage de ce modèle est qu'il est transparent et permet d'évaluer les changements morphologiques des vaisseaux en temps réel.⁸³ Il a permis à Lay Lay Saw *et al.* de montrer que la N-méthylpyrrolidone permettait dans les conditions étudiées (concentration en hypéricine 8µM, 0.5% de NMP) d'augmenter l'absorption de l'hypéricine par la membrane,⁸⁴ et donc de permettre un meilleur contraste d'image dans le cadre du photodiagnostic. De plus, la même équipe a récemment démontré que le photoblanchiment de l'hypéricine dans ce type de formulation était relativement lent ; cependant, la formulation la plus stable contenait 40% de NMP,⁸⁵ proportion ayant démontré une toxicité importante envers le CAM.

D'autres axes de recherche concernant la biodisponibilité de l'hypéricine visent à encapsuler le photosensibilisateur dans diverses substances : liposomes, cyclodextrines, polymères. Les nanoparticules obtenues permettent de solubiliser dans des solutions aqueuses de grandes quantités d'hypéricine. Un des points-clés est alors la stabilité de ces formulations, car l'hypéricine ne doit pas se libérer des particules avant d'avoir pénétré les cellules. Par exemple dans le cas de liposomes de PEG conjugués avec la transferrine, la quantité d'hypéricine libérée par les liposomes (30% de la quantité totale au bout de 24 heures dans le cas d'une suspension à 10µM d'hypéricine) est trop importante pour envisager son utilisation en thérapie photodynamique.⁸⁶ En revanche, Zeisser-Labouèbe *et al.* ont encapsulé l'hypéricine dans d'autres nanoparticules (200-300 nm) polymériques (de l'acide polylactique ainsi que deux copolymères acide lactique/acide glycolique 50/50 de masse molaires 48 et 12 kDa), qui ont montré une meilleure stabilité : après 18 heures d'incubation, la formulation d'acide polylactique contenant en masse 0.15% d'hypéricine (concentration molaire de l'hypéricine dans la solution 10µM) conduit à une libération de seulement 10% du photosensibilisant, contre 30% pour la formulation à 0.03% d'hypéricine. Cependant la bonne stabilité des nanoparticules les plus concentrées en hypéricine ne

⁸² Cox, M. C., *et al.*, *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2005, **5**, 4, p 605

⁸³ Valdes, T. I., *et al.*, *Journal of Biomedical Materials Research*, 2002, **62**, 2, p 273

⁸⁴ Saw, C. L. L., *et al.*, *Cancer Letters*, 2006, **238**, 1, p 104

⁸⁵ Saw, C. L. L., *et al.*, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2006, **5**, 11, p 1018

⁸⁶ Derycke, A., De-Witte, P., *International Journal of Oncology*, 2002, **20**, 1, p 181

conduit pas l'augmentation de phototoxicité attendue, puisque les auteurs ont constaté que la phototoxicité est inversement proportionnelle à la concentration d'HP dans les particules.⁸⁷

Enfin, diverses modifications structurales de l'hypéricine ont été réalisées et testées. En 1998, Vandenberg *et al.* comparent la phototoxicité de l'hypéricine à celle de deux de ses dérivés bromés, la 2,5-dibromohypéricine, et la 2,5,9,12-tetrabromohypéricine (numérotation présentée sur la Figure I. 3) ainsi qu'avec un diacide hypéricinique et l'hexaméthylhypéricine. Tous ces dérivés ont montré une phototoxicité et une activité antiproliférative importante, sauf le diacide et l'hexaméthylhypéricine. Cette dernière, non phototoxique, présentait tout de même de fortes propriétés antiprolifératives, probablement dues à l'inhibition de la protéine kinase C. Ce composé était le seul actif sans lumière parmi les composés testés. Tous les composés testés ont été retrouvés en grandes quantités dans les cellules, sauf le diacide. Le composé le plus actif semblait être la tetrabromohypéricine : présent en moins grande quantité au sein des cellules, il affichait tout de même une activité biologique aussi importante que l'hypéricine.⁸⁸ En 1999, Hudson *et al.* confirment que les dérivés bromés de l'hypéricine présentent une plus grande activité biologique que l'hypéricine pour la destruction des virus. En revanche l'hexaméthylhypéricine ne présente aucune activité virucidale.⁸⁹ Les rendements quantiques d'oxygène moléculaire singulet mesurés indirectement en 2000 par Roslaniec *et al.* confirment que la bromation de l'hypéricine augmente ce rendement (0.72 pour la tetrabromohypéricine et 0.39 pour l'hypéricine dans le méthanol).⁹⁰ Boiy *et al.* ont également étudié l'influence de l'estérification sur la pénétration de l'hypéricine dans le derme de souris nude, et ont montré que celle-ci n'était favorable que dans le cadre de certaines formulations (*unguentum sorbatis* 100).⁹¹

D'autres modifications structurales plus poussées ont également été réalisées sur la molécule d'hypéricine : en 2002, Bernd Lackner et Heinz Falk préparent un dérivé stilbénoidique de l'hypéricine qui toutefois n'a pas permis une production d'oxygène singulet suffisante pour envisager une utilisation en thérapie photodynamique.⁹² La même année Wen *et al.* ont réalisé un couplage entre l'hypéricine et la molécule luciferin (chimiluminescente) et envisagé l'utilisation des propriétés photodynamiques de l'hypéricine sans la nécessité de traiter des tumeurs accessibles à une source de lumière.⁹³

Le premier exemple de vectorisation de l'hypéricine ne concerne pas directement la molécule mais une de ses formulations nanoparticulaires. En effet, Derycke *et al.* ont

⁸⁷ Zeisser-Labouebe, M., *et al.*, *International Journal Of Pharmaceutics*, 2006, **326**, 1-2, p 174

⁸⁸ Vandenberg, A. L., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 1998, **67**, 1, p 119

⁸⁹ Hudson, J. B., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 1999, **70**, 5, p 820

⁹⁰ Roslaniec, M., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2000, **57**, 2-3, p 149

⁹¹ Boiy, A., *et al.*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2007, **4**, 2, p 130

⁹² Lackner, B., Falk, H., *Monatshefte für Chemie*, 2002, **133**, p 717

⁹³ Wen, J., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2002, **76**, 2, p 153

encapsulé l'hypéricine dans des liposomes de PEG vectorisés avec la transferrine, dont les récepteurs sont surexprimés sur de nombreux types de cellules cancéreuses, et notamment les HeLa, cellules humaines de cancer du col de l'utérus sur lesquelles a porté leur étude. Cependant cette vectorisation n'a pas permis de favoriser la phototoxicité de l'hypéricine, ce résultat s'expliquant par la relative mauvaise stabilité de cette formulation que ne permettait pas de contenir efficacement le photosensibilisateur.⁹⁴ Tout récemment, des dérivés de l'hypéricine disubstitués en positions 10 et 11 par des nucléobases (thymine, cytosine et adénine) ont pu être synthétisés ; parmi eux, celui substitué par la thymine a montré une photoproduction d'oxygène moléculaire singulet comparable à celle de l'hypéricine, et une accumulation plus marquée dans le noyau de cellules cancéreuses de la prostate (LNCaP).

⁹⁵

⁹⁴ Derycke, A., De-Witte, P., *International Journal of Oncology*, 2002, **20**, 1, p 181

⁹⁵ GeiBlmeir, D., Falk, H., *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 2008, **139**, 9, p 1127

Conclusions :

Les données présentées dans ce chapitre ont permis de mettre en avant les potentialités importantes qu'offre l'hypéricine dans le cadre du photodiagnostic et de la photothérapie des cancers : fluorescence importante, bon rendement quantique en oxygène moléculaire singulet, sélectivité satisfaisante pour les tissus cancéreux, faible toxicité en l'absence de lumière, relative stabilité face au photoblanchiment. Cependant les quelques voies de synthèse élaborées pour la molécule sont relativement fastidieuses, et son extraction sélective d'*Hypericum perforatum* reste peu aisée du fait de la présence dans la fleur d'analogues hypériciniques. De plus, l'hypéricine présentant, comme de nombreux autres photosensibilisateurs, un fort caractère hydrophobe, son utilisation en milieu biologique est restreinte.

Les formulations évaluées au cours des dernières années afin de pallier à ces problèmes présentent toutes des inconvénients ; l'utilisation de protéines permet d'augmenter la concentration plasmatique de l'hypéricine, toutefois le complexe formé empêche cette dernière de traverser la membrane cellulaire ; les formulations résultant de l'encapsulation de l'hypéricine dans les liposomes, les nanoparticules, etc, sont trop instables et causent souvent une libération anticipée de l'agent photosensible ; l'utilisation de la N-méthylpyrrolidone semble plus prometteuse mais ne règle pas la question du coût de l'hypéricine pure.

Au vu de ces résultats et de certains éléments concernant les propriétés du Millepertuis, qui vont être présentés dans le chapitre II, nous avons décidé dans ce travail d'évaluer, dans le cadre du photodiagnostic et de la photothérapie des cancers, la formulation la plus simple pour l'hypéricine, c'est-à-dire sa formulation naturelle : l'extrait de fleur de Millepertuis.

Chapitre II

Le Millepertuis

INTRODUCTION :	35
I. HISTORIQUE DE L'UTILISATION DU MILLEPERTUIS ET DESCRIPTION DE LA PLANTE	36
II. COMPOSITION CHIMIQUE	37
<i>II. A. L'huile essentielle</i>	37
<i>II. B. Les métabolites secondaires</i>	37
II. B. 1. Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique.....	37
II. B. 2. Les xanthones.....	38
II. B. 3. Les polyphénols	38
II. B. 4. Les caroténoïdes	43
II. B. 5. Les phloroglucinols	44
II. B. 6. Les naphthodianthrones	47
III. EXTRACTION DU MATERIEL VEGETAL	51
IV. FORMULATIONS DE MILLEPERTUIS.....	52
V. STABILITE DES FORMULATIONS DE MILLEPERTUIS	53
<i>V. A. Stabilité du matériel végétal</i>	53
<i>V. B. Stabilité des solutions</i>	55
VI. EFFETS COOPERATIFS ENTRE LES COMPOSES PRESENTS DANS LE MILLEPERTUIS.....	56
<i>VI. A. Propriétés antidépressives de la plante</i>	56
<i>VI. B. Cytotoxicité de l'hyperforine</i>	57
<i>VI. C. Solubilité aqueuse de l'hypéricine</i>	57
VII. PROPRIETES PHOTOSENSIBILISATRICES DU MILLEPERTUIS	58
CONCLUSIONS	60

Introduction :

Le Millepertuis (Saint John's Wort en désignation anglaise), est une plante herbacée vivace que l'on trouve dans toute l'Europe, l'Asie, l'Afrique du Nord et l'Amérique du Nord. Depuis plus de deux mille ans, elle est utilisée tant en usage externe qu'en usage interne pour ses propriétés thérapeutiques dans des domaines très variés : usage interne contre les troubles de l'humeur, usage externe sous forme d'onguent pour ses propriétés antimicrobiennes, ou sous forme d'huile contre les brûlures.

C'est dans le cadre de son utilisation pour le traitement de la dépression qu'elle a fait l'objet d'un grand nombre de controverses, notamment en ce qui concernait son efficacité et les interactions qu'elle engendrait avec d'autres médicaments. Ces controverses ont conduit à son interdiction en France de 2001 à 2004. Il est désormais clairement démontré que son efficacité se limite au traitement des dépressions légères à modérées ; de plus, les nombreuses études menées sur les interactions médicamenteuses ont établi que le Millepertuis agissait sur certaines enzymes responsables du métabolisme des médicaments, rendant ceux-ci moins actifs pendant la prise de Millepertuis.¹ La prise de ces préparations, si elle est accompagnée d'un suivi médical, est donc sans danger ; en Allemagne, où le Millepertuis est en vente en tant que médicament depuis 1984, il représentait, en 1997, 25% des prescriptions d'antidépresseurs.

Nous avons décidé de nous intéresser, non pas aux propriétés antidépresseurs de la plante, mais à ses propriétés photosensibilisantes, en vue d'une utilisation possible pour le photodiagnostic et la photothérapie de certains cancers. En effet le Millepertuis contient outre l'hypéricine, d'autres composés de la famille des naphthodianthrones susceptibles eux aussi de posséder des propriétés photochimiques potentiellement intéressantes.

Ce deuxième chapitre vise donc, après de brefs rappels historiques et une description succincte de la plante, à donner une vision d'ensemble des propriétés de la fleur de Millepertuis, en mettant l'accent sur différents aspects qui seront importants dans le cadre de cette étude : la composition chimique des extraits de Millepertuis, les diverses méthodes d'extraction possibles et la stabilité des extraits obtenus. Pour finir, nous ferons un point sur les effets de synergie qui ont pu être observés au sein de ces extraits, car les effets d'un extrait végétal ne résultent pas systématiquement de la simple additivité des effets des composés présents dans le mélange. Enfin, nous préciserons l'utilisation qui a été faite jusqu'alors des propriétés photosensibilisantes du Millepertuis.

¹ Wang, Z., et al., *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 2001, **70**, 4, p 317

I. Historique de l'utilisation du Millepertuis et description de la plante

Le millepertuis (Figure II. 1), *Hypericum perforatum*, est une plante herbacée vivace que l'on trouve dans toute l'Europe et qui fleurit au mois de Juin, à la Saint Jean (d'où son nom "Herbe de la Saint Jean") et donne alors des fleurs jaune d'or. Cette plante, appelée aussi "herbe aux mille vertus", a longtemps été utilisée en usage externe dans le traitement des brûlures, des rhumatismes, et des plaies. Actuellement et depuis quelques années, le millepertuis connaît un succès grandissant mais cette fois-ci en usage interne pour ses propriétés antidépressives.

Hypericum perforatum est une plante sauvage pouvant atteindre 60 cm de haut, glabre, quelquefois verte ou glauque. Sa tige anguleuse est dressée et rameuse marquée par deux lignes saillantes opposées ce qui la différencie des autres espèces d'*Hypericum*. Les petites feuilles sont opposées, sans stipule, sessiles et de forme ovoïde-elliptique. Le limbe, vert foncé, est parsemé de ponctuations transparentes (poches sécrétrices schizogènes, donnant par transparence un aspect perforé à la feuille) et bordé de petits points noirs (amas cellulaires envahis par des pigments). Le millepertuis possède une odeur balsamique ; sa saveur est aromatique, amère et astringente. On perçoit une odeur aromatique au froissage des feuilles.

Les fleurs sont disposées en grappes corymbiformes au sommet de la tige. Cette partie de la plante fait environ 7 à 11 cm de long sur 5 à 11 cm de large. Les fleurs sont jaunes, hermaphrodites, groupées en cymes. Leur largeur est comprise entre 2 et 3,5 cm.

Le millepertuis tient son nom de l'aspect original de ses feuilles : par transparence ces dernières montrent une multitude de glandes formées d'un amas muriforme de grosses cellules translucides, dépourvues de chlorophylle. Ce sont de petites poches sécrétrices à huile essentielle. Sur la face inférieure, les feuilles présentent quelques petits points noirs, peu visibles, mais très en relief. On les retrouve principalement au bord du limbe et plus nettement sur le bord dentelé des pétales jaunes.



Figure II. 1 : La fleur de Millepertuis

II. Composition chimique

Les techniques actuelles, notamment l'HPLC (High Performance Liquid Chromatography), permettent d'étudier la composition précise du millepertuis. Sept groupes de produits bioactifs ont été identifiés chez *Hypericum perforatum*.

II. A. L'huile essentielle

Les feuilles et les pétales d'*Hypericum perforatum* présentent des poches sécrétrices contenant 0,1 à 0,25 % en masse (toutes les concentrations données dans ce chapitre sont des concentrations en masse) de produits pouvant être obtenus à partir de la plante sèche par distillation : les huiles essentielles. On y trouve entre autres, les monoterpènes α -pinène et β -pinène, myrcène et limonène et des sesquiterpènes. On trouve aussi, venant probablement des surfaces épidermiques et des systèmes de membrane, des hydrocarbures et des alcools à longue chaîne avec des n-alcanes à C16 et C29, et des alcanols en C24, C26 et C28. Après distillation, on trouve le 2-méthyl-octane (16,4 %) et l' α -pinène (10,6 %), mais aussi le méthylbuténol (0,2 %).

II. B. Les métabolites secondaires

II. B. 1. Les dérivés de l'acide hydroxycinnamique

Les phénylpropanoïdes sont des composés biosynthétisés à partir de la phénylalanine. La classe des phénylpropanoïdes (Figure II. 2) est surtout représentée par les esters de l'acide hydroxycinnamique, comme l'acide coumarique et l'acide cafféique. L'acide chlorogénique a aussi été détecté, à une concentration massique inférieure à 1 %. Les propriétés de l'acide chlorogénique sont bien connues : ce composé polyphénolique a une activité régressive sur les lésions prénéoplasiques de la muqueuse du colon.² Les autres présentent des propriétés anesthésiantes lorsqu'ils ont localement appliqués.

² Morioka, T., *et al.*, *Cancer Letters*, 2004, **205**, 2, p 133

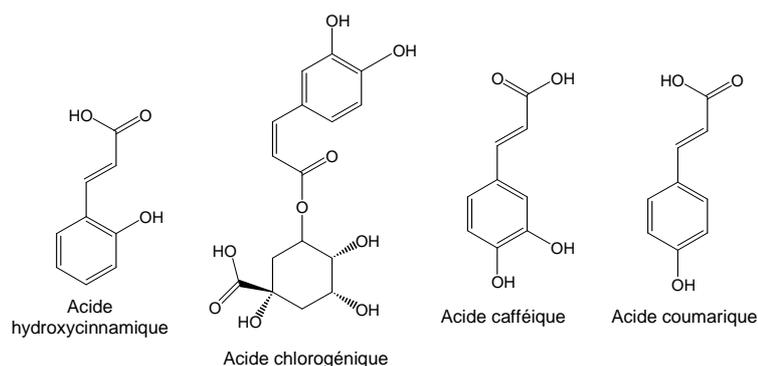


Figure II. 2 : Les principaux phénylpropanoïdes présents dans le Millepertuis

II. B. 2. Les xanthones

Les xanthones sont des constituants typiques de la famille des Guttiferae et on les retrouve chez plusieurs espèces d'*Hypericum*. *H. perforatum* contient la kielcorine avec une concentration de 0,01 % dans les racines et la 1,3,6,7-tétrahydroxyxanthone sous forme de traces dans les feuilles et la tige (Figure II. 3). Certaines xanthones peuvent prévenir les dommages photoinduits sur l'ADN par un photosensibilisant tel que la riboflavine, par le biais du quenching de son état triplet ;³ d'autres sont capables d'inhiber la croissance de cellules cancéreuses.⁴

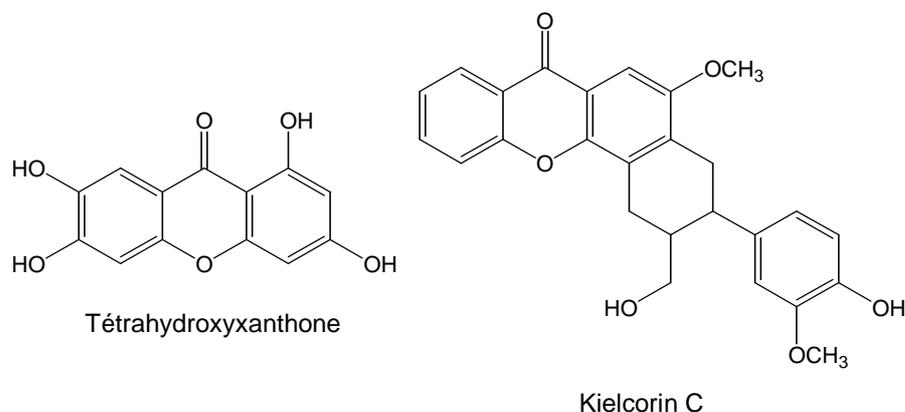


Figure II. 3 : Xanthones du Millepertuis

II. B. 3. Les polyphénols

Les flavonoïdes sont abondants dans la plante (2 à 4 %). On les trouve surtout dans les feuilles (2,24 % à 5,11 %), dans les organes jeunes (0,83 % à 4,58 %) et dans les tiges (0,33 % à 1,67 %). Ils sont représentés par des hétérosides de la quercétine : le quercitroside,

³ Hiraku, Y., et al., *Photochemistry and Photobiology*, 2005, **81**, 1, p 314

⁴ Sousa, E. P., et al., *Helvetica Chimica Acta*, 2002, **85**, 9, p 2862

l'isoquercitroside, l'hypéroside et le rutoside (Figure II. 4). En général, l'hypéroside et le rutoside sont en plus grande quantité que le quercitroside et l'isoquercitroside. L'hypéroside, dont la concentration représente 0,7 % de la plante, est une substance jaune clair que l'on trouve principalement dans les pétales. Les flavonoïdes, selon les conditions, peuvent se comporter comme des antioxydants ou des prooxydants.⁵ Mirossay *et al.* ont montré en 2001 que la quercétine avait un effet protecteur sur la phototoxicité de l'hypéricine (cellules leucémiques promyélocytiques humaines HL60, concentration en hypéricine 10⁻⁵M, concentration en quercétine 10⁻⁵M).⁶ Wilhelm *et al.* ont eux évalué différents flavonoïdes (quercétine, quercitrine, rutin, coumarine) pour le contrôle de la phototoxicité induite sous UV-A (700 mJ/cm²) par les extraits de Millepertuis ; seule la quercitrine (100 µg/mL) a démontré un tel effet en faisant passer la LC50 de l'extrait de Millepertuis de 46 µg/mL à 60 µg/mL.⁷

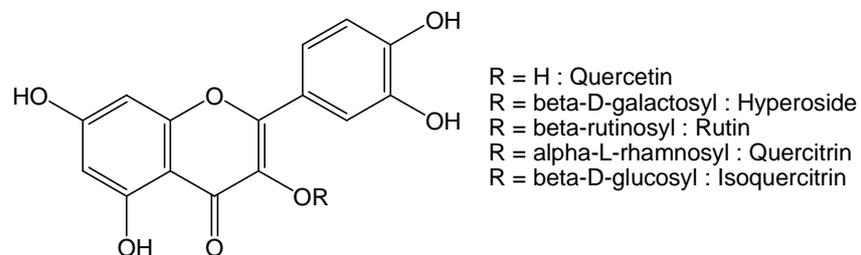


Figure II. 4 : Principaux flavonoïdes présents dans le Millepertuis : dérivés de la quercétine

Il est à noter que les aglycones de type flavone, flavonol et flavanone sont préférentiellement glycosylés aux positions indiquées dans la Figure II. 5.

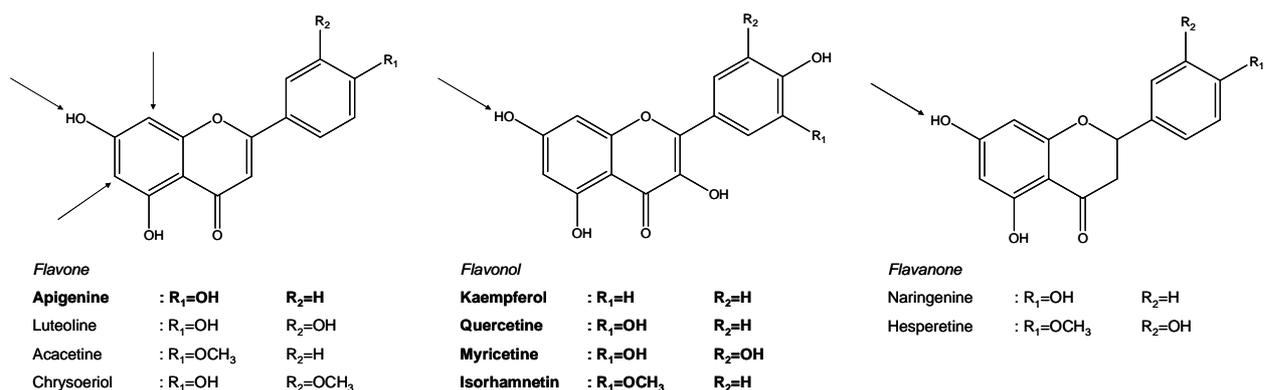


Figure II. 5 : Positions de glycosylation les plus communément observées sur les unités flavone, flavonol et flavanone (les aglycones en gras correspondent à celles répertoriées dans les extraits de Millepertuis)

⁵ Cao, G., *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, **22**, 5, p 749

⁶ Mirossay, A., *et al.*, *Physiological Research Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 2001, **50**, 6, p 635

⁷ Wilhelm, K., *et al.*, *Phytomedicine*, 2001, **8**, 4, p 306

Le Millepertuis renferme deux biflavones (Figure II. 6), la I3,I18-biapigénine (0,1 à 0,5 %) et l'amentoflavone (I3',I18-biapigénine ; 0,01 à 0,05 %). On les trouve principalement dans les fleurs et les boutons floraux. Bien que leurs structures soient assez similaires, ces deux molécules ne présentent pas la même activité. En effet, après avoir constaté que certaines espèces d'*Hypericum* inhibaient *in vitro* la fixation de benzodiazepine, Baureithel *et al.* ont testé plusieurs molécules présentes dans les extraits, parmi lesquelles la biapigénine et l'amentoflavone ; la biapigénine n'a montré aucune activité alors que l'amentoflavone a présenté une IC 50 d'environ 15nM, et que la concentration en amentoflavone dans les extraits pouvait être corrélée avec leur IC50.⁸ Ce composé est donc partiellement responsable des propriétés antidépresseives d'*Hypericum perforatum*, et d'autres espèces d'*Hypericum*.

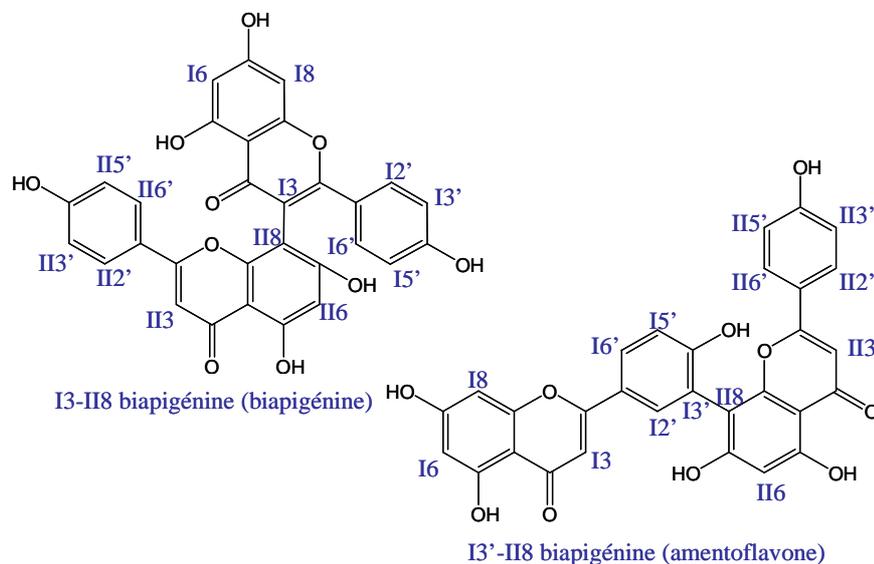


Figure II. 6 : Les biflavones du Millepertuis

Les tanins sont des substances polyphénoliques de structure variée, de saveur astringente, ayant la propriété de tanner la peau. Ils représentent 6,2 à 12,1 % de la drogue. Leur teneur augmente jusqu'à la floraison puis elle diminue et elle diffère selon l'organe : fleurs (4,65 à 8,22 %), feuilles (5,64 à 8,85 %), tige (4,52 à 8,67 %).

Ces tanins sont des procyanidines oligomériques (Figure II. 7), telles que la procyanidine B2 dimérique. Les précurseurs biogénétiques sont identifiés comme la catéchine et l'épicatéchine (flavane-3-ols). Les proanthocyanidines ont des effets antimicrobiens, antioxydants et antiviraux. Leur cytotoxicité envers les cellules cancéreuses (lignées GLC4,

⁸ Baureithel, K., *et al.*, *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 1997, **72**, 3, p 153

Chapitre II : Le Millepertuis

cellules humaines de cancer du poumon, et COLO320, cellules humaines de cancer du colon) a également été évaluée ; les plus toxiques, les proanthocyanidines galloylées un grand nombre de fois, le sont modérément (Figure II. 8). A l'inverse les proanthocyanidines simples présentent une toxicité faible, quelle qu'en soit la stéréochimie.⁹

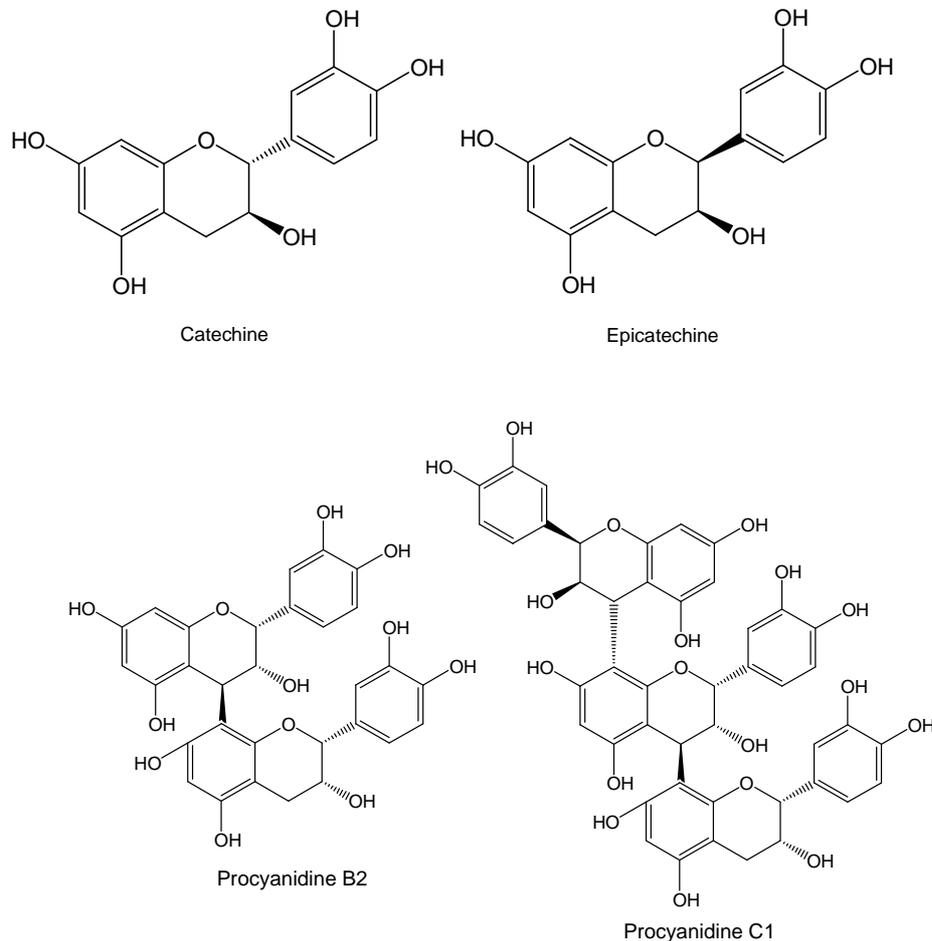


Figure II. 7 : Principaux tanins du Millepertuis

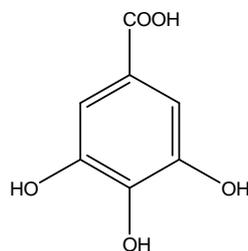


Figure II. 8 : Structure de l'acide gallique

En ce qui concerne les propriétés de ces molécules, il a été prouvé qu'un grand nombre de flavonoïdes inhibent la carcinogénèse dans des modèles d'animaux. Dans ce domaine, la

⁹ Kolodziej, C., et al., *Phytotherapy Research*, 1995, **9**, 6, p 410

première de leurs propriétés à avoir été étudiée est leur pouvoir antioxydant ; en effet certaines de ces molécules sont capables de piéger des espèces oxydantes telles que l'oxygène singulet et des radicaux libres. Les valeurs des constantes de réaction de certains polyphénols avec l'oxygène singulet sont reportées dans le Tableau II. 1 (constante de quenching $k_Q = k_q$ (quenching physique) + k_r (quenching chimique)).

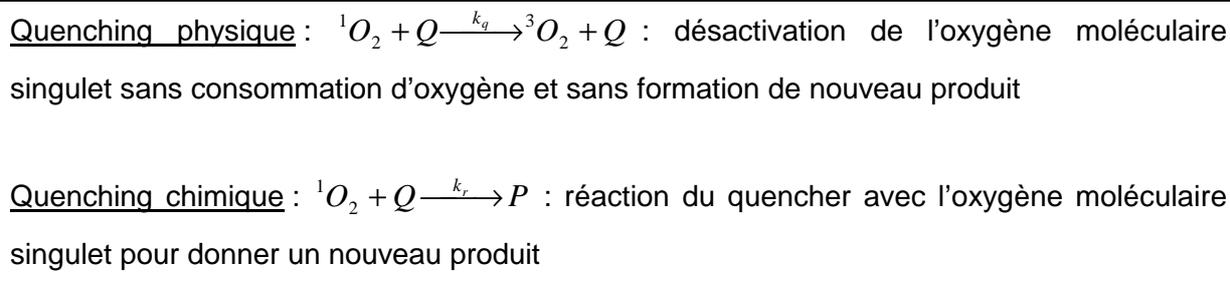


Figure II. 9 : Voies de désactivation de l'oxygène moléculaire singulet

Composé	Constante de réaction k_Q avec 1O_2 ($M^{-1}.s^{-1}$)
Myricetin	5.12×10^8
Quercétine	4.57×10^8
Rutin	1.21×10^8
(+)-Catechine	1.1×10^8
Epicatchine	9.6×10^7
Apigenin	2.84×10^7
Flavonol	5.33×10^6
Naringenin	3.68×10^6
Flavone	$< 3 \times 10^5$

Tableau II. 1 : Constantes de réaction de l'oxygène singulet avec quelques polyphénols^{10,11}

Les flavonoïdes préviennent également la carcinogénèse grâce à leur impact sur la bioactivation de composés cancérigènes. En effet la plupart des agents cancérigènes chimiques nécessitent d'être activés par des enzymes du métabolisme afin d'être capables de se lier à l'ADN et donc de faire muter la cellule. Alors, le composé formé peut soit, initier la carcinogénèse, soit, s'il est transformé en dérivé soluble dans l'eau par conjugaison grâce à des enzymes de métabolisme dit de type II, être rapidement éliminé de l'organisme. Dans ce cadre, il a été montré que certains flavonols du Millepertuis (kaempferol et quercétine) ainsi que la biflavone apigénine, étaient capables d'inhiber les enzymes des cytochromes

¹⁰ Nagai, S., *et al.*, *J. Phys. Chem. B*, 2005, **109**, 9, p 4234

¹¹ Jovanovic, S. V., *et al.*, *Journal of the American Chemical Society*, 1995, **117**, 39, p 9881

P450,^{12,13} lesquels jouent un rôle majeur dans l'activation de certains cancérigènes suspectés, tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques et les amines hétérocycliques. De même, des résultats obtenus sur certaines molécules de la famille des polyphénols, montrent que ces composés sont également capables d'augmenter l'activité de certaines enzymes détoxifiantes et antioxydantes, telles que la glutathione reductase,¹⁴ la glutathione-S-reductase, la catalase¹⁵ et la quinone reductase.¹⁶

II. B. 4. Les caroténoïdes

Les pigments caroténoïdes (Figure II. 10) sont responsables de la coloration jaune des fleurs de Millepertuis. Ce sont des xanthophylles souvent époxydés et estérifiés par l'acide myristique. Ce sont des molécules liposolubles. Ils se répartissent en trois groupes :

- les xanthophylles dihydroxylés comme la lutéine,
- les xanthophylles dihydroxylés et diépoxydés comme la violaxanthine et la lutéoxanthine (isomère monofuranique de la violaxanthine),
- les xanthophylles trihydroxylés et monoépoxydés comme la trolloxanthine et le trollichrome.

Le groupe des xanthophylles époxydés est le plus abondant puisqu'il représente 95 % des pigments liposolubles. Les caroténoïdes sont considérés comme étant des antioxydants (β -carotène : $k_Q = 1.58 \times 10^{10}$ dans l'éthanol)¹⁷, ils pourraient donc tout comme les flavonoïdes et les polyphénols protéger les cellules cancéreuses des dommages oxydatifs dus à l'illumination de l'hypéricine. Cependant Kanofsky *et al.* ont montré sur des cellules K652 (cellules leucémique myélogéniques humaines) que seuls les caroténoïdes cationiques fournissent une photoprotection efficace contre l'hypéricine illuminée, à l'inverse par exemple de la canthaxanthin, caroténoïde naturel.¹⁸

¹² Chaudhary, A., Willett, K. L., *Toxicology*, 2006, **217**, 2-3, p 194

¹³ Kim, H. J., *et al.*, *Biotechnology Letters*, 2000, **V22**, 24, p 1941

¹⁴ Zhang, K., *et al.*, *Biochemical Pharmacology*, 1997, **54**, 9, p 1047

¹⁵ Robaszekiewicz, A., *et al.*, *Cell Biology International*, 2007, **31**, 10, p 1245

¹⁶ Uda, Y., *et al.*, *Cancer Letters*, 1997, **120**, 2, p 213

¹⁷ Nagai, S., *et al.*, *Journal of Physical Chemistry*, 2005, **109**, p 4234

¹⁸ Kanofsky, J. R., Sima, P. D., *Photochemistry and Photobiology*, 2004, **80**, 3, p 507

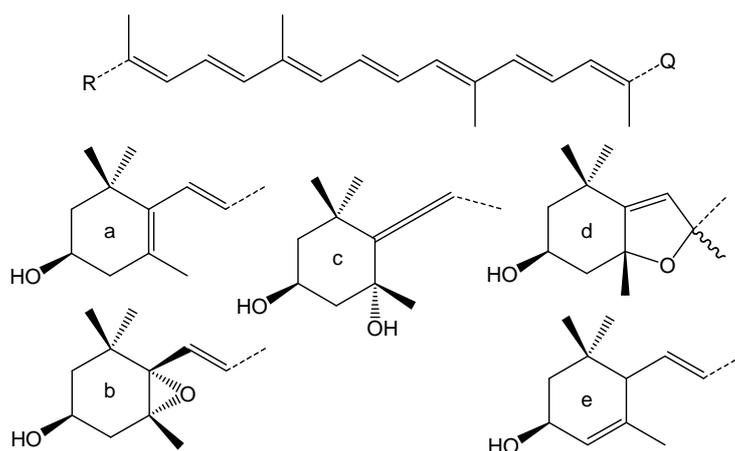
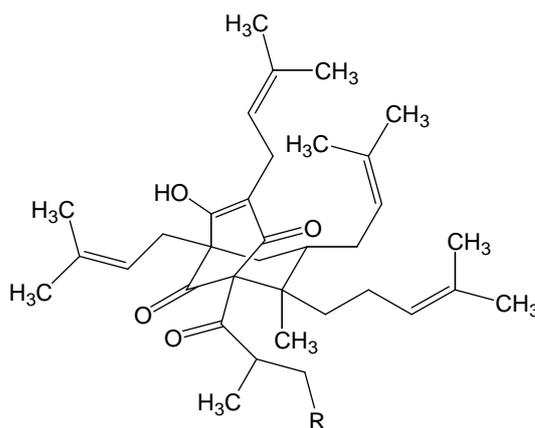


Figure II. 10 : Les principaux caroténoïdes du Millepertuis

(lutéine, R=a, Q=e ; violaxanthine, R=Q=b ; lutéoxanthine, R=b, Q=d ; trollixanthine, R=c, Q=b)

II. B. 5. Les phloroglucinols

Chez *Hypericum perforatum*, deux composés très proches ont été identifiés : l'hyperforine, composé le plus important, et l'adhyperforine portant un groupe méthyl supplémentaire¹⁹ (Figure II. 11). Ces deux substances se localisent exclusivement dans les parties reproductrices de la plante. La quantité totale de chacune de ces substances passe de 2%/0,2% (hyperforine/adhyperforine) dans les fleurs à 4,5%/1,6% (hyperforine/adhyperforine) dans les fruits non mûrs et à 4,4 %/1,8% (hyperforine/adhyperforine) dans les fruits mûrs. La concentration de ces deux molécules varie donc dans la plante en fonction de la quantité de fleurs ou de fruits qu'elle comporte.



R = H : Hyperforine
R = CH₃ : Adhyperforine

Figure II. 11 : L'hyperforine et l'adhyperforine

¹⁹ Sleno, L., et al., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, **20**, 18, p 2641

Après la découverte de la structure chimique de l'hyperforine, il y eut très peu d'études d'évaluation de son potentiel pharmacologique sauf pour ses propriétés antibiotiques (en 1971, des chercheurs russes lui ont associé une action antibactérienne contre les bactéries Gram + comme le staphylocoque doré)²⁰. En effet, l'hyperforine était considérée comme trop instable chimiquement pour jouer un rôle antidépresseur dans les préparations commerciales d'extraits de millepertuis. L'hyperforine, lipophile, se dégrade rapidement au contact de la chaleur, de la lumière, ou de l'oxygène ; ses produits d'oxydation (dans le méthanol) sont présentés sur la Figure II. 14 d'après les données LC-MS obtenues par Fuzzati *et al.*²¹ Ils ont également détectés d'autres produits d'oxydation dans l'hexane, qui ne seront pas décrits dans cette partie. Il est également à noter que d'autres produits d'oxydation ont pu être obtenus en utilisant des agents peroxydiques.²² Un de ses produits de dégradation (oxydation) est le 2-méthyl-3-butén-2-ol retrouvé dans l'huile essentielle. Ce composé est sédatif à des doses de plus de 100 mg. L'hyperforine elle-même inhibe ou module plusieurs systèmes de neurotransmission. Actuellement, ce composé négligé durant des années, est l'objet de recherches poussées, non seulement en ce qui concerne ses propriétés antidépressives, mais également pour de nombreuses autres applications (effets neurologiques, effets antiinflammatoires, antibactériens, antitumoraux et antiangiogéniques,²³ activité antimétastatique^{24,25}).

Récemment, l'utilisation de la 1D et 2D-RMN a permis la mise en évidence d'une nouvelle substance, l'hydropéroxyacidiforine, issue des feuilles et de la tige d'*Hypericum perforatum* ; elle assemble un groupement sesquiterpène sur l'hyperforine (Figure II. 12) ; sa concentration ne serait que de 0,0006 %.

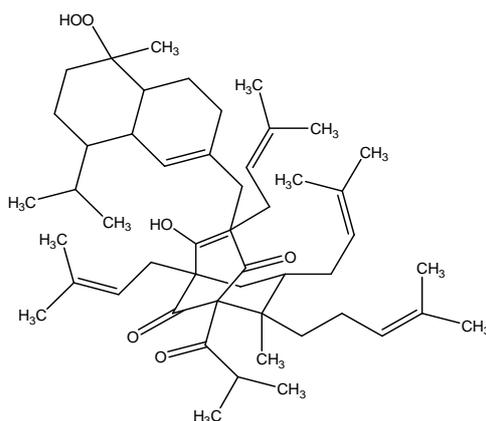


Figure II. 12 : L'hydropéroxyacidiforine

²⁰ Gurevich, A. I., *et al.*, *Antibiotiki*, 1971, **16**, 6, p 510

²¹ Fuzzati, N., *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2001, **926**, 1, p 187

²² Verotta, L., *et al.*, *European Journal of Organic Chemistry*, 2004, **2004**, 6, p 1193

²³ Medina, M. A., *et al.*, *Life Sciences*, 2006, **79**, 2, p 105

²⁴ Donà, M., *et al.*, *Cancer Research*, 2004, **64**, p 6225

²⁵ Dell'Aica, I., *et al.*, *Clinica Chimica Acta*, 2007, **381**, 1, p 69

De plus, Tatsis *et al.* ont détecté pour la première fois dans des extraits de Millepertuis l'hyperfirin et l'adhyperfirin,²⁶ précurseurs biosynthétiques respectifs de l'hyperforine et de l'adhyperforine.²⁷ Enfin, tout récemment, Charchoglyan *et al.* ont caractérisé deux autres dérivés de l'hyperforine présents dans des cultures d'*Hypericum perforatum* : la secohyperforine et l'adsecohyperforine (Figure II. 13)²⁸.

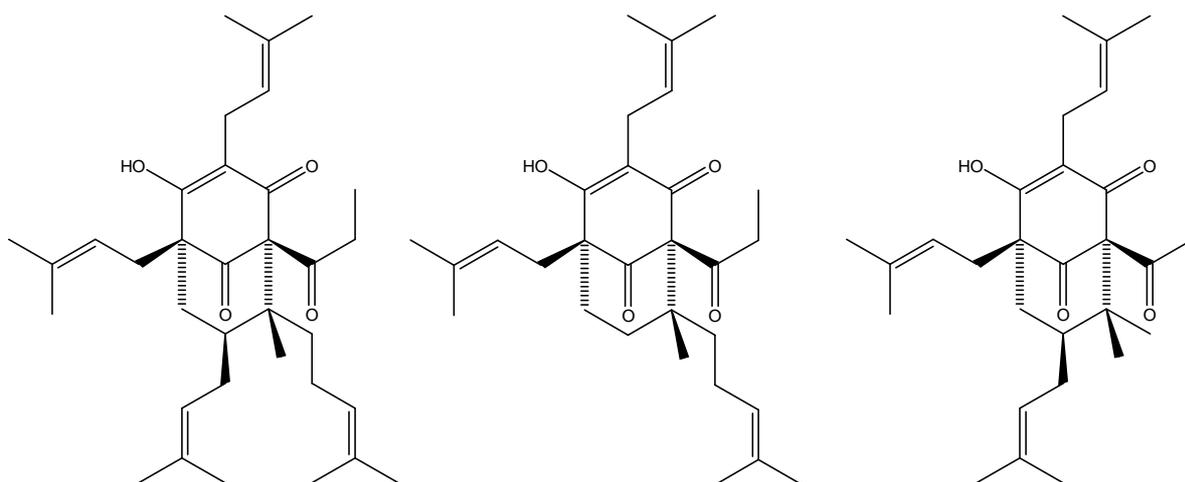


Figure II. 13 : Dérivés de l'hyperforine (à gauche, l'hyperforine ; au milieu, hyperfirine ; à droite, secohyperforine)

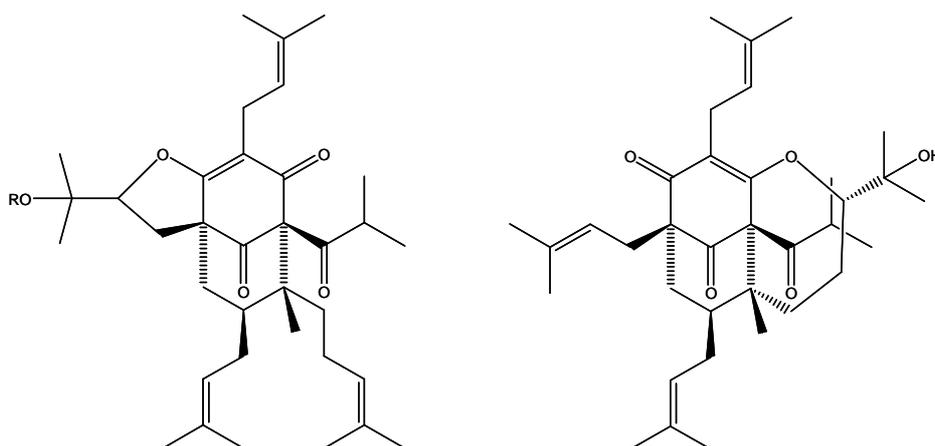


Figure II. 14 : Produits de dégradation de l'hyperforine (à gauche, R=H → Furohyperforine, R=OH → Furohyperforine hydroperoxyde, à droite oxepahyperforine) observés dans le méthanol

²⁶ Tatsis, E. C., *et al.*, *Phytochemistry*, 2007, **68**, 3, p 383

²⁷ Adam, P., *et al.*, *Journal of Medicinal Chemistry*, 2002, **45**, 21, p 4786

²⁸ Charchoglyan, A., *et al.*, *Phytochemistry*, 2007, **68**, 21, p 2670

II. B. 6. Les naphtodianthrones

L'hypéricine, présentée dans le chapitre précédent, est surtout localisée dans les amas ou nodules noirs²⁹ que l'on peut observer sur les fleurs, les bourgeons, les feuilles et les tiges.³⁰ Fields *et al.* ont montré que seules les espèces présentant ces nodules contenaient de l'hypéricine.³¹ L'hypéricine et ses analogues, typiques du genre *Hypericum*, représentent 0.05 à 0.5% en masse des extraits secs (Figure II. 15). Ces composés ont attiré en premier l'attention des phytochimistes en raison de leur coloration rouge intense et de leurs propriétés phototoxiques, constatée sur du bétail.

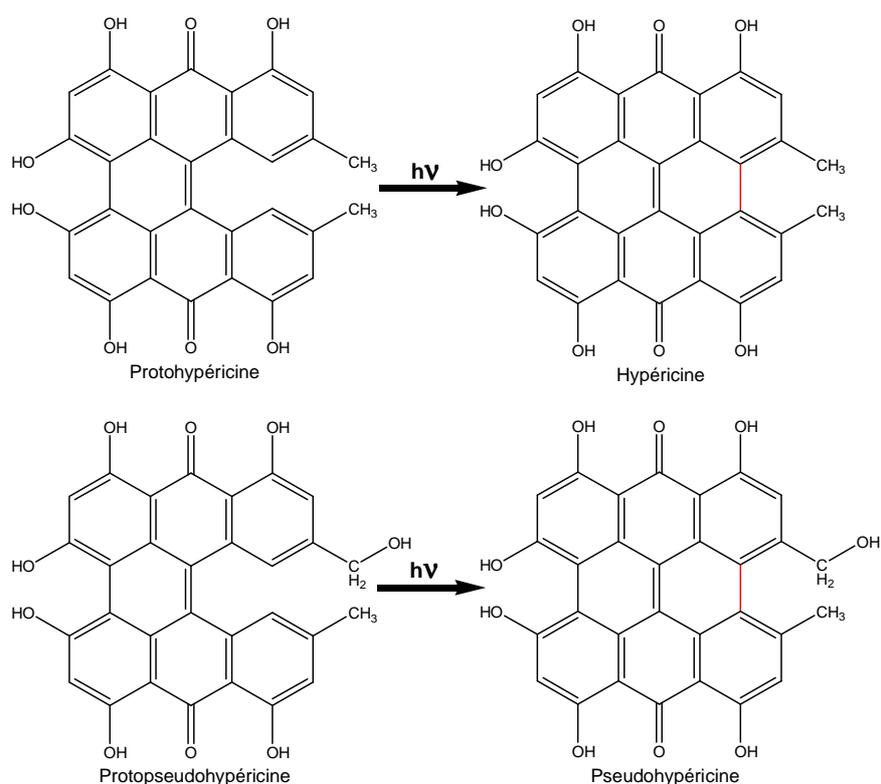


Figure II. 15 : Principaux composés de la famille de l'hypéricine présents dans le Millepertuis

L'émodinanthrone est le précurseur des molécules de ce groupe, dont le schéma de biosynthèse probable est présenté sur la Figure II. 16.³² En effet à l'heure actuelle le mécanisme de biosynthèse de l'hypéricine reste indéterminé ; la principale difficulté réside dans le fait que les précurseurs de l'hypéricine sont des composés tricycliques, des anthrones (forme réduite) ou anthraquinones (forme oxydée), dont l'origine métabolique peut être différente même si leurs structures sont proches.

²⁹ Piovan, A., *et al.*, *Phytochemistry*, 2004, **65**, 4, p 411

³⁰ Ciccarelli, D., *et al.*, *Israel Journal of Plant Science*, 2001, **49**, 8, p 33

³¹ Fields, P. G., *et al.*, *Canadian Journal of Botany*, 1990, **68**, p 1166

³² Walker, L. W., *Communication in Portland State University*, 1999

Les premières substances isolées de la plante sont des proto-dérivés comme la protohypéricine et la pseudoprototypéine (Figure II. 15). Ces proto-dérivés, moins phototoxiques, sont ensuite convertis, sous l'influence de la lumière, en composés stables, l'hypéricine et la pseudohypéricine.³³ Parmi les longueurs d'onde testées en 2001 par Poutaraud *et al.* pour cette phototransformation (480, 502, 524, 570, 590, 615 et 660 nm, exposition d'extraits de bourgeons qui contiennent environ 50% de protopigments), les longueurs d'onde dans le vert ont montré une efficacité particulière.³⁴

La pseudohypéricine est la plus importante des naphthodianthrones d'*Hypericum perforatum* avec une teneur 2 à 4 fois plus forte que l'hypéricine. Ce composé est plus instable que l'hypéricine, notamment en milieu basique (pH=11)³⁵ où elle subit une transformation irréversible (Figure II. 17) ;³⁶ la pseudohypéricine est également moins stable que l'hypéricine en terme de température puisqu'elle se dégrade à 80°C contre 320°C pour l'hypéricine (échantillons Planta Natural Products, Vienne, Autriche) ; cependant la structure des molécules obtenues n'a pas été clairement établie, sauf en ce qui concerne la dégradation en milieu basique conduisant à l'isopseudohypéricine. Les diverses hypothèses émises sont présentées sur la Figure II. 17.³⁷

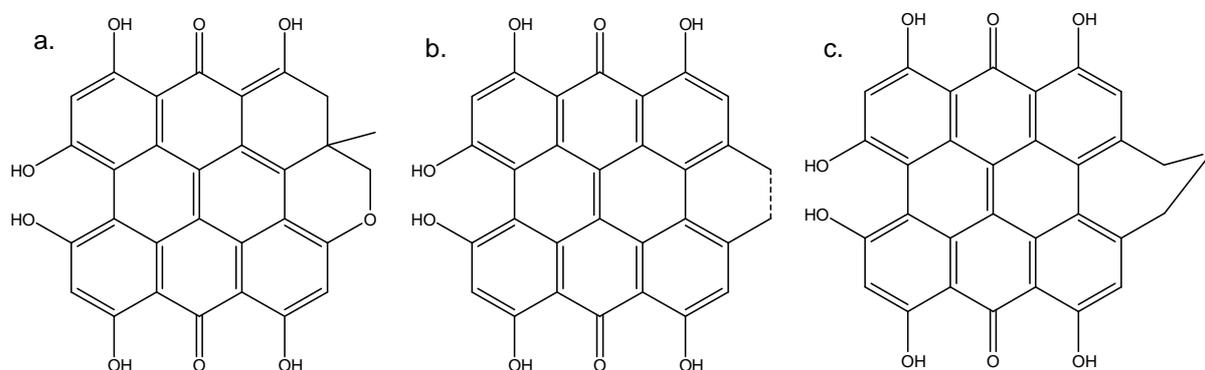


Figure II. 17 : a. : pseudohypéricine dégradée par NaOH 0,5N ; b., c. : hypothèses de produits de dégradation (la liaison en pointillés peut être simple ou double)

La pseudohypéricine présente une structure très similaire à l'hypéricine ; leurs spectres d'absorption sont quasiment superposables. Cependant sa phototoxicité est inférieure à celle de l'hypéricine : sur les cellules de Jurkat (lignée de lymphocytes T immortalisés), l'IC50 de

³³ Schmidt, A. H., *Journal of Chromatography A*, 2003, **987**, 1-2, p 181

³⁴ Poutaraud, A., *et al.*, *Planta Medica*, 2001, **67**, 3, p 254

³⁵ Fourneron, J. D., *et al.*, *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIC - Chemistry*, 1999, **2**, 3, p 127

³⁶ Fourneron, J. D., *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 2003, **44**, 33, p 6285

³⁷ Naït S, Y., Fourneron, J. D., *Monatshefte für Chemie*, 2005, **136**, 2, p 159

la pseudohypéricine vaut 200ng/mL alors que l'IC50 de l'hypéricine est égale à 100ng/mL.³⁸ La protohypéricine, compte tenu de son instabilité à la lumière, a fait l'objet de très peu d'études. Son absorption par les cellules Caco-2 (adénocarcinome de colon humain) semble être équivalente à celle de l'hypéricine,³⁹ en revanche sa phototoxicité propre semble être très limitée.⁴⁰ Ce composé a également été utilisé dans le cadre de synthèses de dérivés hypériciniques, en raison d'une réactivité plus intéressante que l'hypéricine dans le cadre de la formation d'amides.⁴¹

Pour toutes les espèces d'*Hypericum*, la partie contenant le plus d'hypéricines est la fleur.⁴² La concentration de l'hypéricine et de la pseudohypéricine dans la plante va de 0,03 à 0,3 % (pourcentage massique) et dépend d'un grand nombre de paramètres ; le premier étant le stade de développement du millepertuis ;⁴³ en effet la concentration massique en hypéricine, de 0,29% dans les bourgeons primaires, s'élève à 1,04% dans les fleurs tout juste ouvertes, mais chute à 0,11% dans les fruits non mûrs. Les individus à feuilles étroites présentaient de plus fortes concentrations que les individus à larges feuilles.⁴⁴ Concernant la corrélation entre le nombre de nodules noirs sur les fleurs et la quantité d'hypéricine qu'elles contiennent, les avis divergent : Briskin et Gawienowski ont trouvé une forte corrélation linéaire entre ces deux données,⁴⁵ tout comme plus récemment Cirak *et al.*,⁴⁶ cependant d'autres équipes n'ont trouvé aucune corrélation entre la densité surfacique des nodules noirs et la quantité d'hypéricine.^{47,48} Cette incohérence réside dans le fait que les différences métaboliques au sein des glandes sont plus importantes que le nombre de glandes lui-même. De plus, l'accumulation d'émodine, précurseur biosynthétique de l'hypéricine, constatée par Zobayed *et al.* dans les nodules noirs,⁴⁹ semble confirmer que ces derniers sont probablement le siège de la production d'hypéricines.

Afin d'augmenter la quantité d'hypéricines produite par les fleurs de Millepertuis, différentes voies ont été testées. De façon plus générale, la production de métabolites secondaires par un végétal peut être améliorée soit par ajout d'un précurseur biosynthétique de la substance souhaitée, soit par l'ajout d'un éliciteur. Il existe ainsi de nombreux travaux concernant

³⁸ Schempp, C. M., *et al.*, *Planta Medica*, 2002, **68**, 2, p 171

³⁹ Kamuhabwa, A. R., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics*, 1999, **188**, 1, p 81

⁴⁰ Delaey, E. M., *et al.*, *Planta Medica*, 1999, **65**, 8, p 719

⁴¹ Crnolatac, I., *et al.*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005, **13**, 23, p 6347

⁴² Cirak, C., *et al.*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2006, **34**, 1, p 1

⁴³ Tekel'ova, D., *et al.*, *Planta Medica*, 2000, **66**, 8, p 778

⁴⁴ Southwell, I. A., Bourke, C. A., *Phytochemistry*, 2001, **56**, 5, p 437

⁴⁵ Briskin, D. P., Gawienowski, M. C., *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, **39**, 12, p 1075

⁴⁶ Cirak, C., *et al.*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007, **35**, 7, p 403

⁴⁷ Cellarova, E., *et al.*, *Acta Biotechnologica*, 1994, **14**, 3, p 267

⁴⁸ Walker, L., *et al.*, *Canadian Journal of Botany*, 2001, **79**, 10, p 1248

⁴⁹ Zobayed, S. M. A., *et al.*, *Annals of Botany*, 2006, **98**, 4, p 793

l'élicitation : par le taux d'azote présent dans le sol,⁵⁰ par la lumière,⁵¹ le degré d'humidité,⁵² la concentration en dioxyde de carbone,⁵³ la présence d'éliciteurs biotiques,⁵⁴ fongiques⁵⁵ et chimiques (oxyde nitrique,⁵⁶ acide jasmonique ou salicylique,⁵⁷ beta,1-3 glucan, pectine, mannan (polymère de mannose),⁵⁸ chrome VI⁵⁹). L'élicitation par diminution du taux d'azote permet d'augmenter la production d'hypéricines d'un facteur deux, sans modification du rapport pseudohypéricine/hypéricine. Cette augmentation étant observée pour des carences en azote peu sévères (1/20 de la concentration de référence), elle peut être obtenue sans diminution de la biomasse. De même, si l'on augmente l'intensité lumineuse dans la serre de culture, la quantité d'hypéricine produite est plus élevée ; le nombre de glandes sur les plants est alors plus important car ils présentent plus de branches donc plus de fleurs. De plus, si cette augmentation de l'intensité lumineuse est combinée à un fort taux de dioxyde de carbone, elle peut conduire à une augmentation de la production d'hypéricines de 30 fois. Parmi les éliciteurs chimiques, le plus efficace pour la production d'hypéricine semble être l'acide jasmonique, qui permet de la multiplier jusqu'à deux fois.

III. Extraction du matériel végétal

Diverses méthodes peuvent être employées pour extraire les fleurs de Millepertuis, et la composition de l'extrait obtenu varie en fonction des conditions d'extraction.

Concernant l'influence du solvant, on note par exemple que l'hyperforine est plus importante dans des extraits obtenus avec 70 ou 100% d'éthanol que dans des extraits à 50%. Les naphthodianthrones montrent une très faible solubilité dans la plupart des solvants ; l'hypéricine pure est insoluble dans l'eau à la température ambiante. Néanmoins, un peu plus de 40 % (35 % de pseudohypéricine et 6 % d'hypéricine) de la quantité présente est extractible si l'on prépare une infusion du matériel végétal avec de l'eau à 60-80°C.

La température modifie également la composition des extraits ; compte-tenu de la sensibilité des hypéricines à la chaleur, on peut dans certaines conditions obtenir des extraits pauvres en hypéricines à partir d'un matériel végétal pourtant riche.

L'oxygénation du solvant utilisé pour l'extraction peut elle aussi influencer sur la présence de composés tels que l'hyperforine, composé hautement sensible à l'oxydation. Ainsi, sous

⁵⁰ Briskin, D. P., *et al.*, *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, **38**, 5, p 413

⁵¹ Briskin, D. P., Gawienowski, M. C., *Plant Physiology and Biochemistry*, 2001, **39**, 12, p 1075

⁵² Gray, D. E., *et al.*, *Planta Medica*, 2003, **69**, 11, p 1024

⁵³ Mosaleeyanon, K., *et al.*, *Plant Science*, 2005, **169**, 3, p 523

⁵⁴ Sirvent, T., Gibson, D., *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2002, **60**, 6, p 311

⁵⁵ Xu, M. J., *et al.*, *Plant Physiology*, 2005, **139**, 2, p 991

⁵⁶ Xu, M. J., *et al.*, *Chinese Journal of Biotechnology*, 2005, **21**, 1, p 66

⁵⁷ Walker, T. S., *et al.*, *Phytochemistry*, 2002, **60**, 3, p 289

⁵⁸ Kirakosyan, A., *et al.*, *Phytochemistry*, 2000, **53**, 3, p 345

⁵⁹ Tirillini, B., *et al.*, *Fitoterapia*, 2006, **77**, 3, p 164

atmosphère de CO₂ ; on obtient des concentrations en hyperforine pouvant aller jusqu'à 35% en masse dans le cas du CO₂ supercritique.^{60,61}

En 2006, Smelcerovic *et al.* ont comparé diverses méthodes d'extraction, à savoir la sonication directe (sonde à ultrasons plongée dans le liquide) pendant 1h, la sonication indirecte (récipient contenant le liquide plongé dans un bain à ultrasons) pendant 1h, la macération conventionnelle (à température ambiante sans agitation pendant 24h), l'extraction au Soxhlet (24h) et l'extraction par solvant accélérée (4 cycles de 5 minutes).⁶² Il est à noter que l'extraction accélérée par solvant (Accelerated Solvent Extraction ASE) est une technique automatisée, assez récente, pour l'extraction d'échantillons solides et semi-solides et qui est basée sur le même principe que l'extraction Soxhlet. La particularité de cette méthode est d'employer les mêmes solvants organiques qu'en méthode classique mais en travaillant à haute température et sous pression pour accélérer le processus d'extraction et améliorer son efficacité. Leurs résultats montrent que la technique d'extraction par solvant accélérée permet d'extraire un maximum de matériel en un minimum de temps. Cependant des résultats similaires sont obtenus par extraction aux ultrasons (une heure), technique plus simple à mettre en œuvre et moins coûteuse. Il est également à noter que l'extraction aux ultrasons directe permet d'extraire la quasi-totalité du matériel extractible dans les vingt premières minutes et semble plus efficace que l'extraction aux ultrasons en mode indirect. Les différentes méthodes d'extraction testées conduisent à des pourcentages d'hypericine dans l'extrait sec relativement proches, de 0,14 à 0,22%, la proportion la plus faible étant obtenue avec la macération classique.

IV. Formulations de Millepertuis

Dans le commerce, diverses formulations du Millepertuis sont disponibles (Tableau II. 2) ; elles sont soit standardisées par rapport à la quantité d'hypericines, composé au départ considéré comme le principe antidépresseur de la plante, soit par rapport à la quantité d'hyperforine, très instable à moins d'être conservée à très basse température sous atmosphère d'azote.⁶³ En revanche, peu d'informations sont disponibles concernant la proportion dans les extraits des autres catégories de molécules présentes telles que les polyphénols, chlorophylles, caroténoïdes.

⁶⁰ Perfumi, M., *et al.*, *Alcohol and Alcoholism*, 2001, **36**, 3, p 199

⁶¹ Rompp, H., *et al.*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, **21**, 4, p 443

⁶² Smelcerovic, A., *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 7, p 2750

⁶³ Orth, H. C. J., *et al.*, *Pharmazie*, 1999, **54**, 1, p 76

Formulation	Nom médicaments	Préparation	Composition
LI 160	Jarsin®	MeOH 80%	0.3% d'hypéricines 1.5% d'hyperforine 6% de flavonoïdes
Ph-50			0.3% d'hypéricines 4.5% d'hyperforine 50% de flavonoïdes
WS 5572		EtOH 60%	5% d'hyperforine
WS 5573			0.5% d'hyperforine
WS 5570	Neuroplant®		0.12-0.28% d'hypéricines 3-6% d'hyperforine
STEI300		EtOH 60%	0.2-0.3% d'hypéricines 2-3% d'hyperforine

Tableau II. 2 : Principales formulations du Millepertuis (traitement de la dépression)

V. Stabilité des formulations de Millepertuis

V. A. Stabilité du matériel végétal

Bilia *et al.* ont évalué en 2001 la stabilité à la lumière et à la chaleur de formulations galéniques de Millepertuis.⁶⁴

Ils ont comparé l'extrait de Millepertuis brut, l'extrait de Millepertuis après ajout de stéarate de magnésium (lubrifiant de compression couramment utilisé pour la fabrication des comprimés) et de lactose (diluant qui permet d'ajuster le titre des extraits végétaux dans les comprimés) et l'extrait de Millepertuis après ajout de lactose, de stéarate de magnésium, d'acides ascorbique et citrique (acides ascorbique/citrique – 200 :1, proportion massique des antioxydants : 2,85 %)

Ces différents extraits ont été placés dans des gélules de couleurs différentes, donc laissant passer plus ou moins la lumière, et ils ont étudié la sensibilité des échantillons à la chaleur et à la lumière visible, ainsi que les propriétés de dissolution des extraits secs ainsi conservés. La Figure II. 18 présente les résultats obtenus pour une conservation des gélules à 25°C (taux d'humidité : 60%) et à 40°C (taux d'humidité : 75%) pendant trois mois.

⁶⁴ Bilia, A. R., *et al.*, *International Journal of Pharmaceutics*, 2001, **213**, 1-2, p 199

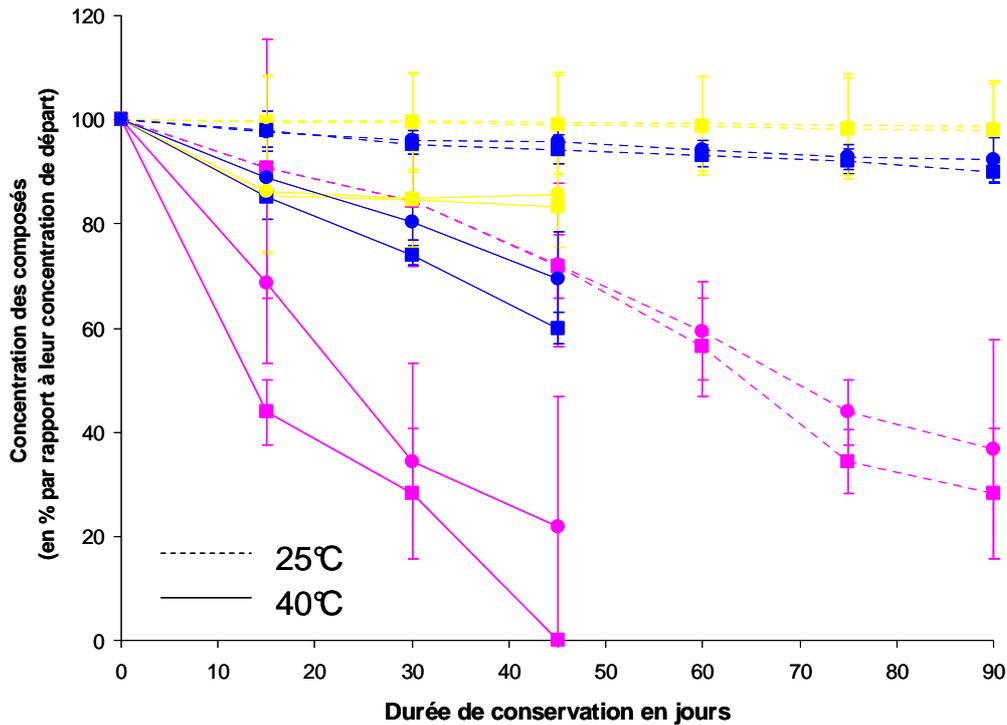


Figure II. 18 : Evolution de différentes formulations galéniques de Millepertuis (jaune : flavonols, bleu : hyperforines, magenta : hypéricines, ronds : Millepertuis+lactose+stéarate de Mg, carrés : Millepertuis+lactose+stéarate de Mg+antioxydants)

Cette expérience ne reproduit pas exactement les conditions de conservation utilisées dans notre étude : en effet, nous avons travaillé à partir de fleurs de Millepertuis séchées qui ont été progressivement extraites au fur et à mesure des besoins. Cependant, les résultats obtenus par Bilia *et al.* permettent notamment de mettre en évidence l'instabilité relative des composés phénoliques (flavonols) lorsqu'ils sont conservés à 40°C. Il est cependant à noter que l'hyperoside et le rutin étaient très majoritaires au sein des flavonols que contenait le matériel utilisé (respectivement 33 et 50% de la quantité totale de flavonols) ; ces composés sont des glycosides aisément hydrolysables et donc plus sensibles aux conditions de conservation que des flavonols non glycosylés. Les hypéricines et hyperforines se dégradent également relativement vite et de façon plus marquée à 40°C qu'à 25°C ; avec à 25°C une dégradation des hyperforines quasi inexistante, alors que les hypéricines sont tout de même dégradées significativement. Il est également important de noter que dans cette étude, l'ajout d'antioxydants n'a pas permis de réduire la dégradation des classes de composés étudiés.

La dégradation de matériel sec étalé en couche (<3mm) et exposé pendant 7h à de la lumière blanche (176 Klux, 75,8 W/m²) a également fait l'objet d'investigations (Figure II. 19).

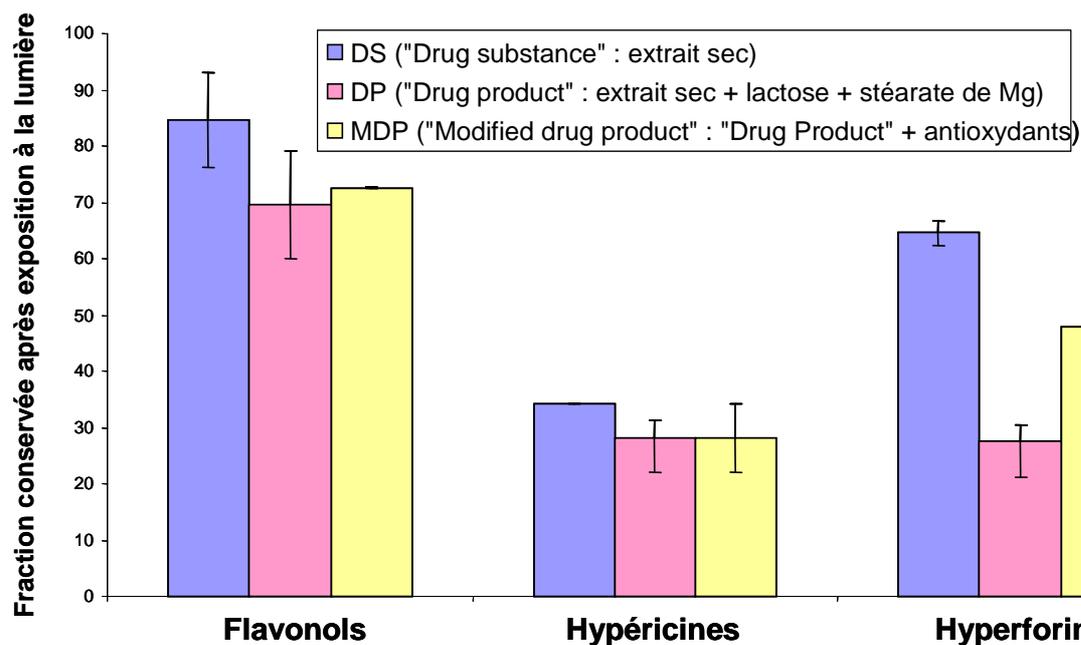


Figure II. 19 : Photodégradation des flavonols, hypéricines et hyperforines

Ces résultats, obtenus par l'équipe précédemment citée, montrent une photosensibilité de tous les composés étudiés. Parmi les trois formulations testées, la substance brute (DS) est la plus stable. La dégradation des flavonols est moins marquée que celle des deux autres classes de produits ; la dégradation observée pour l'hypéricine est la plus importante et n'est pas modifiée par l'ajout d'antioxydants, alors que dans le cas de l'hyperforine, cet ajout permet d'obtenir une meilleure conservation.

Au vu de ces résultats, nous avons choisi de conserver les fleurs séchées à une température d'environ 20°C et à l'abri de la lumière, dans une pièce climatisée subissant peu d'écart de température. Au cours de nos travaux, nous n'avons pas constaté de modification importante du contenu en hypéricines de notre stock de fleurs.

V. B. Stabilité des solutions

En ce qui concerne les phénomènes de dégradation observés en solution, Liu *et al.* ont étudié les transformations subies par l'hypéricine, la pseudohypéricine et l'hyperforine (ainsi que trois de leurs analogues : la protohypéricine, la protopseudohypéricine et l'adhyperforine)⁶⁵ dans des solutions méthanoliques (après 10 minutes de barbotage à l'azote) à pH 2 et 7, exposées ou non à la lumière (lumière blanche). Leurs résultats

⁶⁵ Liu, F., *et al.*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, **37**, 2, p 303

montrent que les quatre hypéricines sont très stables à pH 7 et à l'abri de la lumière. A l'inverse, la transformation des protopigments est très rapide si la solution à pH 7 est exposée à la lumière. En revanche, même après 50 heures à la lumière, la quantité d'hypéricine et de pseudohypéricine reste stable. A l'inverse, ces deux composés sont instables à pH acide (diminution de moitié après 35 heures). Concernant les hyperforines, Liu *et al.* ont montré qu'elles sont à la fois stables à pH 2 et 7 mais qu'elles sont fortement instables à la lumière, la photodégradation étant plus marquée à pH 7 qu'à pH 2.

VI. Effets coopératifs entre les composés présents dans le Millepertuis

VI. A. Propriétés antidépressives de la plante

Le mécanisme antidépresseur du Millepertuis n'est pas clairement élucidé et fait encore actuellement l'objet de nombreuses investigations ; cependant plusieurs composés présents dans les extraits de Millepertuis ont déjà montré des effets inhibiteurs sur les enzymes dégradant les neurotransmetteurs, ainsi que des affinités pour certains récepteurs impliqués dans les mécanismes de la dépression.⁶⁶

Il y a également de nombreuses études montrant que les dommages neurologiques induits par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) jouent un rôle important dans la pathophysiologie de la dépression. En effet l'existence de membranes contenant des acides gras polyinsaturés (oméga 3) au niveau du cerveau en fait un organe très sensible aux dommages oxydatifs ; il existe chez les sujets normaux des mécanismes capables de contrecarrer les effets des ROS, cependant ils perdent souvent en efficacité chez les sujets atteints de dépression. Chez ces sujets, il est donc important de rétablir les mécanismes antioxydants, c'est pourquoi de nombreuses études récentes visent à évaluer le pouvoir antioxydant des antidépresseurs utilisés actuellement.⁶⁷ L'extrait de Millepertuis, en temps que plante contenant des antioxydants, notamment les flavonoïdes, est donc susceptible d'avoir des effets bénéfiques sur le système neurologique, en plus des effets antidépresseurs. Ainsi, Breyer *et al.* ont montré en 2007 un effet protecteur de l'extrait de Millepertuis vis-à-vis de la mort cellulaire induite par le glutamate sur des cellules neuronales HT22 (dérivées de l'hippocampe de souris).⁶⁸

⁶⁶ Mennini, T., Gobbi, M., *Life Sciences*, 2004, **75**, 9, p 1021

⁶⁷ Eren, I., *et al.*, *Neurochem Research*, 2007, **32**, 3, p 497

⁶⁸ Breyer, A., *et al.*, *Phytomedicine*, 2007, **14**, 4, p 250

VI. B. Cytotoxicité de l'hyperforine

Un autre aspect coopératif au sein des extraits de Millepertuis concerne la cytotoxicité de l'hyperforine. Ce composé, essentiellement connu pour être responsable des propriétés antidépessives de la fleur de Millepertuis, a également fait l'objet d'études concernant le traitement des cancers puisque qu'il peut conduire dans certaines conditions à la mort des cellules par apoptose.⁶⁹ Dans le cas où les cellules sont traitées de façon conjointe avec de l'hypéricine, un effet de synergie est observé entre les deux composés (Figure II. 20).⁷⁰

Dans le cas des cellules non illuminées, on constate en effet, que le pourcentage d'inhibition constaté avec le mélange [hypéricine + hyperforine] est supérieur à la somme de ceux obtenus avec les composés purs. En revanche l'effet de synergie n'est pas constaté dans le cadre de la phototoxicité.

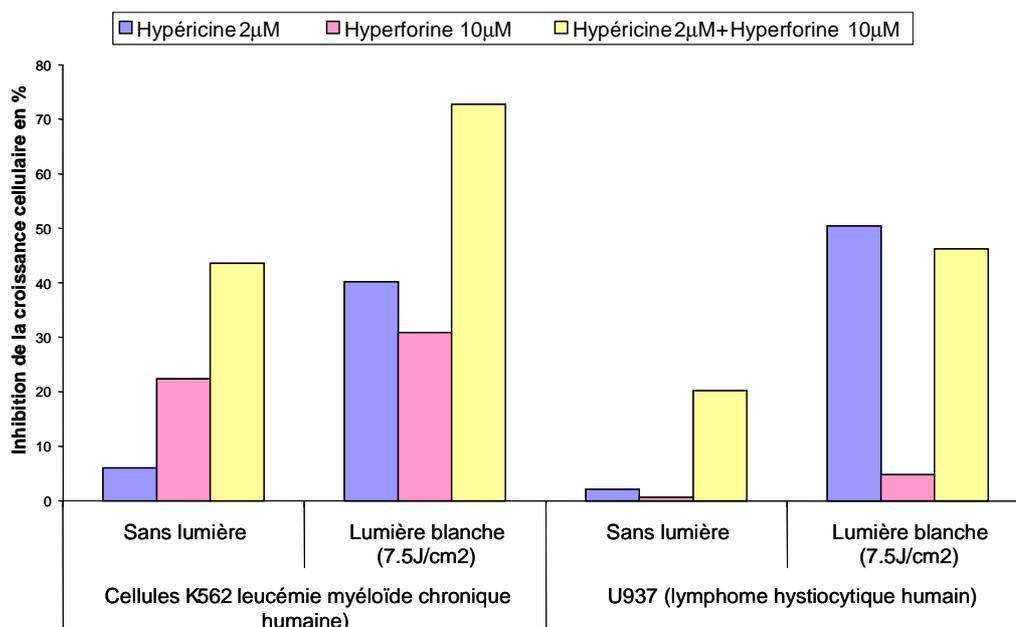


Figure II. 20 : Effet de l'hypéricine seule, de l'hyperforine seule, et de l'administration conjointe des deux molécules sur deux lignées de cellules cancéreuses

VI. C. Solubilité aqueuse de l'hypéricine

En 1998, Butterweck *et al.* montrent que si l'on extrait l'hypéricine et la pseudohypéricine de la fraction du Millepertuis active contre la dépression et que l'on administre aux rats ces composés suspendus dans l'eau, leur effet s'en trouve amoindri par rapport à celui de la

⁶⁹ Donà, M., *et al.*, *Cancer Research*, 2004, **64**, p 6225

⁷⁰ Hostanska, K., *et al.*, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, **56**, 1, p 121

fraction initiale. Ils ont également montré que la solubilité de ces deux composés était remarquablement améliorée par une fraction contenant des procyanidines, et notamment la procyanidine B2, qui était également présente dans la fraction active de départ.⁷¹

Ils ont poursuivi leurs recherches en montrant que certains composés phénoliques présents dans le Millepertuis étaient capables de modifier le coefficient de partage octanol/eau de l'hypéricine. Parmi les composés testés (quercitrine, quercétine, rutin, hypéroside), le composé phénolique qui semble être le plus efficace est l'hypéroside ; il permet en effet d'augmenter de 400 fois la concentration de l'hypéricine dans la phase aqueuse pour un rapport de concentration hypéroside/hypéricine valant 5 :1.⁷²

Cette propriété n'est pas sans conséquences sur la concentration plasmatique de l'hypéricine lors de l'injection de Millepertuis. En effet, en mesurant par RP-HPLC couplée à la détection par fluorescence la concentration plasmatique d'hypéricine chez le rat, Butterweck *et al.* ont montré que la procyanidine B2 permettait d'augmenter de 51% la concentration plasmatique maximale d'hypéricine, comparé à une injection d'hypéricine pure (augmentation de 24% dans le cas de l'hypéroside). Cependant, la concentration plasmatique maximum d'hypéricine est observée 360 minutes après l'administration dans le cas de la procyanidine B2, et après 150 minutes seulement dans le cas de l'hypéroside (dans le cas de l'hypéricine seule ce maximum est observé après 270 minutes).⁷³

L'équipe de Butterweck a également montré que lors d'une prise chronique d'hypéricine (0,1 mg/kg) pendant deux semaines on ne constate pas de différences d'efficacité (mesurée par le test de la nage forcée) entre la prise d'hypéricine seule et la prise d'hypéricine associée à la procyanidine B2.⁷⁴

VII. Propriétés photosensibilisatrices du Millepertuis

Les propriétés photosensibilisatrices du Millepertuis ont été largement observées chez les bovins qui en consommaient des doses importantes (dose journalière estimée : jusqu'à 7g par jour). Les animaux ont présentés des symptômes phototoxiques de types cloques et brûlures, pouvant parfois entraîner la mort. Cependant, les espèces ne sont pas sur un pied d'égalité concernant le danger de l'absorption de fleurs de Millepertuis ; en effet Bourke *et al.* ont montré par exemple que les moutons pigmentés étaient plus résistants que ceux protégés par une laine épaisse, tels que les moutons Mérinos.⁷⁵

⁷¹ Butterweck, V., *et al.*, *Planta Medica*, 1998, **64**, 4, p 291

⁷² Jurgenliemk, G., Nahrstedt, A., *Die Pharmazie*, 2003, **58**, 3, p 200

⁷³ Butterweck, V., *et al.*, *Planta-medica*, 2003, **69**, 3, p 189

⁷⁴ Butterweck, V., *et al.*, *Pharmacopsychiatry Supplement*, 2001, **34**, 1, p S2

⁷⁵ Bourke, C. A., White, J. G., *Australian Veterinary Journal*, 2004, **82**, 11, p 707

Les doses utilisées en médecine humaine sont environ 50 fois plus faibles ce qui élimine, en principe, les complications liées à la phototoxicité.⁷⁶ Toutefois, il est conseillé aux patients qui absorbent plus de 100mg de principe actif par jour, d'éviter toute exposition solaire prolongée. De même, l'huile rouge obtenue en faisant macérer au soleil les fleurs de Millepertuis, réputée pour son efficacité contre les coups de soleil, ne doit être utilisée qu'après l'exposition au soleil.⁷⁷

La phototoxicité des extraits de Millepertuis a également été utilisée afin de soigner certaines maladies de la peau. En effet en 1999, Bernd *et al.* ont montré que cette phototoxicité s'exerçait sur les kératinocytes, dont la prolifération anormale est responsable du psoriasis.⁷⁸ L'utilisation des propriétés photodynamique du Millepertuis dans le cadre de la thérapie des cancers a été envisagée pour la première fois en 2002 par Hostanska *et al.*, qui ont étudié la cytotoxicité et la photocytotoxicité (lumière blanche) d'extraits aqueux de Millepertuis sur différentes lignées cellulaires, à la fois cancéreuses et normales. Leurs résultats montrent que les extraits de Millepertuis conduisent à l'apoptose des cellules en l'absence de lumière, et que cette toxicité est accrue lorsque les cellules sont exposées à la lumière blanche. La comparaison qu'ils ont effectuée entre l'extrait de fleurs séchées et l'extrait de fleurs fraîches, qui contenait environ 47% d'hyperforine en plus, leur a permis de déterminer que la valeur de GI50 (concentration qui conduit à une inhibition de la croissance cellulaire de 50%) pour l'extrait de fleurs fraîches était clairement inférieure à la valeur trouvée pour l'extrait de fleurs séchées, ce qui leur a permis de suggérer que l'hyperforine était au moins partiellement responsable de la toxicité du Millepertuis en l'absence de lumière.⁷⁹

⁷⁶ Schempp, C. M., *et al.*, *Phytotherapy Research*, 2003, **17**, 2, p 141

⁷⁷ Schempp, C. M., *et al.*, *Photodermatology Photoimmunology Photomedicine*, 2000, **16**, 3, p 125

⁷⁸ Bernd, A., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 1999, **69**, 2, p 218

⁷⁹ Hostanska, K., *et al.*, *Die Pharmazie*, 2002, **57**, 5, p 323

Conclusions du Chapitre :

Les nombreuses données bibliographiques et essais cliniques réalisés concernant le Millepertuis en font un produit sûr et sans danger pour l'organisme lorsqu'il est utilisé dans les conditions optimales. Son utilisation en automédication pour le traitement des dépressions légères à modérées est désormais reconnue dans tous les pays. Les extraits de Millepertuis ont dans ce cadre fait l'objet de nombreuses études ayant montré une stabilité satisfaisante des formulations existant pour cette plante, et mettant en avant la simplicité des techniques d'extraction à mettre en œuvre pour en obtenir dans des proportions optimales les composés les plus actifs. De plus, nous avons constaté d'après nos recherches bibliographiques qu'il existe au sein des extraits de Millepertuis des effets de synergie très intéressants entre les composés, notamment en ce qui concerne les propriétés antidépressives du mélange, de la cytotoxicité et de la solubilité aqueuse de composés lipophiles.

L'utilisation de ses propriétés photodynamiques pour le traitement de certaines affections de la peau, telles que le psoriasis ou certains cancers de la peau, fait actuellement l'objet d'essais cliniques de phase I, et les recherches bibliographiques que nous avons menées montrent que les extraits de Millepertuis sont également de plus en plus étudiés en tant qu'agents photosensibilisateurs potentiellement utilisables pour le Photodiagnostic et la Thérapie Photodynamique.

Cependant, il manque certaines données qui pourraient permettre de comprendre le comportement de ces extraits dans le cadre de ce type de traitements, et notamment :

- des résultats concernant la capacité des molécules photoactives reconnues dans le Millepertuis (naphthodianthrones) à générer de l'oxygène moléculaire singulet lorsqu'elles se trouvent dans l'extrait végétal par rapport aux mêmes composés utilisés purs,
- des données sur l'internalisation de ces mêmes composés photoactifs par les cellules cancéreuses mises en contact avec des extraits de Millepertuis,
- une mise en corrélation des résultats de cytotoxicité et des concentrations en hypéricines des extraits étudiés,
- une identification systématique de tous les composés internalisés par les cellules cancéreuses mises en contact avec le Millepertuis, afin d'expliquer les effets constatés sur les cellules et sur l'efficacité des agents photosensibles reconnus,
- une comparaison entre le mécanisme d'action des extraits de Millepertuis et celui de l'hypéricine pure.

Ce travail de thèse vise à préciser ces différents paramètres par le biais de l'utilisation de diverses techniques d'analyse qui vont être précisées dans le Chapitre III.

Chapitre III

Matériels et méthodes

INTRODUCTION	61
I. LE MATERIEL VEGETAL ET LES COMPOSES DE REFERENCE	62
I. A. Mode de culture des fleurs de Millepertuis	62
I. B. Protocole d'extraction des fleurs	62
II. LA QUANTIFICATION DES HYPERICINES DANS LES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS	63
II. A. Par spectrophotométrie UV-Visible.....	63
II. B. Par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection UV-Visible (CLHP-UV).....	67
III. LA SPECTROMETRIE DE MASSE	68
III. A. Le MALDI-TOF.....	68
III. A. 1. La Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI).....	68
III. A. 2. La Spectrométrie de Masse à Temps de Vol.....	71
III. B. La Spectrométrie de Masse Très Haute Résolution	74
III. B. 1. Les techniques d'ionisation utilisées	74
III. B. 1. i. Le ProMALDI	74
III. B. 1. ii. L'ionisation par Electrospray	74
III. B. 2. La FTICRMS.....	78
III. B. 2. i. Principe et description de l'appareillage	78
III. B. 2. ii. Performances	83
III. B. 2. iii. Séquence typique	84
III. B. 3. Techniques de fragmentation.....	85
III. B. 3. i. SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation-Collision-Induced Dissociation)	85
III. B. 3. ii. L'IRMPD (Infrared MultiPhoton Dissociation)	86
IV. L'ETUDE DES PROPRIETES DE L'EXTRAIT DE MILLEPERTUIS	87
IV. A. La quantification de la production d'oxygène moléculaire singulet.....	87
IV. B. L'activité de l'extrait de Millepertuis en milieu cellulaire.....	89
IV. B. 1. L'internalisation des naphthodianthrones par les cellules cancéreuses	89
IV. B. 1. i. Protocole d'incubation et d'extraction des cellules.....	89
IV. B. 1. ii. Microscopie de fluorescence	89
IV. B. 2. La photocytotoxicité des extraits de Millepertuis.....	91
IV. B. 2. i. L'illumination laser des cellules cancéreuses.....	91
IV. B. 2. ii. La détermination du taux de mortalité	91

Introduction :

Nous avons dirigé nos recherches selon deux axes, le premier étant la caractérisation physicochimique des extraits de Millepertuis sélectionnés pour l'étude, et le second une évaluation de leurs propriétés dans l'optique d'une utilisation pour la photothérapie des cancers : propriétés photochimiques en solution (et notamment production d'oxygène moléculaire singulet) et comportement en milieu cellulaire (accumulation intracellulaire des composés photoactifs, localisation, cytotoxicité et phototoxicité).

Dans le cadre de l'analyse par spectrométrie de masse de nos extraits, nous avons utilisé les trois techniques que sont la Désorption/Ionisation Laser Assistée (ou non) par Matrice couplée à la Spectrométrie de Masse à Temps de vol MALDI-TOF, le MALDI couplé à la Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions à Transformée de Fourier (FTICRMS), et enfin l'Ionisation par Electronébullition (ESI) couplée à la FTICRMS. Ces trois techniques ont été employées non seulement dans un but de caractérisation des extraits que nous avons étudiés, mais également dans une volonté d'en définir les potentialités pour l'analyse d'extraits végétaux. En effet, si l'ESI est couramment employé pour ioniser les molécules naturelles, c'est souvent dans le cadre de couplage avec la Chromatographie Liquide qui permet en plus d'identifier les composés par leur temps de rétention, et l'utilisation de cette technique d'ionisation en injection directe est peu répandue. Dans notre cas la très haute résolution de la FTICRMS devrait permettre, avec des résolutions suffisantes, d'obtenir la formule brute des composés, et des techniques de fragmentation telles que l'IRMPD ou le SORI-CID peuvent confirmer les structures proposées, sous réserve de la présence d'isomères. Quant aux techniques d'ionisation faisant intervenir une interaction laser-matière, LDI et MALDI, elles n'avaient à notre connaissance jamais été utilisées pour la caractérisation des extraits de Millepertuis.

Ces techniques analytiques ont également été utilisées afin de caractériser les molécules internalisées par les cellules cancéreuses mises en contact avec un extrait de Millepertuis ; ces expériences s'insèrent dans une volonté de définir le mécanisme d'action du Millepertuis sur ces cellules dans le cadre d'un traitement photodynamique, et viendront compléter voire expliquer certains résultats obtenus parallèlement concernant l'internalisation des composés photoactifs et la toxicité constatée pour les extraits de Millepertuis sur les cellules AY27 (cellules tumorales de la vessie) à l'obscurité et à la lumière.

Les divers protocoles et instruments analytiques utilisés au cours de cette étude, que ce soit concernant la préparation des extraits étudiés, leur caractérisation ou l'étude de leurs propriétés en milieu cellulaire, vont être décrits dans ce chapitre.

I. Le matériel végétal et les composés de référence

I. A. Mode de culture des fleurs de Millepertuis

Les fleurs de Millepertuis utilisées au cours de cette étude ont été cultivées par le Docteur Anne Poutaraud de l'INRA de Colmar (France). Les plants, originaires de l'Est de la France, ont été replantés dans de la terre argileuse à une densité de 5 plants par m². Ils ont été collectés une fois atteinte une hauteur de 60 cm. Les échantillons ont été séchés pendant 4 heures dans un four ventilé à 60°C et placés dans des flacons conservés à l'abri de la lumière.

I. B. Protocole d'extraction des fleurs

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, la composition des extraits de Millepertuis varie grandement en fonction des conditions d'extraction, et notamment du solvant et de la température. La technique que nous avons choisie était l'extraction par ultrasons en mode indirect ; elle nous a permis d'une part d'effectuer simultanément l'extraction de plusieurs échantillons, et d'autre part d'éviter les phénomènes de contamination chimique afférents à l'utilisation d'une sonde à ultrasons.

L'hypéricine est une molécule peu soluble dans la plupart des solvants organiques ($s = 7,3 \cdot 10^{-5}$ mol dans MeOH) ; cette faible solubilité peut être améliorée par l'ajout de cosolvant ($s = 6,3 \cdot 10^{-4}$ mol dans MeOH/pyridine-99/1)¹. La molécule est quasiment insoluble dans l'eau et dans les solvants apolaires (toluène, tétrachlorure de carbone, chloroforme, hexane, cyclohexane), où elle forme des agrégats violets, visibles à l'œil nu si la concentration est élevée (10⁻³M).

Concernant le solvant d'extraction de nos fleurs de Millepertuis, nous avons donc écarté la possibilité d'utiliser des solvants apolaires. Pour la même raison l'éventualité de réaliser les extraits dans l'eau a été écartée. Nous avons donc porté notre choix sur le méthanol :

- ce solvant permet d'extraire de façon satisfaisante les molécules de la famille des naphthodianthrones ;
- bien que ne permettant pas d'atteindre des concentrations en hypéricines compatibles avec une utilisation en milieu biologique avec une proportion de solvant organique faible (en

¹ Wirz, A., *et al.*, *Die Pharmazie*, 2002, **57**, 8, p 543

Chapitre III : Matériels et méthodes

général pour les études *in vitro* jusqu'à 1% en volume²), la température d'ébullition basse du méthanol (65°C à pression atmosphérique) permettra par la suite de l'évaporer et de le reprendre dans le DMSO qui permet de dissoudre des concentrations importantes d'hypéricine (jusqu'à 10⁻²M) ;

- ce solvant est compatible avec la plupart des instruments analytiques dont nous disposons au Laboratoire.

Les extraits ont donc été réalisés en plaçant environ 5 fleurs de Millepertuis dans un volume de 10 mL de méthanol ; l'échantillon était ensuite placé dans un bain à ultrasons pendant 30 minutes, puis le solvant était retiré et les fleurs extraites encore deux fois selon le même protocole, avec un temps d'attente de 15 minutes entre chaque extraction, pour éviter un échauffement de la solution. A la troisième extraction, la coloration rosée de la solution est faible, ce qui montre que la plus grande partie des hypéricines a été extraite. Les trois solutions d'extraction sont réunies et évaporées sous vide ; le résidu est ensuite repris dans environ 1mL de DMSO.

Par ailleurs, l'activité du Millepertuis en milieu cellulaire a également été évaluée pour des extraits réalisés directement dans le DMSO ; dans ce cas, le protocole d'extraction consiste à placer le matériel végétal dans un minimum de solvant (volume suffisant pour immerger les fleurs), à extraire un maximum d'hypéricines puis à remplacer les fleurs extraites par d'autres fleurs, jusqu'à obtenir une concentration en hypéricines compatible avec une utilisation en milieu cellulaire. En effet, dans le cas du DMSO, la concentration de l'extrait n'est pas réalisable par évaporation du solvant, compte-tenu de la température d'ébullition du DMSO (190°C à pression atmosphérique) et de l'instabilité thermique des hypéricines (dégradation de la pseudohypéricine dès 80°C selon les données du fournisseur). En raison des propriétés physico-chimiques du DMSO, ces extraits n'ont pas pu faire l'objet de caractérisation par Spectrométrie de Masse, que ce soit en Electrospray, compte-tenu de l'impossibilité d'obtenir un courant d'ions stable, ou en MALDI, en raison de la difficulté à cristalliser ce type de dépôts. Tous les extraits ont été filtrés à l'aide de disques de diamètre de pores 0,45 µm (Pall Life Sciences, Ann Arbor, USA).

II. La quantification des hypéricines dans les extraits de Millepertuis

II. A. Par spectrophotométrie UV-Visible

La spectrophotométrie d'absorption UV-Visible, de par sa robustesse et sa facilité de mise en œuvre, est une technique de choix pour la quantification. En effet, d'après la loi de Beer-

² Miller, D. R., *et al.*, *Cell Proliferation*, 1991, **24**, 2, p 191

Chapitre III : Matériels et méthodes

Lambert (Equation III. 1), il existe une relation linéaire entre l'absorbance et la concentration du composé, dans une certaine gamme de concentrations.

$$A = \epsilon l c \quad (\text{Equation III. 1})$$

avec A l'absorbance de la solution à une longueur d'onde donnée, ϵ le coefficient d'extinction molaire (en $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) du composé à cette même longueur d'onde, l le trajet optique en cm, et c la concentration du composé en $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

Cependant, dans le cas de mélanges complexes, il est nécessaire que le composé d'intérêt présente des bandes d'absorptions qui lui sont spécifiques. Au sein des extraits de Millepertuis, seules les naphthodianthrones, les chlorophylles, et, dans une moindre mesure (cf Figure III. 3), les anthocyanines, sont susceptibles de posséder des coefficients d'extinction molaire non nuls à 591 nm, bande d'absorption la plus intense de l'hypéricine dans le méthanol.

Afin de pouvoir réaliser la quantification des hypéricines (hypéricine et pseudohypéricine) dans nos extraits de Millepertuis, la première étape a été la détermination des coefficients d'extinction molaires respectifs de ces deux composés à 591 nm en solution dans le méthanol.

Le spectrophotomètre UV-Visible utilisé pour nos analyses est un modèle Lambda 14 (Perkin Elmer) équipé d'une lampe au deutérium permettant de générer un faisceau ultraviolet entre 190 et 350 nm, et d'une lampe halogène balayant les longueurs d'onde allant de 350 à 1100 nm. L'acquisition des spectres a été réalisée à la vitesse de 240 nm/min.

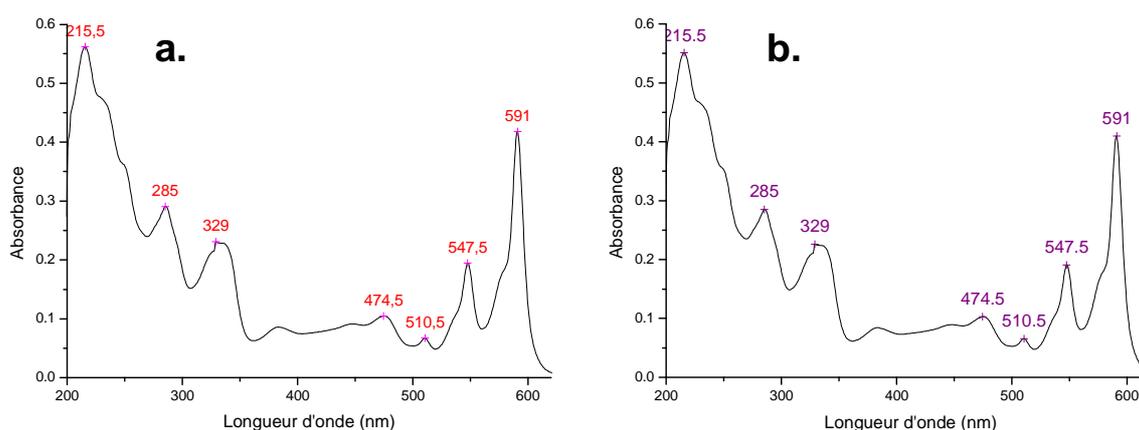


Figure III. 1 : Spectres d'absorption de l'hypéricine (a) et de la pseudohypéricine (b) solubilisées à 10^{-5} M dans le méthanol

Chapitre III : Matériels et méthodes

Les résultats que nous avons obtenus étaient compatibles avec ceux présentés dans la littérature et ceux fournis par notre fournisseur (Planta Natural Products, Vienne, Autriche) et ont montré que les deux molécules présentaient des coefficients d'extinction molaires quasi équivalents à 591 nm, à savoir environ $45000 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{mol}^{-1}$.

Dans un second temps, afin d'évaluer l'influence de la présence de chlorophylles sur la quantification des hypéricines, nous avons enregistré le spectre de la *chlorophylle a* dans le méthanol à 10^{-5} M . Les résultats montrent que le coefficient d'extinction molaire de la *chlorophylle a* à 591 nm ($\epsilon \approx 10000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) est bien plus faible que celui observé à 661 nm ($\epsilon \approx 50000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Sur la Figure III. 2, l'extrait de fleurs de Millepertuis présente une absorbance mesurée à 661 nm très faible ; on peut donc considérer que la contribution de la *chlorophylle* à 591 nm est négligeable.

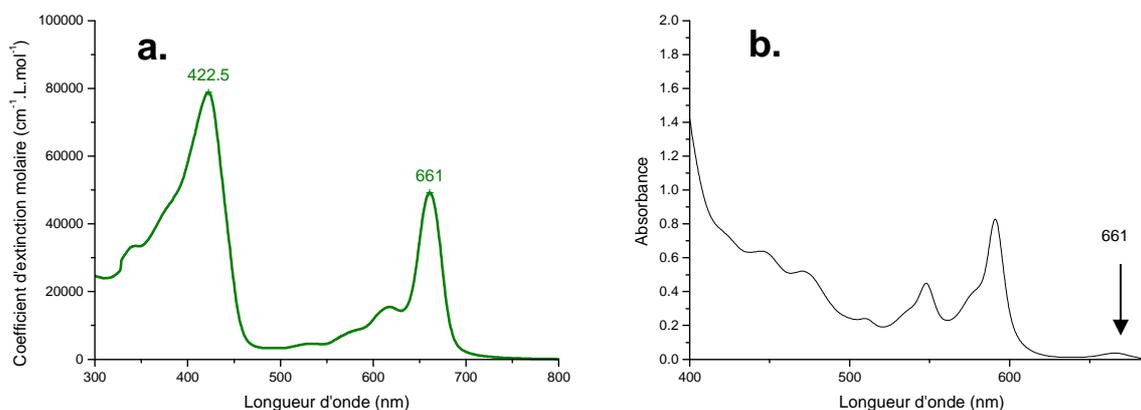


Figure III. 2 : Spectre d'absorption de la *chlorophylle a* à 10^{-5} M dans le méthanol (a), spectre typique d'un extrait de fleurs de Millepertuis (b)

En ce qui concerne les anthocyanines, elles sont très peu extraites en milieu neutres et nécessitent un pH d'extraction de 2 pour être extraite du matériel végétal ;³ les quantités que nous sommes susceptibles de retrouver dans nos extraits sont donc très faibles. Afin de le vérifier, nous avons analysé nos extraits par HPLC-UV, avec un gradient de solvant devant permettre l'élution d'éventuelles cyanidines et une détection à 591 nm ; les seuls pics chromatographiques présents correspondaient à ceux des hypéricines, et nos extraits ne contenaient donc pas ou très peu de cyanidines.

³ Turker, N., Erdogcarondu, F., *Journal of Food Engineering*, 2006, **76**, 4, p 579

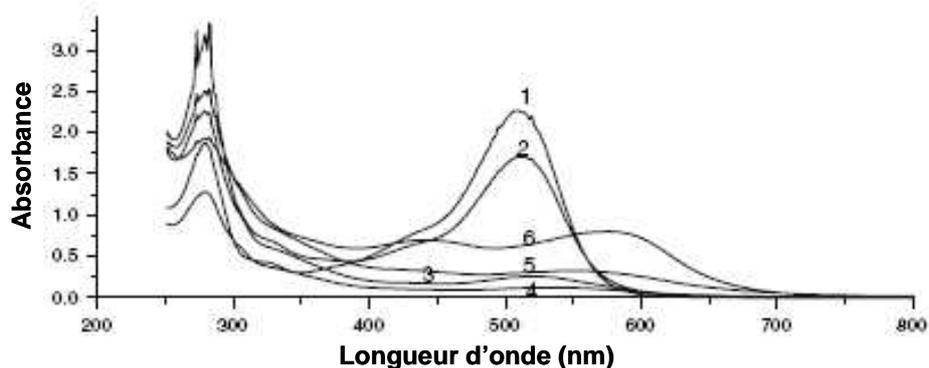


Figure III. 3 : Spectres d'absorption UV-Vis typiquement observé pour les cyanidines à 0,1 M (1 : pH=1, 2 : pH=3, 3 : pH=4,6, 4 : pH=5,7, 5 : pH=6,5, 6 : pH=7,6)⁴

Enfin, nous avons évalué l'influence potentielle que pouvait avoir la présence de protopigments (prothypéricine et protopseudohypéricine) sur la quantification des hypéricines dans les extraits. Dans ce but nous avons enregistré le spectre d'absorption de la prothypéricine ; le coefficient d'extinction molaire de ce composé à 591 nm, environ 20000 L.mol⁻¹.cm⁻¹, est non négligeable et différent de celui trouvé pour l'hypéricine et la pseudohypéricine, la quantification des hypéricines dans les extraits de Millepertuis n'est donc exacte que si l'extrait ne contient pas de protopigments. Afin de ne pas faire une telle erreur, nous avons donc évalué le temps nécessaire pour transformer via l'action de la lumière du jour la prothypéricine en hypéricine ; lors des mesures de quantification, les extraits ont également été exposés à la lumière et nous avons vérifié que cela ne modifiait pas la valeur d'absorbance lue à 591 nm.

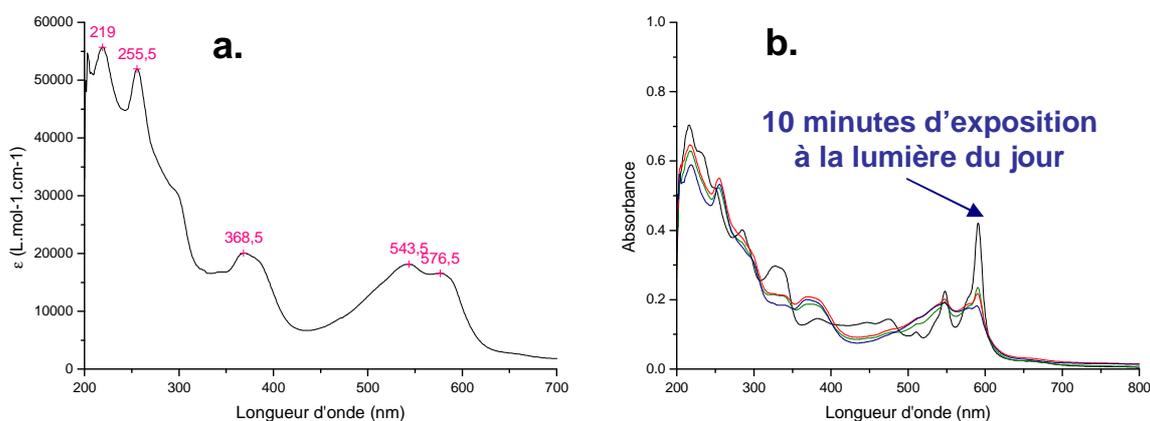


Figure III. 4 : Spectre d'absorption de la prothypéricine dans le méthanol (a.), transformation de la prothypéricine en hypéricine par l'action de la lumière du jour ($c=10^{-5}M$) (b.)

⁴ Zhang, Y., et al., *European Food Research and Technology*, 2008, **226**, 3, p 395

II. B. Par Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection UV-Visible (CLHP-UV)

Comme nous venons de le voir, la spectrophotométrie d'absorption UV-Visible n'est pas adaptée à la quantification séparée des naphthodianthrones. Dans ce but, une des techniques pouvant être mise en œuvre est la Chromatographie Liquide Haute Performance couplée à la détection par spectrophotométrie UV-Visible. Les expériences HPLC présentées dans cette étude ont été réalisées avec un système de pompes quaternaire Waters 470 couplé à un détecteur UV-Visible Waters 481. Le volume d'injection était de 20 μ L et le débit de 2mL/min. La colonne, une Uptisphere-5ODB 250 \times 46mm (Interchrom), était maintenue à une température de 40 $^{\circ}$ C pendant la durée de l'analyse. La séparation des hypéricines à partir d'un extrait de Millepertuis a été réalisée en mode isocratique ; la phase mobile était la suivante : méthanol/acétate d'éthyle/acide phosphorique ajusté à pH=2 – 60/20/20⁵. La détection des composés était ensuite réalisée par le biais de leur absorbance à 591nm.

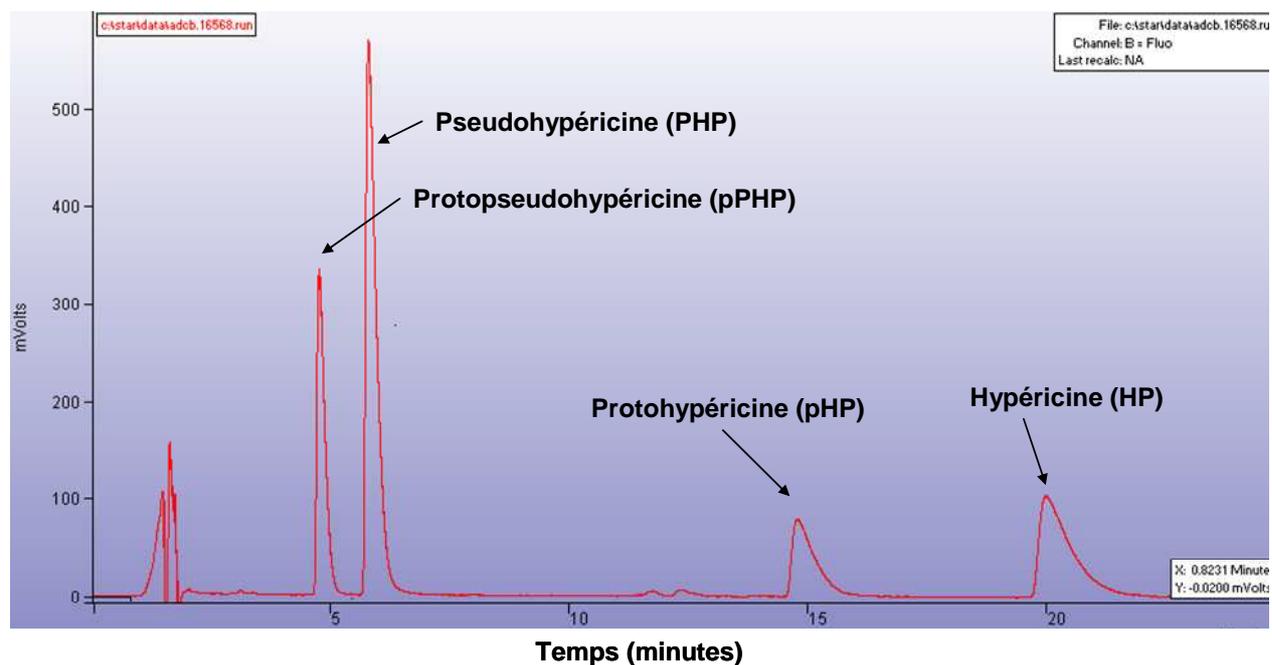


Figure III. 5 : Chromatogramme obtenu sur un extrait de Millepertuis ; la détection par spectrophotométrie d'absorption à 591 nm permet l'analyse des naphthodianthrones

⁵ Krämer, W., Wiartalla, R., *Pharmazeutische Zeitung Wissenschaft*, 1992, **5**, 137, p 202

III. La Spectrométrie de Masse

III. A. Le MALDI-TOF

III. A. 1. La Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)

Dans le cadre du MALDI (Figure III. 6), l'ionisation est réalisée par le biais d'un faisceau laser pulsé, en général un laser à azote, mais d'autres sources peuvent être utilisées. Une matrice chimique est utilisée pour protéger la molécule cible de la destruction par le faisceau direct et pour faciliter la désorption et l'ionisation. La nature des composés susceptibles d'être des matrices efficaces est souvent liée au profil moléculaire suivant :

- faible poids moléculaire (pour faciliter la vaporisation), mais pas trop, afin d'avoir une pression de vapeur suffisante pour ne pas s'évaporer durant la préparation de l'échantillon ou son introduction dans l'appareil
- acide, ou agissant comme source de protons afin de faciliter l'ionisation de la molécule cible
- forte absorption dans l'ultraviolet, afin d'absorber rapidement et efficacement l'irradiation laser

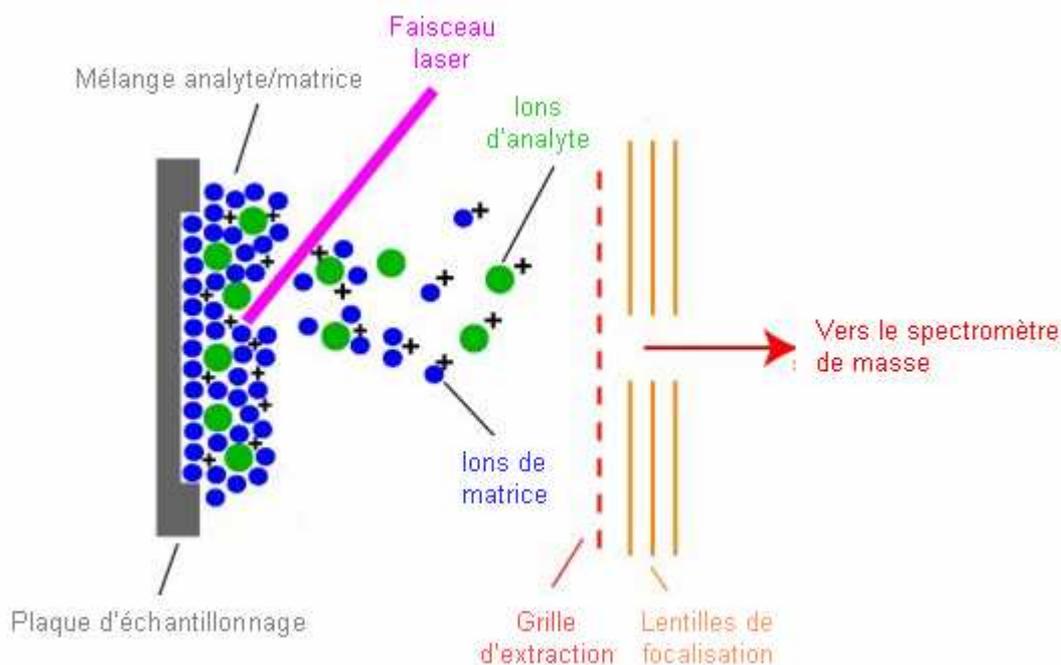


Figure III. 6 : Principe de la Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)

Chapitre III : Matériels et méthodes

L'ionisation par désorption laser assistée par matrice repose donc sur la détection d'échantillons (A) co-cristallisés dans un composé organique de faible poids moléculaire (M), celui-ci étant en excès par rapport aux molécules cibles selon un facteur compris entre 10^3 et 10^4 . De ce fait, les photons du laser rencontrent statistiquement plus de molécules de matrice (M) que de molécules cibles à analyser (A). Après évaporation du solvant, le dépôt solide cristallisé est irradié par un laser si possible à une longueur d'onde correspondant à une bande d'absorption de la matrice. Ainsi, la matrice va servir à "protéger" les molécules cibles des photons incidents au moment de l'impact laser, en absorbant cette énergie. Généralement, l'irradiation laser s'effectue dans la gamme de longueur d'onde de l'ultraviolet (UV), bien que certains instruments soient développés dans l'infrarouge (IR). Pour obtenir un résultat optimal, il est préférable que la molécule cible n'absorbe pas à la longueur d'onde d'émission du laser, ce qui permet une absorption préférentielle de l'énergie par la matrice, et donc un transfert limité en énergie de la matrice aux molécules cibles. L'énergie apportée induit un processus de désorption correspondant à un changement de phase hors équilibre thermodynamique (phase condensée vers phase gazeuse). On obtient donc une co-éjection d'espèces moléculaires (A) intactes et de fragments de la matrice (M). Des ions seront formés par transfert de protons ou d'électrons entre la matière photoexcitée et l'échantillon analysé. Néanmoins, le rendement d'ionisation est faible⁶, il a été estimé à 10^{-4} . Les ions sont majoritairement produits par des processus de protonation $[A+H]^+$, de déprotonation $[A-H]^-$ et de cationisation $[A+K]^+$ et $[A+Na]^+$.

Le MALDI est une technique d'analyse sensible qui permet de n'avoir essentiellement que des ions monochargés. Cette ionisation douce est tout à fait adaptée à l'étude des molécules naturelles, dont certaines peuvent être assez fragiles en raison par exemple de la présence de groupements glycosylés. Cependant, son utilisation est limitée pour les composés de faible masse du fait des matrices utilisées, qui présentent des masses molaires de l'ordre de 200 g/mol, et dont l'ionisation donne lieu à la génération d'ions de rapport m/z pouvant aller jusqu'à 1000.

De ce fait l'utilisation de la technique MALDI-TOFMS pour l'analyse des extraits végétaux est souvent limitée à l'étude de dérivés oligomériques de certaines classes de molécules telles que les polyphénols,⁷ les tanins,⁸ ainsi qu'à l'étude de composés de masse molaire supérieure à 500 g/mol tels que les alcaloïdes⁹ ou les caroténoïdes¹⁰.

⁶ Mowry, C. D., Johnston, M. V., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1993, **7**, 7, p 569

⁷ Reed, J. D., *et al.*, *ChemInform*, 2006, **37**, 2, p

⁸ Behrens, A., *et al.*, *Phytochemistry*, 2002, **62**, p 1159

⁹ Wu, W., *et al.*, *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, **42**, 1, p 58

¹⁰ Fraser, P., *et al.*, *The Plant Journal*, 2007, **49**, 3, p 552

Chapitre III : Matériels et méthodes

Les familles de composés susceptibles d'être retrouvées au sein des extraits de Millepertuis sont référencées dans le Tableau III. 1, qui précise les conditions d'analyse optimales de ces molécules en MALDI-TOFMS. Hormis les composés de la famille des naphthodianthrones (hypéricines), pour lesquels il n'existe pas de données bibliographiques, les autres classes de molécules sont généralement détectées en mode positif. Différentes matrices ont été utilisées : l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (2,5-DHB) pour les caroténoïdes et les phloroglucinols, la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP) pour tous les composés polyphénoliques, et le terthiophène utilisé pour la chlorophylle. En ce qui concerne les quantités de matières présentées dans la dernière colonne, elles correspondent à la quantité de matière déposée sur le support MALDI, en considérant qu'un dépôt de 1µL est réalisé. Elles ne constituent pas des limites de détection, mais correspondent à des concentrations généralement utilisées lors de ce type d'analyses.

Famille de composés	Echantillons analysés	Réf .	Mode de détection	Matrices utilisées	Quantité de matière
Naphtodianthrones	ND	ND	ND	ND	ND
Phloroglucinols	Acylphloroglucinols bicycliques prénylés	¹¹	Positif	Acide 2,5-dihydroxybenzoïque	ND
Polyphénols	Quercetine, naringenin, anthocyanines	¹²	Positif	2,4,6-trihydroxyacétophénone	ND
	Isorhamnetin-3-rutinoside, Isorhamnetin-3-glucoside, Kaempferol-3-rutinoside, Kaempferol-3-glucoside	¹³	Positif	2,4,6-trihydroxyacétophénone	1-2 nmol
	Catechine, épicatechine, procyanidine B2, procyanidine C1	¹⁴	Positif	2,4,6-trihydroxyacétophénone	10-100 nmol
Chlorophylles	Chlorophylle b	¹⁵	Positif	terthiophène	ND
Caroténoïdes	b-carotène, lycopène	¹⁶	Positif	Acide 2,5-	10-60 pmol

¹¹ Winkelmann, K., *et al.*, *Zeitschrift für Naturforschung*, 2003, **58**, c, p 527

¹² Hakimuddin, F., *et al.*, *Breast Cancer Research and Treatment*, 2004, **85**, p 65

¹³ Frison-Norrie, S., Sporns, P., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2002, **50**, p 2782

¹⁴ Shoji, T., *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2006, **1102**, 1-2, p 206

¹⁵ Xu, H., *et al.*, *Plant Biology*, 2001, **98**, 24, p 14168

Xanthophylles	Cryptoxanthine, zéaxanthine, lutéine, antheraxanthine, violaxanthine, lutéoxanthine, canthaxanthine, astaxanthine			dihydroxybenzoïque	
Esters de xanthophylles	Palmitates, myristates et laurates de cryptoxanthine, zeaxanthine, antheraxanthine et violaxanthine				

Tableau III. 1 : Conditions d'analyse MALDI-TOFMS fréquemment utilisées pour les principales familles de molécules susceptibles d'être présentes dans les extraits de Millepertuis (ND = Données non disponibles)

L'appareil utilisé au cours de ce travail est un MALDI-TOFMS, Reflex IV commercialisé par Bruker en 2001. Le système utilise un laser à azote pulsé, de durée d'impulsion $\tau = 4$ ns et de longueur d'onde 337 nm ($E = 5,8$ eV par photon) (modèle VSL-337ND, Laser Science Inc.). L'énergie en sortie de laser est de 400 μ J par impulsion laser. La puissance du laser est modulée par un filtre neutre à densité variable (atténuateur). Le faisceau laser est focalisé grâce à un télescope (jeu de deux lentilles de quartz divergente et convergente respectivement) et filtré spatialement par deux iris. Le faisceau est dirigé sur la cible avec un angle d'incidence de 45° par un jeu de miroir. L'ir radiance est alors de l'ordre de 10^7 W/cm² pour une atténuation de 80 %. Il est à noter qu'au cours de ce travail nous avons également utilisé la quatrième harmonique d'un laser Nd-YAG, à 266 nm ; ce laser a été installé sur notre MALDI-TOF en 2002, dans le cadre du stage de DEA de Gilles FRACHE.¹⁷

III. A. 2. La Spectrométrie de Masse à Temps de Vol

A.E. Cameron énonce le principe de l'analyse par mesure de temps de vol des ions (TOF) avec le premier temps de vol « ion velocitron » en 1948. Ceci arrive après l'invention du

¹⁶ Rodriguez-Bernaldo de Quiros, A., Costa, H. S., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, **19**, 2-3, p 97

¹⁷ Analyse de particules émises par des moteurs diesels par Désorption/Ionisation Laser couplée à la Spectrométrie de Masse, *Rapport de stage DEA CPCM, Année 2002-2003*

Chapitre III : Matériels et méthodes

premier spectromètre de masse à aimant (secteur magnétique) et celui à double focalisation (analyseur électrostatique et magnétique) construit en 1934.

Quel que soit le spectromètre de masse utilisé, il est nécessaire de travailler sous un vide poussé car toute collision entraînerait une déviation des ions de leur trajectoire, et provoquerait leur neutralisation sur la paroi de l'appareil.

D'après la théorie cinétique des gaz, le libre parcours moyen est donné par l'équation suivante, dans laquelle n est le nombre de molécule par cm^3 , et σ le diamètre de collision en cm, c'est-à-dire la somme des rayons des molécules qui entrent en collision.

$$L = \frac{1}{\sqrt{2} \times n \sigma^2} \quad (\text{Equation III. 2})$$

En pratique, on estime le libre parcours moyen d'un ion dans les conditions rencontrées dans un spectromètre de masse ($\sigma = 3,8 \cdot 10^{-10}$ m, $T \approx 300$ K) par l'Equation III. 3 dans laquelle la pression P est exprimée en pascals, et L en cm :

$$L = \frac{0,66}{P} \quad (\text{Equation III. 3})$$

Dans un spectromètre, le libre parcours doit être au minimum de l'ordre du mètre, ce qui correspond à une pression maximale $P = 0,66 \cdot 10^{-2}$ Pa. Dans des appareils utilisant de hautes tensions dans la source, cette pression doit encore être réduite pour éviter les décharges.

L'analyseur de type temps de vol est par son concept de base le plus simple des analyseurs. Dans la source, les ions sont accélérés par une tension V_s (20kV dans notre cas), et parcourent une distance d pour rejoindre le détecteur sans aucune autre accélération (dans une zone libre de champs et où le vide permet d'éviter d'éventuelles collisions, un tube dont la longueur en linéaire varie de 0.25m à 1.8m et jusqu'à 3.3m en mode réflectron). Alors, un ion de masse m et de charge $q=ze$ aura une énergie cinétique en sortie de source égale à :

$$E_c = \frac{1}{2} m v^2 = q V_s \quad (\text{Equation III. 4})$$

Si t est le temps nécessaire au parcours de la zone libre de champs de longueur d , on a alors $t=d/v$, d'où :

$$t = d \times \sqrt{\frac{m}{2zeV_s}} \quad (\text{Equation III. 5})$$

Le temps de vol des ions est donc fonction de leur rapport m/z , et le facteur de proportionnalité entre les deux termes dépendra des conditions expérimentales et de l'appareillage.

Cependant la dispersion en énergie cinétique des ions à l'entrée de l'analyseur est grande et entraîne une perte de résolution ; afin de contrecarrer ce problème, des systèmes permettant la refocalisation des ions tant sur le plan énergétique (extraction retardée) que temporel (réflectron), ont été créés :

- l'extraction retardée consiste à imposer un délai (0,2 μ s dans le cadre de nos analyses) entre le pulse laser et l'extraction des ions, ce qui permet une refocalisation énergétique des ions dans la source.

- le réflectron est composé d'une série d'électrodes portées à des potentiels croissants qui définissent un champ électrique inverseur de trajectoire homogène. Les ions rapides, les plus énergétiques, vont y pénétrer plus profondément ; ainsi, leur temps de parcours jusqu'au détecteur sera plus long, et donc tous les ions de même rapport m/z parviendront au détecteur au même moment, quelle que soit leur énergie de départ. Ce système sera utilisé préférentiellement pour les molécules de bas poids ; en effet, elle pose des problèmes pour la transmission des molécules de masses élevées. Dans le cadre de nos analyses le réflecteur est porté à une tension de 23kV (Figure III. 7).

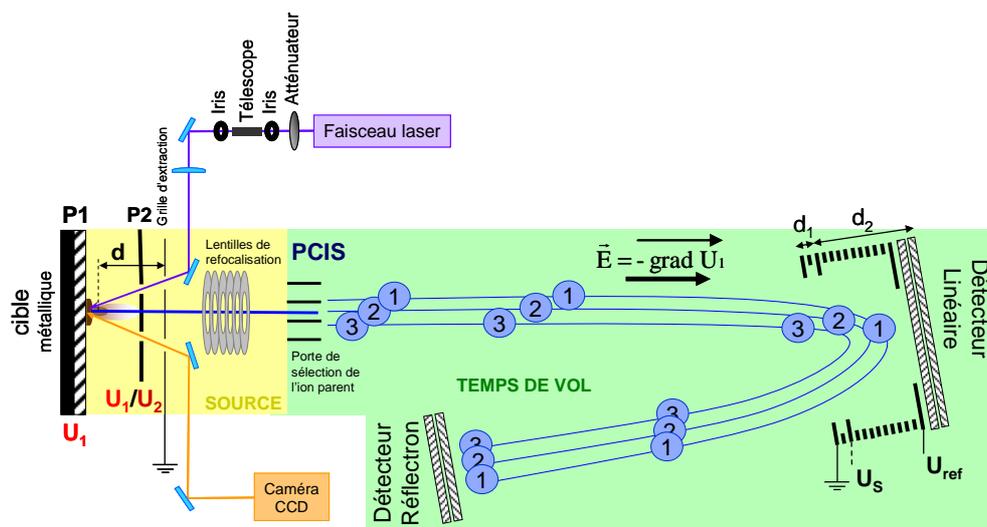


Figure III. 7 : Schéma de notre spectromètre à temps de vol configuré en mode réflectron

III. B. La Spectrométrie de Masse Très Haute Résolution

III. B. 1. Les techniques d'ionisation utilisées

L'appareil utilisé représenté schématiquement Figure III. 8 est un FTICRMS de la société Varian Ionspec de 9,4 Teslas, acquis au LSMCL en 2005, couplé principalement à deux sources d'ionisation, une source électrospray (Figure III. 9) et une source ProMALDI (Figure III. 8).

III. B. 1. i. Le ProMALDI

La plaque d'échantillonnage MALDI est introduite dans la source d'ionisation par le biais d'un sas. La désorption-ionisation laser est réalisée par la troisième harmonique d'un Nd-YAG, soit une longueur d'onde de 355 nm. Le faisceau laser est focalisé à l'aide d'une lentille sur la plaque d'échantillonnage selon un angle d'environ 40° avec un diamètre d'impact de l'ordre de 100 μm . Les ions formés à chaque série d'impacts laser sont alors accumulés dans un hexapôle, puis envoyés jusqu'à la cellule d'analyse.

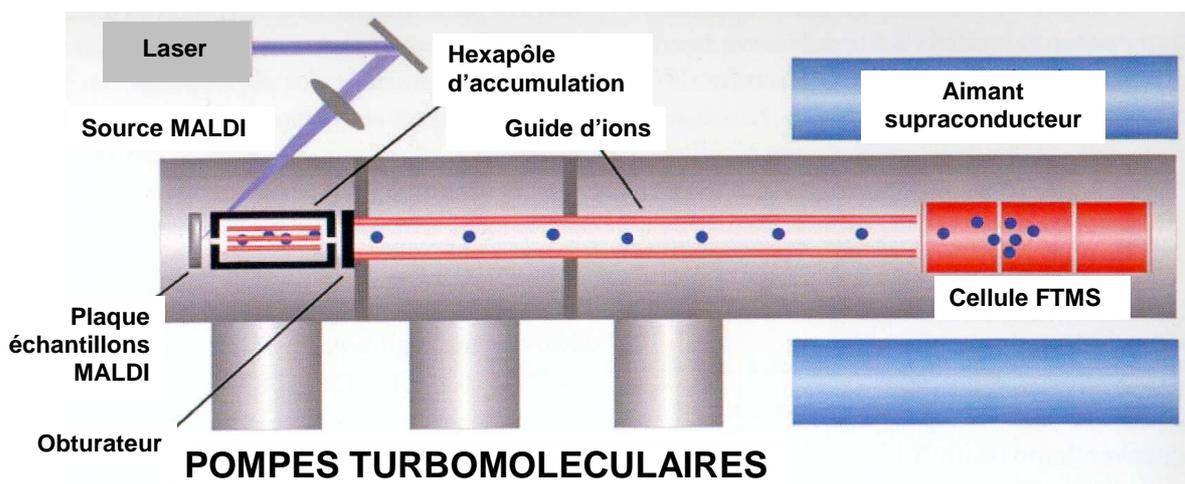


Figure III. 8 : Schéma du FTICRMS 9,4T couplé à la source ProMALDI

III. B. 1. ii. L'ionisation par Electrospray

L'ionisation par Electrospray (électronébulisation) est une méthode adaptée à l'étude de molécules naturelles, et lorsqu'elle est combinée à un spectromètre de masse très haute

Chapitre III : Matériels et méthodes

résolution, on peut obtenir grâce à des précisions en masse de l'ordre du ppm la formule brute des composés détectés. Dans le cas de mélange complexes, l'ionisation par Electrospray est très couramment utilisée après une séparation par chromatographie liquide, cependant sur les extraits de plantes les analyses réalisées en injection directe sont également très fournies en informations. En effet, Mauri *et al.* ont montré que l'analyse d'extraits de plantes tels que *Vaccinium myrtillus* (myrtillier), *Panax ginseng* ou *Camellia sinensis* (thé de Chine) permet de détecter simultanément différentes familles de molécules présentes dans les extraits, et ainsi d'obtenir une empreinte spectrale caractéristique de la plante considérée¹⁸. Jusqu'ici, dans les extraits de Millepertuis, seules les naphthodianthrones et les phloroglucinols ont déjà fait l'objet d'analyses par ESI-MS. Cependant d'autres classes de molécules présentes dans le Millepertuis ont fait l'objet de caractérisations que ce soit sous forme de standard ou au sein d'extraits d'autres végétaux : les polyphénols et les caroténoïdes.

L'ionisation par électronébuleur, ou ESI (de l'anglais Electrospray Ionization), consiste en la dispersion d'un liquide sous la forme de gouttelettes chargées électriquement et combine deux processus : la formation des gouttelettes et leur charge.

La nébulisation des solutions par ESI est obtenue en appliquant une différence de potentiel élevée entre l'extrémité de l'émetteur et un orifice situé à proximité. Le champ électrique E_c dans l'air, à la pointe de l'émetteur peut être calculé par :

$$E_c = \frac{V_c}{r_c \ln\left(\frac{4d}{r_c}\right)} \quad (\text{Equation III. 6})$$

avec V_c la différence de potentiel entre l'émetteur et la contre-électrode, r_c le rayon de l'émetteur, et d la distance entre l'émetteur et la contre-électrode.

L'application de champ électrique élevé à la pointe de l'aiguille de l'électrospray produit une séparation partielle des ions positifs et négatifs. En mode positif, les ions positifs sont accumulés à la surface de la pointe du liquide du capillaire et les ions négatifs sont amassés à l'intérieur du liquide. Les répulsions des ions positifs à la surface et le champ électrique régnant entre les charges positives augmente la tension de surface du liquide pour former un cône, appelé cône de Taylor. L'accumulation des charges à la pointe du cône provoque un filament liquide qui finalement se divise en gouttelettes chargées. Ce phénomène d'électronébulisation n'apparaît que si le champ électrique E_0 vaut :

¹⁸ Mauri, P., Pietta, P., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2000, **23**, 1, p 61

$$E_0 = \sqrt{\frac{2\gamma \cos 49^\circ}{\epsilon_0 r_c}} \quad (\text{Equation III. 7})$$

avec γ la tension de surface et ϵ_0 la constante de permittivité du vide ; la valeur de 49° correspond à la moitié de l'angle du cône de Taylor.

Lorsque la charge de la solution qui forme le cône de Taylor s'approche de la limite de Rayleigh, la pointe du cône de Taylor s'allonge en formant un filament liquide. Celui-ci finit par se détacher se disperser sous forme de gouttelettes qui contiennent un excès de charges et ont un diamètre de l'ordre de 1 à 2 micromètres. La limite de Rayleigh est le point où les répulsions coulombiennes entre les charges sont égales aux forces cohésives de la tension de surface du liquide ; la charge de Rayleigh q_{Rayleigh} est alors :

$$q_{\text{Rayleigh}} = 8\pi(\gamma\epsilon_0 r^3)^{1/2} \quad (\text{Equation III. 8})$$

Les mécanismes de passage des ions solvatés aux ions en phase gazeuse ne sont pas encore élucidés. Deux hypothèses sont toutefois avancées : un mécanisme dit « à charge résiduelle » (« charged residue mechanism » (CRM)), appelé aussi modèle de Doyle : il estime que si le processus de division par fission coulombienne va assez loin, et si la solution est suffisamment diluée, on finit par obtenir une goutte qui contient une seule molécule avec une ou plusieurs charges. Cette molécule passe alors sous phase gazeuse après évaporation du solvant. Le deuxième mécanisme dit « à évaporation d'ions » (« ion evaporation mechanism » (IEM)), est appelé aussi modèle d'Iribarne et Thomson. Ils ne penchent pas pour un éclatement de la gouttelette mais pour une évaporation ionique progressive. L'ion serait alors extrait par désorption de champ. Récemment il a été suggéré que les deux mécanismes s'appliquent, mais pour différents types de conditions et d'échantillons. Le modèle de Dole paraît compliqué à appliquer à des solutions très concentrées, quant au modèle d'Iribarne et Thomson, il est difficilement envisageable pour des macromolécules biologiques pour des raisons cinétiques et thermodynamiques. Dans la pratique, le processus de création des ions pourrait dépendre de l'analyte et se rapprocher des deux modèles à la fois en fonction des paramètres d'analyses.

Dans notre source électrospray (Figure III. 9), les ions sont produits en injectant une solution à travers un capillaire, similaire à une aiguille de seringue en acier inoxydable. Des capillaires en verres et en silice fondue avec des diamètres internes inférieurs à $10 \mu\text{m}$ sont utilisés pour augmenter la sensibilité dans le cas de l'utilisation de débits très faibles de l'ordre de $10\text{nL}/\text{min}$. Pour générer les ions, le capillaire est porté à un potentiel élevé, de

Chapitre III : Matériels et méthodes

l'ordre de +/- 4kV, en relation avec le cône d'extraction du spectromètre de masse. Quand le liquide quitte le capillaire il est polarisé grâce au champ électrique et il forme un aérosol électriquement chargé. L'évaporation du solvant est améliorée par l'application d'un flux d'azote gazeux à contre-courant, et par la possibilité de moduler la température dans la source. Avec l'évaporation du solvant, la densité de charge augmente, jusqu'à l'explosion coulombienne et les ions formés sont accélérés, avec l'application d'un fort potentiel en sortie du capillaire, à travers le cône d'échantillonnage. La trajectoire des ions est alors modifiée par l'application d'une différence de potentiel ; ceux-ci rentrent via le cône d'extraction dans une zone où la pression est réduite à 10^{-4} Torr par une pompe turbomoléculaire. La source d'ionisation présente sur notre appareil est de type Z-spray (d'après la trajectoire que les ions y adoptent) ; ce type de source permet de minimiser l'adsorption de molécules sur les cônes (en comparaison aux sources linéaires) qui peut causer à terme une perte de sensibilité de l'appareil.

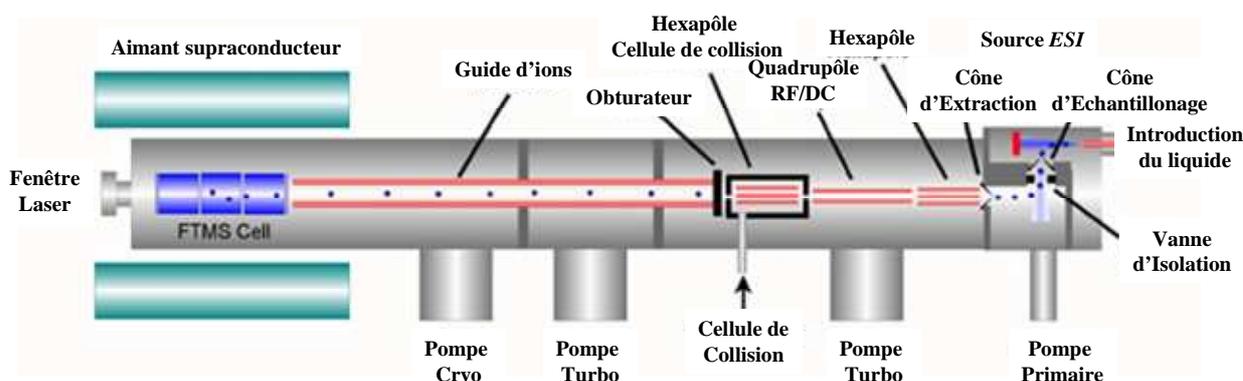


Figure III. 9 : Schéma du FTICRMS 9.4T IonSpec couplé à la source électrospray

Dans cette région se trouve un quadripôle RF/DC ; un courant continu (U) et une tension alternative ($V \cos \omega t$) peuvent y être appliqués sur deux paires de tiges afin de créer un potentiel électrique quadripolaire :

$$\Phi = (U + V \cos \omega t) \left[\frac{x^2 - y^2}{L^2} \right] \quad (\text{Equation III. 9})$$

, où x et y sont les coordonnées mesurées depuis le centre du quadripôle et L la distance du centre à la surface des tiges

Un quadripôle (Figure III. 10) peut être utilisé de deux façons ; en mode RF uniquement, $U=0$ et les ions sont transmis sur une très large gamme de masse ; en mode RF/DC, une tension valant $+U$ est appliquée à une paire de tiges, et $-U$ est appliqué à l'autre paire. Cette

Chapitre III : Matériels et méthodes

deuxième configuration est très utilisée en spectrométrie de masse car elle fonctionne comme un filtre passe-bande, avec des « cut-off » bien définis en basses et hautes masses.

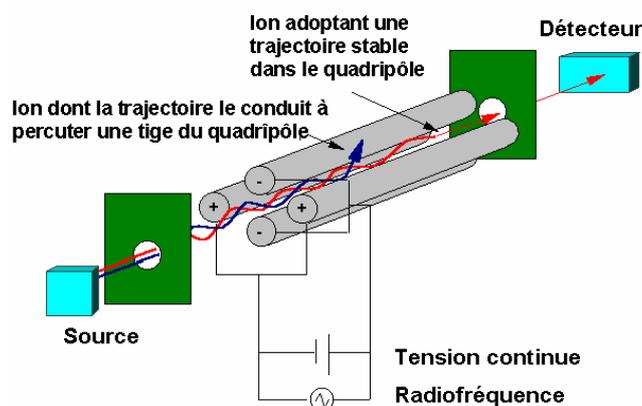


Figure III. 10 : Représentation schématique d'un quadripôle

Une fois qu'ils ont quitté ce quadripôle, les ions sont piégés et accumulés dans un hexapôle par tensions sont appliquées à des électrodes d'entrée et de sortie. Le potentiel de la lentille de sortie de la cellule de collision est alors abaissé et les ions sont envoyés vers la troisième zone de l'appareil grâce à l'ouverture d'un volet mécanique dont la fonction est de permettre l'obtention d'un vide suffisant dans cette troisième et dernière zone.

III. B. 2. La FTICRMS

La FTICRMS est une technique d'analyse dont le principe repose sur la détermination du rapport masse sur charge des ions, par l'intermédiaire des fréquences cyclotroniques engendrées par le champ magnétique d'un aimant solénoïde supraconducteur. Ce type de spectromètre a été développé par Marshall et Comisarow. Cette technique a connu depuis sa mise au point en 1974, un développement rapide et constant. Ces instruments équipent désormais de nombreux laboratoires de recherche à travers le monde. Les domaines d'utilisation de cette technique sont nombreux et s'étendent de l'analyse du protéome à celui des matériaux.

III. B. 2. i. Principe et description de l'appareillage

Introduction des ions dans la cellule :

Un guide d'ions basé uniquement sur des radio fréquences est utilisé pour transporter les ions formés dans les sources, où la pression est élevée (pression atmosphérique pour la

Chapitre III : Matériels et méthodes

source électrospray et 10^{-3} - 10^{-4} mbar dans la source ProMALDI), jusqu'à la cellule d'analyse, où une basse pression, sur notre appareil 5.10^{-10} mbar, est nécessaire à la détection des ions.

Le fait que l'appareil utilisé possède des sources d'ionisation externes permet un pompage et donc une mise en basse pression plus aisée de la cellule, avec toutefois un point délicat concernant le moyen d'introduction des ions dans la cellule d'analyse. L'utilisation d'un quadropôle à radios fréquences pour focaliser des ions en un faisceau étroit et les injecter directement au centre du champ magnétique où la composante radiale B_r est faible permet une grande efficacité dans la transmission des ions. En ajustant la tension et la radio fréquence d'excitation ω , les ions d'une certaine gamme de masse peuvent être transmis à la cellule d'analyse. Le guide d'ions fonctionne simplement comme un filtre passe-bande et une tension de 7 à 15 V est généralement appliquée sur toutes les tiges du guide d'ions pour aider la pénétration des ions.

Géométrie de la cellule :

La cellule, élément crucial dans un système FT-ICR-MS, est fabriquée avec soin afin de piéger le plus efficacement possible les ions et de les détecter avec le maximum de résolution. La cellule d'analyse sous vide poussé est située dans la zone centrale de l'aimant supraconducteur, là où le champ magnétique est le plus homogène. Les ions amenés par le guide d'ions sont ensuite piégés dans la cellule en diminuant brièvement puis en augmentant le potentiel des plaques de piégeage (quelques mV). Les ions contenus dans la cellule possèdent trois types de mouvement : un mouvement cyclotronique, un mouvement dû au piégeage et le mouvement magnétron). La cellule FTMS Varian-IonSpec est de forme cylindrique (Figure III. 11). Elle est constituée de quatorze électrodes de cuivre plaquées or soutenues par des isolants en céramiques. La longueur totale est d'environ 17 cm et elle est orientée selon l'axe z parallèlement aux lignes de champs. Au centre de la cellule d'analyse on retrouve une paire de plaques réceptrices. Elles sont connectées à un amplificateur qui détecte le courant image. A côté de ces plaques se trouvent les plaques de transmission. L'extérieur de la cellule d'analyse se termine par les anneaux internes et les plaques de piégeage.

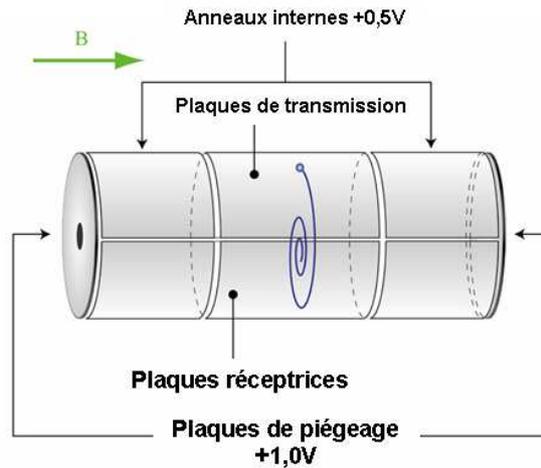


Figure III. 11 : Schéma de la cellule d'analyse de la FTICRMS 9.4T

Mouvement des ions dans la cellule :

Les trois mouvements des ions l'intérieur de la cellule d'analyse sont les suivants :

- le mouvement cyclotronique, le plus important, apparait quand les ions tournent rapidement autour des lignes de champs. La fréquence cyclotronique est calculée par : $f = qB/(2\pi m)$ avec q la charge de l'ion, m sa masse et B le champ magnétique de l'appareil (Figure III. 12). Généralement la gamme de fréquence cyclotronique va de 2 kHz à 10 MHz.

Une particule, de charge q (en coulomb) et de vitesse v (m/s), placée dans un champ magnétique B_0 (en tesla) adopte un mouvement circulaire périodique de rayon r (m), sous l'action de la force de Lorentz F (en newtons) :

$$\vec{F} = q(\vec{v} \wedge \vec{B}_0) \quad \text{(Equation III. 10)}$$

La norme de l'accélération angulaire (en rad/s) est définie par :

$$\frac{d\vec{v}}{dt} = \frac{(v_{xy})^2}{r} = r\omega^2 \quad \text{avec} \quad v_{xy} = \sqrt{v_x^2 + v_y^2} \quad \text{(Equation III. 11)}$$

Comme le champ magnétique est dirigé suivant l'axe z , la force de Lorentz se trouve dans le plan (xOy) . On peut définir la condition d'équilibre suivant (r = rayon de l'orbite) :

$$\frac{mv_{xy}^2}{r} = qv_{xy}B_0 \quad \text{(Equation III. 12)}$$

La vitesse angulaire et la fréquence cyclotronique sont donc données par :

$$\omega_c = \frac{qB_0}{m} \text{ (en rad.s-1)} \quad \text{(Equation III. 13)}$$

$$\nu_c = \frac{qB_0}{2\pi m} \text{ (en Hz)} \quad \text{(Equation III. 14)}$$

Figure III. 12 : Calcul de la fréquence cyclotronique des ions

- le mouvement de piégeage consiste en des oscillations lentes d'avant en arrière entre les plaques de piégeage. Les tensions appliquées sur ces plaques et sur les plaques intérieures créent un potentiel électrostatique dans la direction z.
- le mouvement magnétron est très faible, et la résultante se trouve au centre de l'orbite cyclotronique suivant les lignes équipotentielle du champ électrique à l'intérieur de la cellule. Finalement, ce mouvement limite le temps de piégeage des ions dans la cellule.

Excitation des ions :

Quand les ions sont injectés dans la cellule, leur mouvement est incohérent et l'orbite cyclotronique est faible (0,1 mm). Pour détecter ces ions, il faut que leur mouvement orbital devienne cohérent de manière à ce que des ions de même masse aient la même trajectoire : ceci est réalisé en appliquant un balayage en fréquence très rapide. Ce balayage en fréquence, appliqué sur les plaques de transmission, couvre toutes les fréquences cyclotroniques des ions. Quand la fréquence appliquée est égale à la fréquence cyclotronique d'un ion de masse donnée, l'ion absorbe de l'énergie. Son énergie cinétique E_C augmente par un processus de transfert d'énergie que décrit :

$$E_C = \frac{1}{2}mv^2 = m\omega_c^2 R^2 \quad \text{(Equation III. 15)}$$

Cette augmentation d'énergie cinétique se traduit donc par une augmentation du rayon R de la trajectoire de l'ion. Après un très court temps d'interaction avec la fréquence responsable de ce phénomène, tous les ions d'une même masse sont en phase et ont la même trajectoire : leur mouvement est devenu cohérent et un signal peut alors être détecté. Ce phénomène de transfert d'énergie est appelé Résonance Cyclotronique Ionique (ICR pour Ion Cyclotron Resonance). Il peut être utilisé pour accélérer toute particule chargée.

Détection des ions et traitement du signal :

Les ions, animés d'un mouvement circulaire cohérent après excitation, possèdent une trajectoire qui les amène au voisinage des plaques de détection, ce qui va leur permettre d'induire un courant image. Le courant alternatif détecté au travers d'un circuit RLC est converti en tension alternative $V(t)$ selon :

$$V(t) = \frac{NqR}{dC \cos(\omega_c t)} \quad (\text{Equation III. 16})$$

avec N le nombre d'ions de masse m détectés, q leur charge en coulombs, R le rayon de leur orbite en mètres, d la distance séparant les deux plaques de capacité, C la valeur de la capacité en mF, ω_c la vitesse angulaire des ions et t le temps de mesure en secondes

Pour chaque groupe d'ions de masse m, une tension alternative $V_m(t)$ est induite. Un signal composite, résultant de la superposition de toutes les tensions images $V_m(t)$ est ainsi obtenu, et a pour expression :

$$V(t) = \sum_m V_m t \cdot \cos(\omega_c t) \quad (\text{Equation III. 17})$$

Le signal obtenu est un interférogramme à qui on fait subir différents traitements mathématiques. On aura après traitement du signal accès à un spectre de masse. Les corrections effectuées sont les suivantes :

- L'apodisation, qui consiste à combiner le signal temporel obtenu avec une fonction définie. Le but de l'apodisation est de réduire les oscillations de la ligne de base du spectre à proximité des pics. L'aspect visuel du spectre est alors amélioré ;
- Le remplissage de la mémoire par des zéros (zero filling) permet d'obtenir une quantité de données plus importante à partir d'un interférogramme. En ajoutant en mémoire, à la suite du signal détecté, un certain nombre de fois autant de zéros qu'il y a de points de mesure, on augmente artificiellement le nombre de point du spectre dans le domaine des fréquences. Ceci permet d'augmenter la précision en masse et en intensité des pics car ils seront constitués à l'aide d'un plus grand nombre de points ;
- L'application de l'algorithme FFT (Fast Fourier Transform) va transformer l'interférogramme obtenu dans le domaine des temps en signaux dans le domaine des fréquences.

Résolution et précision en masse :

L'avantage du spectromètre de masse FT-ICR provient de la grande précision avec laquelle il est possible de mesurer une fréquence par des techniques classiques de digitalisation et de transformation de Fourier. La fréquence la plus élevée mesurable est donc limitée par la fréquence de digitalisation, et l'intervalle entre deux fréquences dépend du nombre de points et donc de la durée du signal. Or cette durée est limitée par l'amortissement du signal lié aux collisions ion-neutre. La qualité du vide sera donc un paramètre crucial pour obtenir une durée d'acquisition et donc une résolution la plus élevée possible.

La précision en masse dépendra de la résolution mais également de la qualité de la calibration. Un paramètre important pour la qualité de cette calibration est la charge d'espace : la présence d'ions dans la cellule va en effet modifier le champ électrique dans la cellule à la fois pour le piégeage, mais également lors de l'excitation et de la détection des ions. La calibration interne s'affranchit partiellement de ces problèmes, puisque l'étalon est présent dans la cellule avec la masse des ions à mesurer. En calibration externe, la qualité de la mesure va dépendre du nombre d'ions piégés dans la cellule, paradoxalement il vaut mieux travailler avec le minimum d'ions possibles pour chaque balayage pour obtenir une précision maximale.

Sensibilité et gamme dynamique :

Des calculs théoriques ont montré que le nombre de charges minimum ayant un mouvement cohérent nécessaire pour détecter un signal était de l'ordre de 200.¹⁹ Ceci constitue une limite ultime de la sensibilité d'un tel instrument. En pratique il faut tenir compte de l'efficacité de chacune des étapes permettant de passer de l'analyte neutre aux ions piégés et excités dans la cellule. Il faut également tenir compte des états de charge et de l'existence de massifs isotopiques qui augmentent le nombre de fréquences sur lesquelles se répartissent les ions. Dans un instrument commercial avec les protocoles standard, on peut atteindre environ 100 femtomoles de produit injecté.

Un point sur lequel la FT-ICR n'est pas très efficace est la gamme dynamique : elle représente la capacité à discriminer des ions d'abondances différentes dans un même spectre. Le problème est ici lié à celui de la charge d'espace : lorsque trop d'ions d'une masse donnée sont présents, ils vont affecter les mouvements d'ions de plus faible

¹⁹ Limbach, P. A., *et al.*, *Analytical Chemistry*, 1993, **65**, 2, p 135

Chapitre III : Matériels et méthodes

abondance présents dans la cellule. On s'entend généralement pour fixer cette limite vers 10 000 ions. Il existe une limite à partir de laquelle une population d'ions abondants en mouvement cohérent va modifier le mouvement (et donc la fréquence) d'ions de plus faible abondance. On admet qu'il est difficile de mesurer avec une bonne précision la masse d'un ion dont l'abondance est inférieure à 1% de l'ion le plus abondant. La géométrie de la cellule et notamment sa longueur peut avoir une grande influence sur cette gamme dynamique.

III. B. 2. iii. Séquence typique

La séquence présentée sur la Figure III. 13, est constituée des évènements suivants :

- 1) à $t=0$, les ions formés dans la source commencent à arriver via le cône d'extraction dans le premier hexapôle, nommé Q1,
- 2) l'application de radiofréquences dans Q1 et Q2 (le quadripôle) transporte les ions jusqu'à la cellule de collision (l'hexapôle nommé Q3), où ils sont stockés ; les ions de très basse masse sont évacués grâce à l'application d'un courant continu négatif (DC) dans Q3,
- 3) quelques millisecondes avant la sortie des ions du Q3 débute l'application des radiofréquences dans le guide d'ions,
- 4) juste avant leur évacuation, le DC de Q3 augmente (en valeur absolue) afin de les refocaliser,
- 5) l'obturateur qui sépare l'hexapôle du guide d'ion peut alors s'ouvrir,
- 6) les ions négatifs sont éjectés du Q3 par l'application d'un potentiel positif à son extrémité et transportés par le guide d'ions jusqu'aux plaques de piégeage,
- 7) l'application brève d'un potentiel nul au niveau de la plaque de piégeage située du côté du guide d'ions permet aux ions de s'introduire dans la cellule,
- 8) un pulse de gaz est envoyé sur le nuage d'ions afin de les refroidir,
- 9) le potentiel des anneaux internes, qui jusqu'ici était de l'ordre de quelques volts, est réduit jusqu'à -0.5V,
- 10) 1 s après l'arrivée des ions dans la cellule, le potentiel des plaques de piégeage est lui aussi progressivement abaissé à environ -2V, afin de réduire la fréquence magnétron,
- 11) 500 ms plus tard, l'excitation des ions débute : l'amplitude du courant sinusoïdal appliqué vaut 115V ; le balayage des fréquences se fait à une vitesse de 4000 kHz et le nombre total de points vaut 64K (64000 points), soit une durée du balayage qui équivaut à 16 ms,
- 12) la détection des ions résulte de la conversion du courant image mesuré au niveau des plaques de détection en un interférogramme ; la mesure de ce courant peut être réalisée dans une gamme de fréquence allant de 1kHz à 16 MHz et pour un nombre de point allant de 1 K (1000 points) à 8192 K (8192000 points).

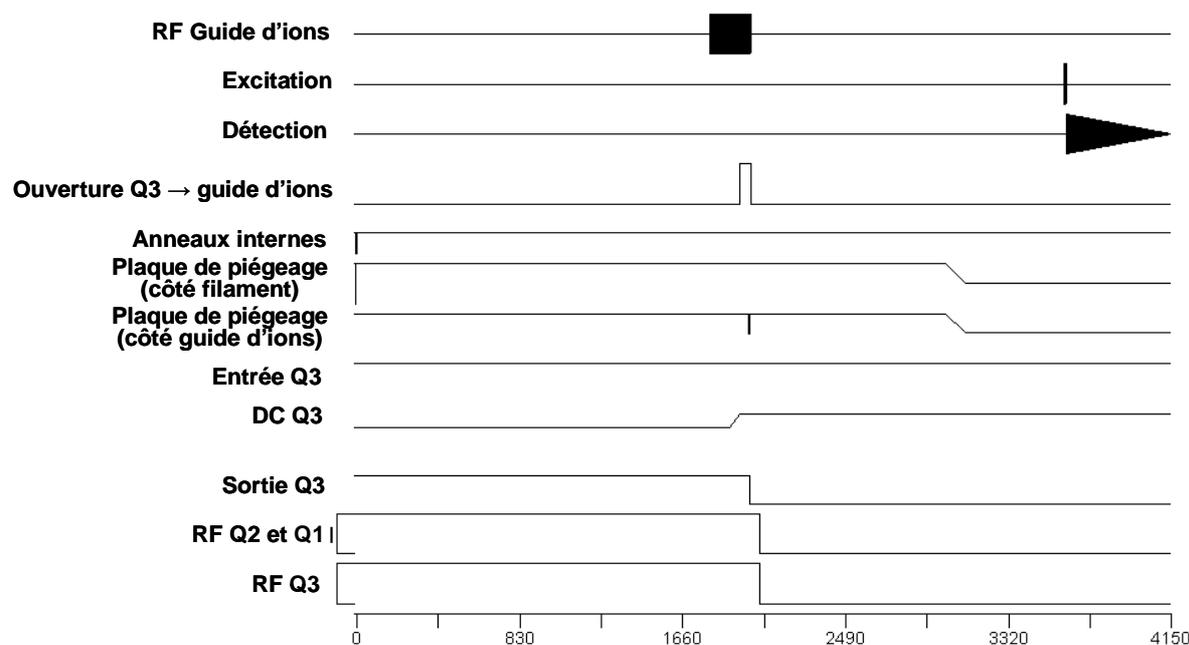


Figure III. 13 : Séquence FTICRMS typique

III. B. 3. Techniques de fragmentation

Dans la source d'ionisation, la répartition des énergies des ions moléculaires est large, et conduit à leur classification en trois catégories : les ions stables, dont l'énergie interne est faible, les ions instables, dont l'énergie interne est très élevée et conduit à leur décomposition dans la source, et les ions métastables, dont l'énergie interne est intermédiaire et qui vont se fragmenter entre la source et le détecteur. La MS/MS est née de la volonté d'augmenter le phénomène de dissociation métastable, sans être tributaire de la spontanéité de ces décompositions. Dans ce but, l'idée a consisté à accroître l'énergie interne des ions stables hors de la source, afin qu'ils se fragmentent. Nous avons au cours de ce travail utilisé des méthodes de fragmentation dites « dans le temps », qui correspondent à des séquences successives effectuées dans une même enceinte, dans notre cas la cellule du spectromètre de masse à résonance cyclotronique des ions à transformée de Fourier.

La sélection de l'ion d'intérêt a été réalisée au sein même de la cellule d'analyse en éjectant tous les autres ions.

III. B. 3. i. SORI-CID (Sustained Off-Resonance Irradiation-Collision-Induced Dissociation)

Dans le cadre de cette technique, l'énergie est apportée à l'ion incident par collision inélastique contre un gaz rare, tel que l'Hélium ou l'Argon ; l'introduction du gaz est réalisée

grâce à une valve solénoïde qui peut rester ouverte pendant un temps défini ; la pression va augmenter jusqu'à environ 10^{-6} Torr. Les ions sélectionnés sont alors excités « off-resonance », par une fréquence supérieure à leur fréquence cyclotronique et leurs orbites vont se mettre à augmenter et diminuer en fonction du temps (Figure III. 14) ; l'amplitude et la durée d'irradiation utilisées pour le SORI varient selon la taille de la molécule et sa propension à se fragmenter (facteur structural) ; elle est en général située entre 4 et 20 V(bp) (« base-to-peak ») et la durée d'irradiation est de quelques centaines de millisecondes. Parallèlement, de multiples collisions de basse énergie vont se produire avec les molécules de gaz ; ceci va augmenter doucement l'énergie interne des ions et conduire à leur dissociation.

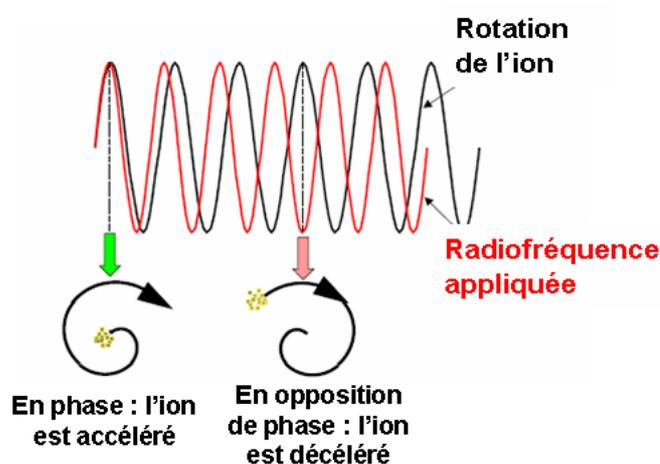
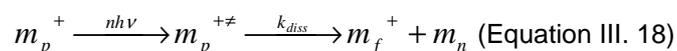


Figure III. 14 : Accélérations/décélérations induites par l'application d'une fréquence supérieure à la fréquence cyclotronique de l'ion

III. B. 3. ii. L'IRMPD (Infrared MultiPhoton Dissociation)

La technique IRMPD fait intervenir l'utilisation d'un laser, souvent un laser CO_2 ($\lambda=10.6\mu\text{m}$) de basse puissance ($<100\text{W}$, 75W dans notre cas). Son énergie, fortement absorbée par les modes de vibrations des ions, va doucement augmenter leur énergie interne et conduire à leur dissociation (Equation III. 23). Cet effet est donc comparable à celui du SORI-CID, bien que la technique IRMPD présente l'avantage de ne pas nécessiter l'introduction d'un gaz dans la cellule.



avec n le nombre de photons absorbés, $h\nu$ l'énergie d'un photon et k_{diss} la constante de dissociation

Chapitre III : Matériels et méthodes

Pour qu'une expérience IRMPD soit efficace, plusieurs critères doivent être réunis. D'une part, l'ion précurseur doit être capable de passer, suite à l'absorption des photons, dans un état excité d'énergie supérieure à son seuil de dissociation. D'autre part concernant le refroidissement des ions, il existe une compétition entre les phénomènes radiatifs et collisionnels, ce qui diminue partiellement l'énergie gagnée lors de l'absorption des photons et donc la valeur de la constante globale de dissociation de l'ion. Cependant le vide poussé régnant dans une cellule FTICRMS diminue fortement la probabilité de désactivation des ions par collisions.

Le SORI-CID et l'IRMPD sont considérés comme étant des procédés ergodiques, mettant en jeu une redistribution de l'énergie absorbée sur toute la molécule, par lesquels ce sont les liaisons les plus faibles qui tendent à être rompues. En ce sens ce sont des techniques de fragmentation qui donnent des résultats assez similaires. Cependant, si dans le cas du SORI-CID on peut considérer que les ions résultant de la fragmentation de l'ion parent ont des fréquences de résonances assez éloignées de la fréquence appliquée pour que les seules fragmentations qu'ils pourraient subir leur servent à dissiper leur excédent d'énergie cinétique, dans le cas de l'IRMPD les ions fragments restent sur le trajet du laser et peuvent se refragmenter. C'est pourquoi on peut s'attendre dans certains cas à obtenir des spectres de fragmentation IRMPD plus fournis que les spectres SORI-CID, ce qui est un avantage lorsqu'on souhaite obtenir une empreinte spécifique. Il est également à noter que la configuration de notre appareil ne permet d'effectuer la fragmentation par IRMPD que dans le cas de l'ionisation par électrospray.

IV. L'étude des propriétés de l'extrait de Millepertuis

IV. A. La quantification de la production d'oxygène moléculaire singulet

Afin de quantifier l'oxygène moléculaire singulet produit par les différents agents photosensibles que nous avons étudiés, nous avons choisi d'effectuer une détection indirecte grâce à une sonde moléculaire, le diphénylisobenzofurane (DPBF).

Dans notre étude la technique utilisée afin de quantifier le DPBF et sa forme oxydée, l'ortho-dibenzoylbenzène o-BB, est la Chromatographie en Phase Gazeuse couplée à la Spectrométrie de Masse. Les analyses ont été réalisées à l'aide d'un chromatographe 3800 GC Varian couplé à un spectromètre de masse à quadrupole Saturn 2000 Varian. La colonne capillaire est une VF-Xms de 30m de long, 0,25 mm de diamètre, avec une épaisseur de film de 0,10 μm (Varian). Le gaz vecteur, l'hélium, est maintenu à un débit de 1,3 mL/min. La source est chauffée à 200°C et la ligne de transfert thermostatée à 250°C.

Chapitre III : Matériels et méthodes

Les spectres de masse ont été obtenus par impact électronique à 70eV. Le volume de solution injecté était de 1 μ L. La température initiale de la colonne était de 200°C ; elle augmentait ensuite jusqu'à 280°C à la vitesse de 8° C/min. Dans ces conditions l'éluion et la séparation du DPBF (MM=270 g.mol⁻¹) et de l'oBB (MM=286 g.mol⁻¹) étaient obtenues en 16 minutes. Au cours des expériences d'illumination laser, les composés ont été identifiés grâce à leurs spectres de masse en comparaison avec ceux obtenus avec les composés standards DPBF et oBB, présentés respectivement sur la Figure III. 15. Au cours des expériences préliminaires réalisées en GC/MS, nous avons constaté une mauvaise reproductibilité des mesures, probablement due à des variations du volume injecté. Nous avons donc choisi d'effectuer la quantification par rapport à un étalon interne, le benzo-a-fluorène à 10⁻⁵M, dont nous n'avons constaté aucune phototransformation dans nos conditions d'illumination, ni d'interaction avec le DPBF, l'oBB ou l'hypéricine.

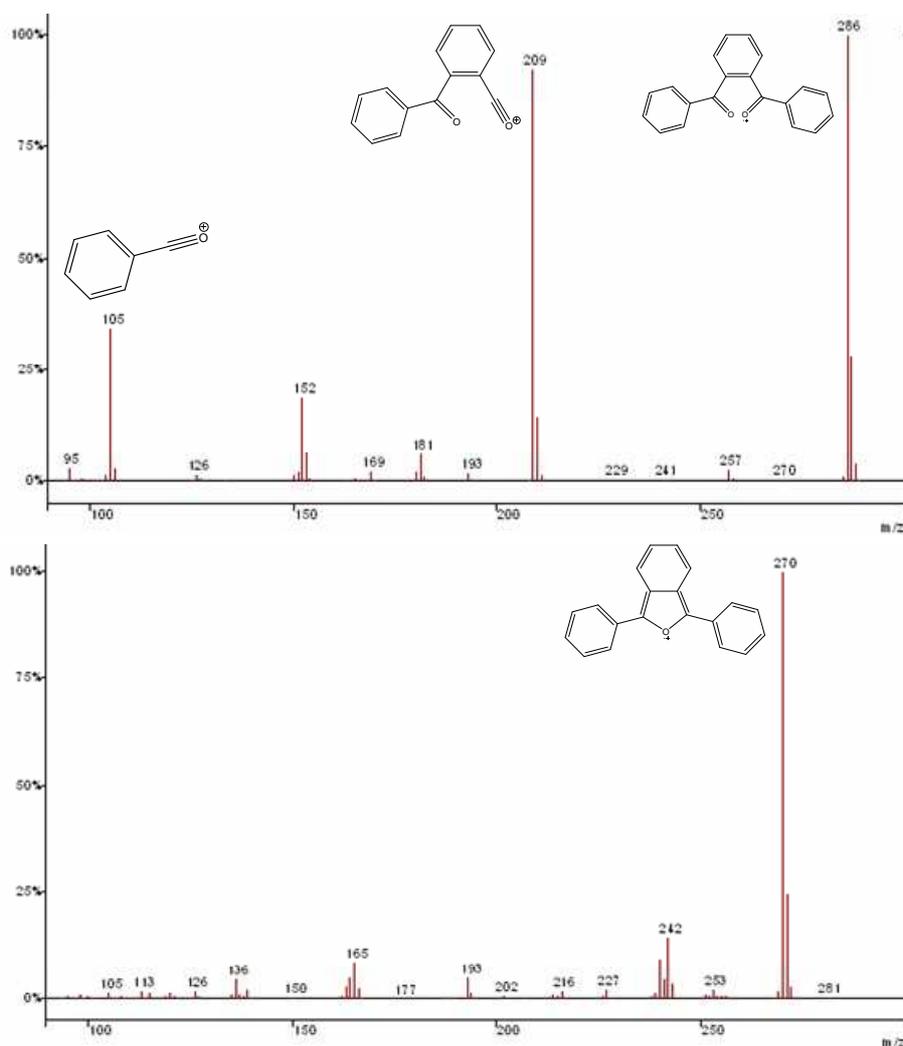


Figure III. 15 : Spectres de fragmentation obtenus en impact électronique (70eV) pour le diphenylisobenzofurane (DPBF, en bas) et l'orthodibenzoylbenzene (oBB, en haut)

Chapitre III : Matériels et méthodes

IV. B. L'activité de l'extrait de Millepertuis en milieu cellulaire

IV. B. 1. L'internalisation des naphthodianthrones par les cellules cancéreuses

IV. B. 1. i. Protocole d'incubation et d'extraction des cellules

L'incubation des cellules était soit réalisée dans le milieu de culture (RPMI complet), soit dans du RPMI seul, selon les expériences. En effet la présence de protéines dans le milieu d'incubation affecte l'internalisation de l'hypéricine ; nous avons donc jugé utile d'incuber les cellules avec et sans protéines dans le milieu. De plus, les solutions utilisées pour incuber les cellules étaient préalablement placées pendant 15 minutes dans un bain marie à 37,5°C afin de se stabiliser.

Les cellules étaient cultivées dans des boîtes de Pétri de 5mL pour la quantification des hypéricines internalisées, ou dans des flacons adaptés à la microscopie à épifluorescence. Avant l'incubation avec le RPMI simple, les cellules étaient lavées avec du PBS afin de faire disparaître les protéines résiduelles du milieu de culture. Ensuite les solutions d'incubation étaient préparées par dilution au centième des solutions mère d'hypéricines et de Millepertuis dans du DMSO. La concentration finale de DMSO dans le milieu était de 1% en volume, proportion qui n'induit pas de dommages aux cellules.

A la fin de la période d'incubation les cellules étaient lavées 4 fois avec du PBS. Les lamelles de microscopie étaient couvertes par une lamelle de verre. Les cellules des boîtes de Pétri étaient délicatement grattées à l'aide d'un grattoir stérile, reprises dans quelques centaines de microlitres de méthanol, extraites dans un bain à ultrasons, puis centrifugées 1 minute à 3000 tours/minute. Le lysat obtenu était analysé par spectrométrie de masse ou par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible.

IV. B. 1. ii. Microscopie de fluorescence

L'appareil de microscopie à épifluorescence que nous avons utilisé est présenté sur la Figure III. 16.

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.

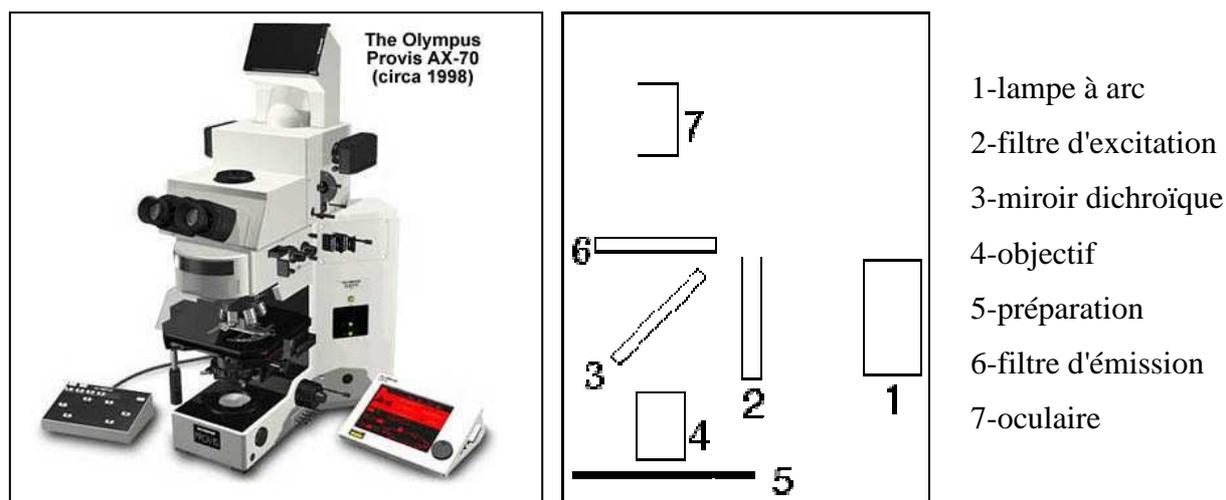


Figure III. 16 : Représentation du microscope à épifluorescence Olympus AX 70 (Olympus America inc.)

La visualisation du fluorochrome passe par trois étapes essentielles :

- 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. On parle alors de longueur d'onde d'excitation λ_{exc} .
- 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.
- un filtre d'émission laissera passer par transmission que les radiations propres du fluorochrome ($\lambda > \lambda_{exc}$.) par transmission.

Notre appareil dispose des blocs (λ_{exc} / filtre / λ_{em}) suivants (Tableau III. 2) :

Blocs	Longueur d'onde (nm)		
	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 III. 2 : Caractéristiques des blocs disponibles sur le microscope à épifluorescence Olympus AX 70 (Olympus America inc.)

IV. B. 2. La photocytotoxicité des extraits de Millepertuis

IV. B. 2. i. L'illumination laser des cellules cancéreuses

La source de lumière utilisée est un laser à colorants, le TDL50 (Quantel, Les Ulis, France), dont le pompage optique est effectué par la seconde harmonique d'un laser Nd-YAG ($\lambda=532\text{nm}$). La fréquence de tir laser disponibles sont 2, 5 et 10 Hz et la durée d'impulsion 12 ns. Le mélange de colorants organiques est constitué de Rhodamine 610 et Rhodamine 640 (Exciton, distribué par Opticas, France), permettant d'obtenir des longueurs d'onde allant de 580 à 620 nm. Les cultures cellulaires ont été illuminées à la longueur d'onde de 597 nm (réglée à l'aide d'un monochromateur HR 320, Horiba Jobin-Yvon, Longjumeau, France), correspondant au coefficient d'extinction molaire maximal de l'hypéricine en milieu aqueux. Afin d'obtenir un spot homogène et suffisamment étendu pour illuminer une boîte 96-puits (diamètre de 10cm), une fibre optique a été ajoutée en sortie du laser (distance entre la sortie de la fibre et l'échantillon : 30 cm). L'énergie déposée sur l'échantillon était mesurée avant et après l'illumination à l'aide d'une cellule SOLO PE (Gentec, ville de Québec, Canada)

IV. B. 2. ii. La détermination du taux de mortalité

Le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényltétrazolium) jaune dissous dans l'eau est converti en formazan pourpre insoluble par les déshydrogénases mitochondriales actives dans les cellules vivantes.

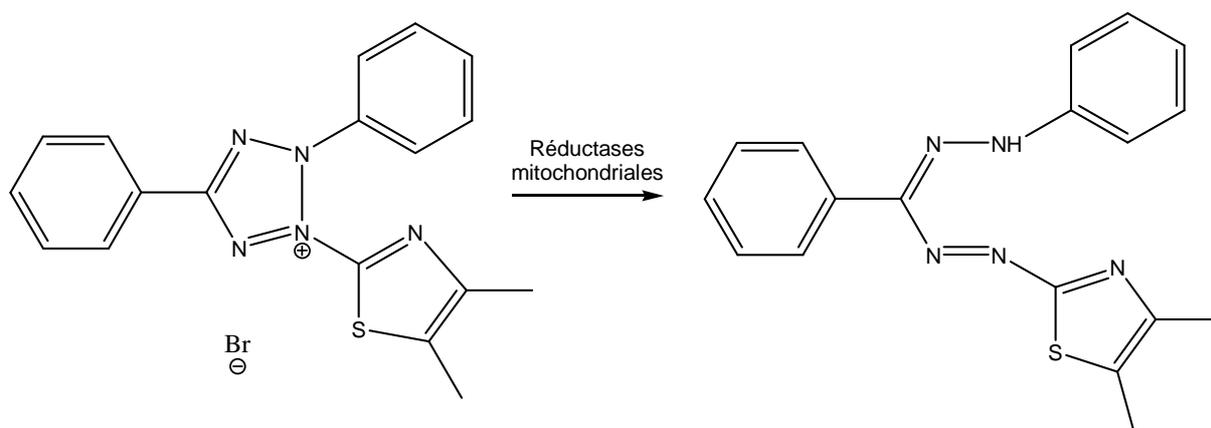


Figure III. 17 : Conversion du MTT en formazan

Les cellules mortes ne peuvent être le siège de ce changement. La quantité de matériel dissous peut alors être mesurée par spectrophotométrie, donnant une absorbance

Chapitre III : Matériels et méthodes

proportionnelle à la concentration de colorant converti, donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Les tests MTT sont réalisés avec des plaques 96-puits. Dans chaque puits 200µL d'une suspension cellulaire à $5 \cdot 10^4$ cellules/mL sont déposés, et les cellules sont laissées pendant 48h dans l'incubateur afin qu'elles se fixent au support. Après 48h, les cellules sont observées au microscope afin de vérifier qu'elles occupent environ 75% de la surface des puits. En effet il sera nécessaire de laisser les cellules au repos pendant 24h après incubation avec la substance testée, par conséquent les cellules viables vont continuer à se diviser, c'est pourquoi il est nécessaire qu'il reste environ 25% de la surface libre au fonds des puits.

24h après l'incubation des cellules avec les substances à tester, on ajoute 50µL de MTT (2.5 mg/mL dans du PBS) à chaque puits, y compris dans les « blancs » (puits qui ne contiennent pas de cellules). Les boîtes sont replacées dans l'incubateur pendant 3 heures. A leur sortie, on ajoute 50µL de SDS (à 25% dans l'eau) dans chaque puits, et on agite à l'aide d'une pipette afin de dissoudre complètement le précipité. Les bulles qui se forment à la surface des puits sont alors supprimées par un souffle d'air chaud. L'absorbance à 540 nm dans chaque puits est ensuite lue sur le lecteur de plaque multiscan MCC.

Chapitre IV

Caractérisation par Désorption/Ionisation Laser couplée
à la Spectrométrie de Masse des extraits de Millepertuis

INTRODUCTION :	93
I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES SUR L'ANALYSE DES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS	94
II. ANALYSES PAR DESORPTION-IONISATION LASER (ASSISTEE PAR MATRICE)	98
<i>II. A. Analyse du composé de référence par MALDI-TOF</i>	98
<i>II. B. Analyse d'un extrait méthanolique de Millepertuis par MALDI-TOF</i>	100
II. B. 1. Mode négatif.....	100
II. B. 2. Mode positif	101
II. B. 2. i. Empreinte spectrale de la 2,5-DHB	102
II. B. 2. ii. Analyse de l'extrait méthanolique de Millepertuis	103
II. B. 2. iii. Identification des chlorophylles.....	104
II. B. 2. iv. Propositions de structures pour les espèces lipidiques	107
II. B. 3. Conclusions.....	109
<i>II. C. Analyse de l'extrait par MALDI-FTICRMS</i>	110
II. C. 1. Mode négatif	110
II. C. 2. Mode positif.....	111
II. C. 2. i. Spectre obtenu pour l'extrait méthanolique de Millepertuis.....	111
II. C. 2. ii. Caractérisation de l'espèce détectée à m/z 539	112
II. C. 2. iii. Identification des autres espèces présentes sur le spectre MALDI-FTICRMS.....	115
<i>II. D. Analyse du matériel végétal in situ</i>	118
II. D. 1. L'Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS)	118
II. D. 2. IMS sur les échantillons végétaux	120
II. D. 3. Analyses in situ et IMS sur les pétales de fleurs de Millepertuis.....	121
CONCLUSIONS DU CHAPITRE :	128

Introduction :

Les extraits végétaux sont des mélanges complexes réunissant diverses catégories de molécules naturelles. La possibilité que ces molécules soient une ou plusieurs fois glycosylées ou oligomérisées complexifie grandement la composition de ces mélanges. Ainsi, leur caractérisation complète s'avère difficile, et peut nécessiter l'utilisation d'un nombre notable de techniques analytiques. Dans le cadre de cette étude qui porte sur les propriétés de l'extrait de Millepertuis en milieu organique et cellulaire, afin de simplifier quelque peu la démarche analytique, l'accent a été mis sur certaines familles de molécules jugées d'importance :

- les naphthodianthrones de la famille de l'hypericine, car elles sont susceptibles comme cette dernière de présenter des propriétés de fluorescence et phototoxicité intéressantes dans le cadre respectivement du photodiagnostic et de la photothérapie des cancers ;
- les phloroglucinols qui, au sein de la fleur de Millepertuis, sont représentés par l'hyperforine et l'adhyperforine ainsi que leurs produits de dégradation respectifs : en effet l'hyperforine présente des propriétés de cytotoxicité dont il pourrait être nécessaire de s'affranchir en vue d'une application en milieu cellulaire. De plus, les propriétés (autres qu'antidépessives) de cette famille de molécules sont encore mal connues¹ ;
- les polyphénols (flavones, flavonols, flavonoïdes, tannins, etc...), qui selon les conditions de leur utilisation peuvent se comporter comme des agents pro- ou antioxydants², et qui semblent pouvoir interagir avec l'hypericine par le biais d'un mécanisme non encore élucidé ayant pour conséquence d'améliorer la biodisponibilité de celle-ci³.

L'objectif des analyses qui vont être présentées dans ce chapitre et celui qui suit est d'évaluer le potentiel de différents types de spectromètres de masse, MALDI-TOF, ProMALDI-FTICR et ESI-FTICR pour l'analyse des métabolites secondaires du Millepertuis au sein de différentes matrices :

- dans le matériel végétal lui-même, afin d'envisager une extraction raisonnée des différentes parties de la plantes,
- dans des extraits organiques potentiellement utilisables en thérapie photodynamique et photodiagnostic

Ce Chapitre est particulièrement consacré à la mise en œuvre des procédés d'ionisation par Laser : Désorption/Ionisation Laser (LDI) et Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI) avec trois longueurs d'onde différentes.

¹ Medina, M. A., *et al.*, *Life Sciences*, 2006, **79**, 2, p 105

² Cao, G., *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine*, 1997, **22**, 5, p 749

³ Butterweck, V., *et al.*, *Planta Medica*, 2003, **69**, 3, p 189

I. Données bibliographiques sur l'analyse des extraits de Millepertuis

Les extraits de Millepertuis, de part leur utilisation en automédication pour le traitement de la dépression légère à modérée, ont fait l'objet de nombreuses analyses afin de quantifier de façon très précise les composés actifs présents dans les extraits secs, et les formulations galéniques qui en découlent.

La première technique utilisée a été la spectroscopie d'absorption UV-Visible, simple à mettre en œuvre et adaptée à la quantification grâce à la loi de Beer-Lambert⁴. Cependant cette technique a vite montré ses limites ; en effet une erreur plus ou moins négligeable était faite sur la quantification des hypéricines lorsque d'autres composés absorbant à 590 nm étaient présents dans les extraits⁵. Cette technique robuste reste toutefois adaptée à la quantification des hypéricines dans les extraits ne contenant pas ou très peu de chlorophylles, et dans lesquels les protopigments, possédant à 590nm des coefficients d'extinction molaire différents de ceux des pigments, sont absents, comme nous l'avons précisé dans le Chapitre III.

La technique la plus répandue pour l'analyse des extraits de Millepertuis est la Chromatographie en Phase Liquide Haute Performance (CLHP), couplée à la détection par spectroscopie d'absorption UV-Visible ; la détection à 590 nm permet alors la quantification des molécules de la famille des hypéricines (hypéricine, protohypéricine, pseudohypéricine, protopseudohypéricine) ; la détection à des longueurs d'onde plus faibles (inférieures à 300nm) permet en plus de détecter tous les autres composés de l'extrait. Cependant, pour certaines classes de composés comme les flavonoïdes, le nombre trop important de composés présents nécessite de recourir à des méthodes de quantification globale ; dans le cas des flavonoïdes glycosylés, une étape d'hydrolyse est souvent réalisée afin d'obtenir la concentration totale en aglycone⁶. Les hypéricines sont également détectées et quantifiées grâce à des détecteurs à fluorescence ($\lambda_{exc}= 470 \text{ nm}$, $\lambda_{ém} = 590 \text{ nm}$)⁷. Alors que la détection par spectrophotométrie UV permettait d'atteindre des concentrations de 10^{-6}M à 10^{-7}M ,⁸ elles ont pu être abaissées à 10^{-8}M par l'utilisation de la détection par fluorescence⁹. Les techniques de Chromatographie Liquide sont également utilisées pour la quantification des composés du Millepertuis dans divers fluides biologiques : plasma et sérum humains, urine ; la mise en œuvre de protocoles d'extraction liquide-liquide (extraction classique par un

⁴ European Pharmacopoeia (Ph Eur III Suppl 2000). Hypericum Monograph. Strasbourg, Cedex, Council of Europe

⁵ Nait-Si, Y., Fourneron, J. D., *Monatshefte für Chemie*, 2004, **135**, 10, p 1319

⁶ Biesaga, M., et al., *Chromatographia*, 2007, **75**, 11-12, p 701

⁷ Micali, G., et al., *Journal of Chromatography A*, 1996, **731**, 1-2, p 336

⁸ Krämer, W., Wiartalla, R., *Pharmazeutische Zeitung Wissenschaft*, 1992, **5**, 137, p 202

⁹ Jensen, A. G., Hansen, S. H., *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2002, **27**, 1-2, p 167

solvant organique¹⁰, « single drop extraction »¹¹) a permis d'atteindre des concentrations de l'ordre de 10^{-9} M pour ce type d'échantillons. Si la chromatographie liquide a été largement utilisée pour la quantification de l'hypéricine, cette technique souffre d'un manque de reproductibilité en raison d'une rétention excessive de l'hypéricine sur certaines colonnes. Ce phénomène, mis en évidence en 2004 par Piovan et al. grâce à la comparaison des aires de pics obtenues pour l'hypéricine en HPLC-UV et FIA-MS (Flow-Injection Analysis Mass Spectrometry)¹², n'a pour l'instant pas trouvé d'explication. En effet ils n'ont pu corrélérer la différence obtenue avec aucune caractéristique des colonnes étudiées, et ont écarté une polymérisation de l'hypéricine ou une chélation par un métal présent à l'état de traces.

Afin de caractériser les structures de certains produits, et notamment les produits de dégradation de l'hyperforine, plusieurs équipes se sont tournées vers la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie liquide^{13,14}. Ce type d'appareillage a également été utilisé pour la caractérisation des hypéricines. Le spectromètre de masse utilisé était un triple quadripôle, et des expériences de dissociation ont été réalisées dans le deuxième quadripôle par CAD (Dissociation Activée par Collisions) sur les molécules d'hypéricine, pseudohypéricine, protohypéricine et protopseudohypéricine, donnant lieu à des combinaisons de pertes des neutres : CH_4 , CH_3OH , CO_2 , $\text{CH}_2=\text{CO}$, CO , H_2O (Figure IV. 1).

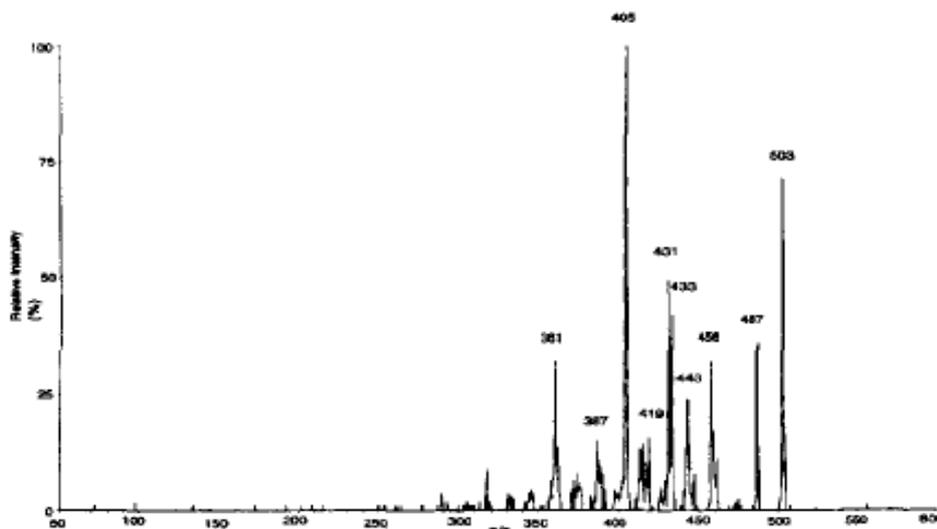


Figure IV. 1 : Spectre ESI-CAD-MS obtenu par Piperopoulos et al. pour l'hypéricine¹⁵

¹⁰ Pirker, R., et al., *Journal of Chromatography B*, 2002, **777**, 1-2, p 147

¹¹ Gioti, E. M., et al., *Journal of Chromatography A*, 2005, **1093**, 1-2, p 1

¹² Piovan, A., et al., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2004, **18**, 1, p 131

¹³ Fuzzati, N., et al., *Journal of Chromatography A*, 2001, **926**, 1, p 187

¹⁴ Vajs, V., et al., *Fitoterapia*, 2003, **74**, 5, p 439

¹⁵ Piperopoulos, G., et al., *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, **695**, 2, p 309

Les molécules de la famille des flavonoïdes ont elle fait l'objet de caractérisations par CID (Dissociation Induite par Collision). Ainsi, Domon et Costello ont établi en 1988 une nomenclature des fragments issus de fragmentations observées en FAB-MS/MS au niveau des unités glycosidiques, présentée sur la Figure IV. 2¹⁶.

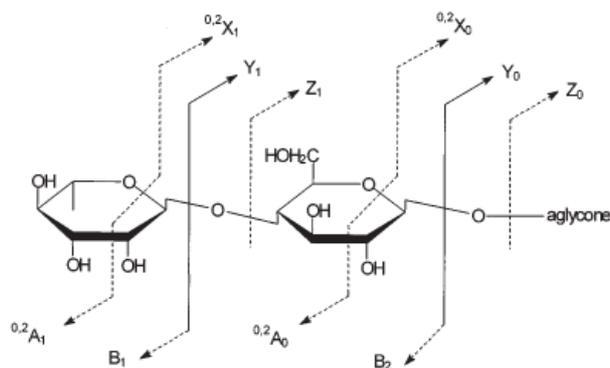


Figure IV. 2 : Nomenclature proposée par Domon et al. pour les fragmentations glycosidiques observées en FAB-MS/MS

Les fragmentations des flavonoïdes au niveau des unités glycosidiques peuvent être observées à faible énergie ; en revanche des énergies d'activation plus importantes sont nécessaires pour observer la fragmentation de la partie aglycone. Là encore il existe une nomenclature qui est celle de Ma et al. (Figure IV. 3), basée sur l'attribution des lettres A, B et C aux trois cycles présents sur la parties aglycone des flavonoïdes, et la numérotation des liaisons susceptibles de subir des coupures.

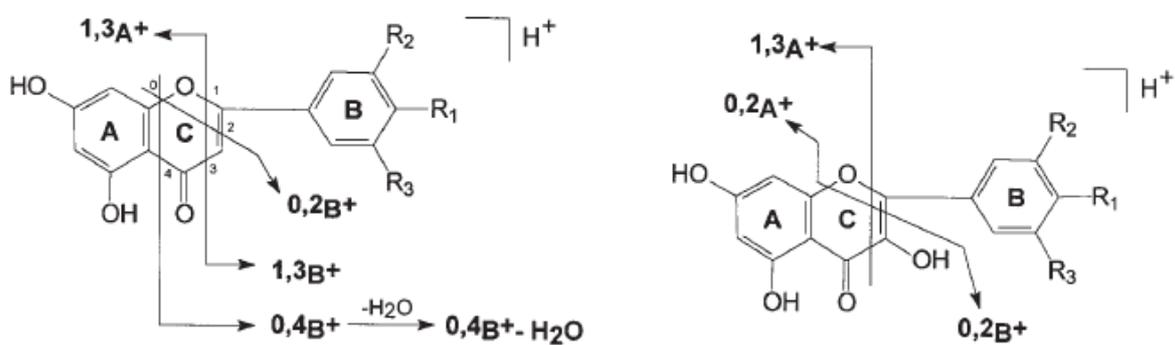


Figure IV. 3 : Nomenclature proposée par Ma et al. pour les fragments issus de l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la partie aglycone des flavonoïdes¹⁷

¹⁶ Domon, B., Costello, C. E., *Glycoconjugate*, 1988, **5**, p 397

¹⁷ Ma, Y. L., et al., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 1997, **11**, 12, p 1357

En 1999, Hansen et al. mettent au point un couplage HPLC/RMN (Résonance Magnétique Nucléaire) pour différencier les composés possédant des temps de rétention quasi similaires et donnant en spectrométrie de masse des signaux identiques tels que l'isoquercitrin et l'hypéroside. Ils appliquent ensuite leur technique à l'élucidation de composés jamais encore détectés au sein des extraits de Millepertuis, le quercetin-arabinoside et le quercetin galacturonide¹⁸. Cependant, cette technique ne pouvait être utilisée que pour des composés représentant environ 0,5% de l'extrait sec, et un pré-fractionnement de l'extrait était nécessaire pour abaisser la limite de caractérisation à 0,1%. Afin de contrecarrer ce problème, Tatsis et al. analysent en 2006 des extraits de Millepertuis avec un appareillage similaire mais avec une unité d'extraction en phase solide (SPE) entre la Chromatographie Liquide et la RMN¹⁹. Ce type d'appareillage qui a fait l'objet d'études sur des produits naturels²⁰ et sur des métabolites de médicaments²¹ leur a permis pour la première fois de détecter l'hyperfirine et l'adhyperfirine. Ces composés avaient été hypothétiquement décrits par Bystrov et al. dans le cadre de la biosynthèse de l'hyperforine²². La Résonance Magnétique Nucléaire a également été évaluée pour la quantification de l'hypéricine et de la pseudohypéricine dans les extraits de Millepertuis, grâce aux signaux obtenus pour les protons situés en position *peri*, qui sont fortement déblindés et possèdent des déplacements chimiques dans la gamme 14-15 ppm, exempte de tout autre signal dans les extraits de Millepertuis²³.

La chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse a été utilisée pour la caractérisation des composés peu polaires présents dans les extraits de fleurs de Millepertuis : acides gras (longueur de chaîne : 10 à 24 carbones ; saturés et insaturés), n-alcanes (19 à 33 carbones)²⁴, esters d'acides gras (glycerylpalmitate, méthyllinoléate), terpénoïdes (squalène, phytol, sitosterol, ...) ²⁵ et dérivés de l'hyperforine²⁶.

Ces données mettent en avant le recours quasi systématique à des techniques séparatives (chromatographies en phase gaz et liquide) pour l'analyse des extraits de Millepertuis. Pourtant, en 2000, Mauri et al.²⁷ ont montré le potentiel analytique de l'ionisation par Electronébullition en infusion directe pour l'obtention d'une empreinte caractéristique de ces extraits, et ce malgré une résolution spectrale assez faible et l'absence de signaux pour

¹⁸ Hansen, S. H., *et al.*, *Analytical Chemistry*, 1999, **71**, 22, p 5235

¹⁹ Tatsis, E. C., *et al.*, *Phytochemistry*, 2007, **68**, 3, p 383

²⁰ Miliuskas, G., *et al.*, *Journal of Natural Products*, 2005, **68**, 2, p 168

²¹ Godejohann, M., *et al.*, *Journal of Chromatography A*, 2004, **1058**, 1-2, p 191

²² Bystrov, N. S., *et al.*, *Tetrahedron Letters*, 1975, **32**, p 2791

²³ Tatsis, E. C., *et al.*, *Analytica Chimica Acta*, 2007, **607**, 2, p 219

²⁴ Stojanovic, G., *et al.*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003, **31**, 2, p 223

²⁵ Nogueira, T., *et al.*, *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007, **36**, 1, p 40

²⁶ Seger, C., *et al.*, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2004, **21**, 4, p 453

²⁷ Mauri, P., Pietta, P., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000, **14**, 2, p 95

certaines composés généralement présents en quantités significatives dans les extraits (biapigénine, acides hydroxycinnamiques et procyanidines notamment). Dans le cadre de ce travail, le potentiel de l'ionisation par Electronébullition a été évalué lorsqu'elle est couplée à la Spectrométrie de Masse Très Haute Résolution (cf Chapitre V). Par ailleurs, nous avons également exploré la voie de l'ionisation par Désorption Laser, qui fait également partie des techniques d'ionisation dites « douces » (qui fournissent peu d'énergie aux molécules et induisent très peu de fragmentations). Ces résultats vont être présentés dans ce Chapitre.

II. Analyses par Désorption-Ionisation Laser (Assistée par Matrice)

Les extraits de Millepertuis n'ont à notre connaissance jamais fait l'objet d'analyses par Désorption/Ionisation Laser couplée à la Spectrométrie de Masse. Pourtant, cette technique a fait ses preuves pour l'analyse de plusieurs classes de composés entrant dans la composition des extraits de Millepertuis, tels que les flavonoïdes, les anthocyanines²⁸, les procyanidines²⁹. D'autres composés ont fait l'objet d'un nombre plus restreint d'études : les chlorophylles³⁰ et certains dérivés de hyperforine³¹. En revanche, aucune donnée n'est disponible sur le comportement de l'hypéricine et de ses dérivés lorsqu'ils sont soumis à ce type d'ionisation. Le MALDI-TOF est une technique sensible (limites de détection de l'ordre de la femtomole), permettant une analyse rapide, présentant une forte tolérance par rapport aux contaminants et ne générant que des ions monochargés. Depuis le début des années 2000, elle fait l'objet de nombreuses études visant à comparer les résultats obtenus avec ceux de l'HPLC³², dans le but de conduire à des temps d'analyse plus courts pour la caractérisation d'extraits végétaux. Nous nous sommes donc proposés d'évaluer le potentiel de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'analyse, dans un premier temps, de l'hypéricine et de ses dérivés, composés dont la présence est un gage de qualité des extraits de Millepertuis et permet la classification des espèces au sein du genre *Hypericum*, et dans un second temps pour l'analyse des extraits de Millepertuis.

II. A. Analyse du composé de référence par MALDI-TOF

Dans un premier temps nous avons souhaité analyser des composés de référence, et notamment l'hypéricine, afin de déterminer les conditions d'analyses optimales que nous

²⁸ Sugui, J. A., et al., *Phytochemistry*, 1998, **48**, 6, p 1063

²⁹ Krueger, C. G., et al., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, **48**, 5, p 1663

³⁰ Xu, H., et al., *Plant Biology*, 2001, **98**, 24, p 14168

³¹ Winkelmann, K., et al., *Journal of Natural Products*, 2001, **64**, 6, p 701

³² Wang, J., et al., *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, **48**, 8, p 3330

allions utiliser pour nos extraits de Millepertuis. La Figure IV. 4 résume les expériences menées sur une solution d'hypericine à 10^{-5} M dans le méthanol dans les différentes configurations analytiques possibles sur notre appareil.

Les spectres ont été calibrés par une méthode externe : en mode positif grâce aux adduits sodiques et potassiques obtenus en analysant une solution de PEG 600, en mode négatif par les pics de masse obtenus avec l'analyse d'une solution de chromate de potassium trivalent.

Les spectres de masse présentés sur la Figure IV. 4 montrent que l'analyse par désorption laser en mode négatif de l'hypericine conduit à la détection de l'ion $[M-H]^-$. L'ion M^{++} est détecté en mode positif que ce soit avec ou sans matrice ; l'ion protoné est détecté avec une intensité environ deux fois supérieure à celle de l'ion M^{++} lorsqu'une matrice est utilisée. Il est à noter que tous les dépôts effectués avec une matrice l'ont été en mélange intime pour favoriser l'inclusion des molécules cible au sein des molécules de matrice.

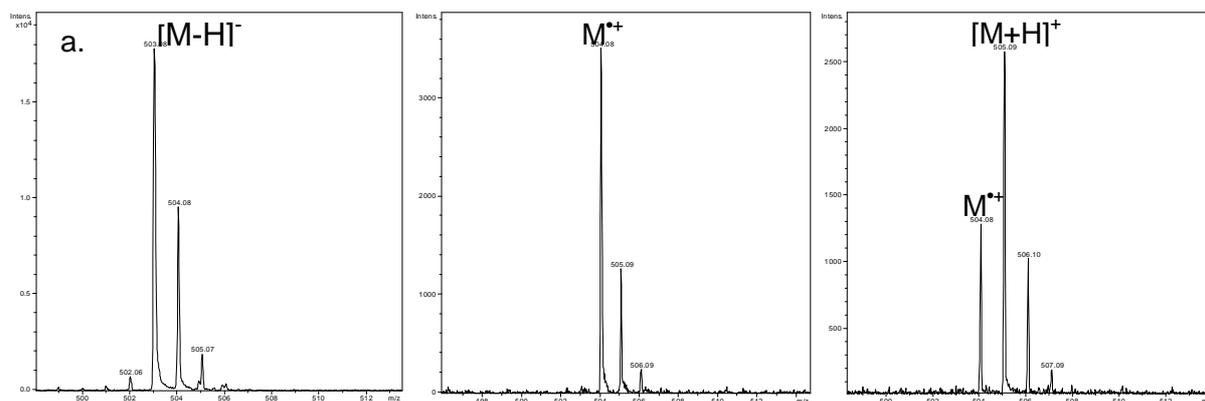


Figure IV. 4 : Distributions isotopiques obtenues lors de l'analyse de l'hypericine à 10^{-5} M par LDI-TOF en mode de détection **négatif** (a.) et **positif** (b.) et MALDI-TOF (matrice 2,5 DHB) en mode **positif** (c.)

Le Tableau IV. 1 récapitule les données obtenues pour l'analyse de l'hypericine dans les différentes conditions que nous avons testées. L'optimum en termes de rapport signal/bruit (valeur moyenne obtenue sur trois dépôts identiques) est obtenu dans le cas de la désorption-ionisation laser à 337 nm et avec une détection en mode négatif. La désorption laser à 266 nm conduit à un rapport signal/bruit légèrement plus faible. L'utilisation d'une matrice conduit systématiquement à un rapport signal/bruit (sur le $[M+H]^+$) plus faible, partiellement dû à la détection conjointe des ions M^{++} et $[M+H]^+$.

La technique MALDI-TOFMS permet donc la détection du composé photoactif hypericine, avec une limite de détection que nous avons déterminée à environ 5.10^{-7} M pour un volume d'échantillon déposé de 1μ L.

Longueur d'onde	Mode de détection	Matrice (10^{-1} M)	Pic majoritaire	Rapport signal/bruit
337 nm	Négatif	/	503	421
	Positif	HCCA	505	62
		HCCA + TFA	505	333
		2,5-DHB	505	174
		2,5-DHB + TFA	505	127
		AV	ND	ND
		AV + TFA	505	135
		DNBP	ND	ND
		DNBP + TFA	ND	ND
		AN	505	104
		AS	505	123
		/	504	150
266 nm	Négatif	/	503	338
	Positif	AN	ND	ND
		2,5-DHB	505	38
		HCCA	505	20
		/	504	104

Tableau IV. 1 : Tableau récapitulatif des rapports signal/bruit obtenus pour la détection de l'hypéricine (solution méthanolique à 10^{-5} M) en (MA)LDI/TOFMS dans les différentes conditions testées (ND : non détecté ; 2,5-DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque ; AV : acide vanillique ; AN : acide nicotinique ; HCCA : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ; ; TFA : acide trifluoroacétique 1%)

II. B. Analyse d'un extrait méthanolique de Millepertuis par MALDI-TOF

II. B. 1. Mode négatif

Les analyses en mode négatif ont été conduites dans les conditions précédemment décrites. Le spectre de masse obtenu, présenté sur la Figure IV. 5, met en évidence la détection sous la forme $[M-H]^-$ de molécules de la famille des hypéricines et des hyperforines, ainsi que quatre flavonoïdes. La précision en masse obtenue, donnée en ppm, est compatible avec les performances de l'appareil. Cependant les rapports signal/bruit sont faibles (de 45 pour le pic à m/z 609 à 300 pour celui à m/z 503) et une inhomogénéité est constatée au niveau des dépôts.

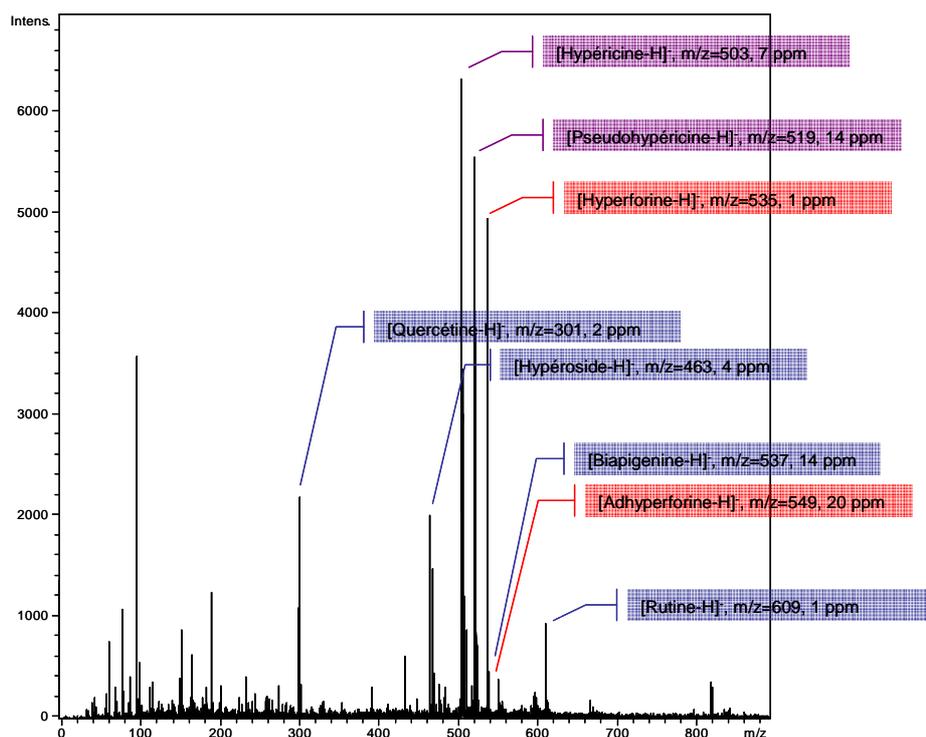


Figure IV. 5 : Spectre LDI-TOFMS en mode de détection **négatif** d'un extrait méthanolique de Millepertuis

Ion détecté	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
[Quercétine-H] ⁻	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301,035	301,036	2	4000
[Hypéroside-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,088	463,086	4	4480
[Hypéricine-H] ⁻	C ₃₀ H ₁₅ O ₈ ⁻	503,077	503,081	7	3800
[Pseudohypéricine-H] ⁻	C ₃₀ H ₁₅ O ₉ ⁻	519,072	519,079	14	4100
[Hyperforine-H] ⁻	C ₃₅ H ₅₁ O ₄ ⁻	535,379	535,379	1	6200
[Amentoflavone-H] ⁻	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	537,083	537,090	14	5800
[Adhyperforine-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₃ O ₄ ⁻	549,395	549,385	20	6000
[Rutin-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609,146	609,147	1	7000

Tableau IV. 2 : Données expérimentales et théoriques pour les ions détectés en mode de détection négatif en LDI-TOFMS sur l'extrait de Millepertuis

II. B. 2. Mode positif

Les analyses en mode positif ont été réalisées en utilisant la matrice 2,5-DHB, conseillée pour l'analyse de petites molécules organiques. Des tests ont également été effectués à l'aide de la 2,4,6-trihydroxyacétophénone (THAP), matrice généralement utilisée pour l'analyse des polyphénols (composés standard) comme précisé dans le Chapitre précédent,

mais ils n'ont pas permis un gain d'informations par rapport à l'utilisation de la 2,5-DHB. Il est à noter que Carpentieri et al. ont fait la même constatation dans le cadre de la caractérisation, non limitée à une classe de molécules, d'échantillons de vin rouge³³.

II. B. 2. i. Empreinte spectrale de la 2,5-DHB

Si le MALDI semble être une technique efficace pour l'ionisation des molécules naturelles, d'après les exemples fournis par la bibliographie et référencés dans le chapitre précédent, l'analyse d'extraits végétaux complexes pose le problème de la distinction qu'il est nécessaire de faire entre les pics de matrice et les pics correspondant aux molécules de l'extrait. Les gammes de masse sur lesquelles s'étendent ces deux classes de signaux sont en effet semblables. Dans ce cadre la Figure IV. 6 présente le spectre obtenu en mode de détection positif pour une solution standard de matrice 2,5-DHB à 10^{-1} M.

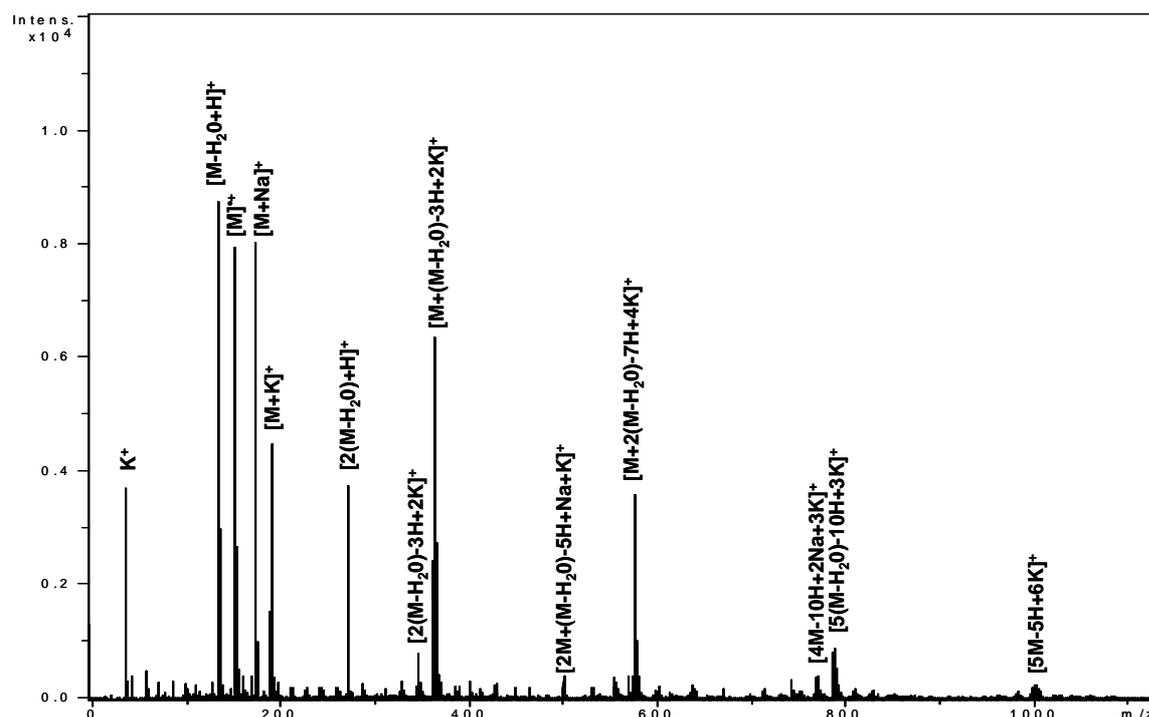


Figure IV. 6 : Spectre LDI-TOFMS obtenu en mode de détection **positif** pour l'acide 2,5-dihydrobenzoïque (2,5-DHB) (concentration 10^{-1} M, mode positif, $\lambda=337$ nm, 80 % d'atténuation laser)

Afin d'identifier un maximum d'agrégats correspondant à la matrice, ce spectre a été réalisé à une irradiance légèrement supérieure à celle utilisée pour l'analyse des extraits ; ces

³³ Carpentieri, A., et al., *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, **389**, 3, p 969

conditions ne modifient l'allure du spectre que par l'apparition d'agrégats en haute masse (entre 600 et 1000). Les pics ont été dans un premier temps identifiés d'après l'équation permettant de calculer les masses des clusters de 2,5-DHB³⁴ :

$$M_{\text{Cluster}} = nM + p[M-H_2O] - xH + yK + zNa \quad (\text{Equation IV. 1})$$

avec $x = y + z - 1$ et $y + z \leq n + p + 1$

Si cette équation a permis d'identifier une partie des signaux observés, certains restaient inexplicables et semblaient correspondre à des clusters calculés à l'aide de l'Equation IV. 1 avec une différence d'un nombre pair de quelques unités de masse, faisant penser à des clusters au sein desquels les molécules de 2,5-DHB seraient liées de façon covalente. L'ajout de clusters correspondant à l'Equation IV. 1 avec $x = (y + z - 1) + 2(n + p - 1)$ a ainsi permis d'identifier tous les pics détectés.

II. B. 2. ii. Analyse de l'extrait méthanolique de Millepertuis

Une fois les clusters de 2,5-DHB identifiés, un extrait de Millepertuis a été analysé en mélange intime avec cette matrice (2,5-DHB à $10^{-1}M$ dans MeOH/H₂O-10/90, extrait normalisé à $10^{-5}M$ en hypéricines et solubilisé dans du méthanol). Le spectre a été calibré en externe avec une solution de PEG 600 en mélange intime avec de la 2,5-DHB, donnant les deux distributions typiques [PEG+Na]⁺ et [PEG+K]⁺, centrées sur 700 et s'étendant de 400 à 1000. Afin de calibrer également les basses masses nous avons utilisé les signaux de 2,5-DHB à m/z 137, 154, 155, 177, 193, 273 et 365, précédemment identifiés sur la Figure IV. 6. Ainsi, nous avons obtenu une calibration précise à 10 ppm en moyenne sur une gamme de masse allant de 137 à 965.

L'analyse du spectre obtenu pour l'extrait de Millepertuis (Figure IV. 7) et la confrontation des pics de masse avec les données bibliographiques concernant la composition des extraits de Millepertuis permet d'identifier des composés faisant essentiellement partie de la classe des polyphénols. Ces composés ne sont pas tous détectés sous la même forme, certains s'ionisant par protonation, d'autres par la formation d'adduits alcalins [M+Na]⁺ et [M+K]⁺ ; concernant notre extrait de Millepertuis, on constate que les composés non glycosylés, flavonols (quercétine, kaempférol) et biflavanone (amentoflavone/biapigénine), sont détectés uniquement sous la forme d'ions protonés. Les flavonoïdes monoglycosylés (apigénin

³⁴ Keller, B. O., Li, L., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000, **11**, 1, p 88

glucoside, hypéroside, quercitrine) peuvent être détectés à la fois sous forme d'ions protonés ou sous forme d'adduits alcalins, tandis que le flavonoïde biglycosylé rutine n'est détecté que sous la forme d'adduits alcalins. Ces résultats mettent en avant une tendance indiquant que la glycosylation des flavonoïdes favorise leur ionisation sous la forme d'adduits alcalins, qui a déjà été observée par ailleurs³⁵. Il est bon de noter ici que les techniques de spectrométrie de masse que nous avons utilisées au cours de notre étude ne permettent pas de faire la distinction entre les différents isomères possibles pour les unités glycosidiques présentes sur les composés ; les attributions que nous présenterons au cours de ce travail sont des hypothèses les plus probables compte-tenu des données que nous avons pu trouver dans la bibliographie.

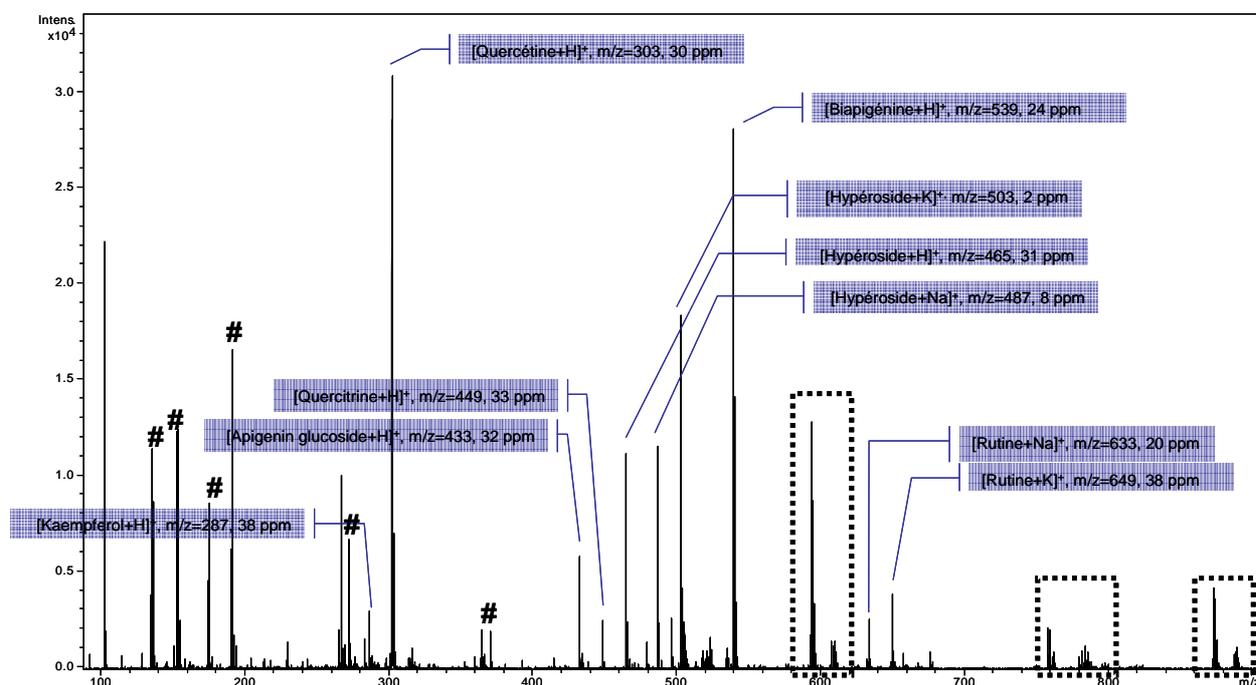


Figure IV. 7 : Spectre MALDI-TOFMS en mode de détection **positif** d'un extrait de Millepertuis (# : pics de matrice, $\lambda = 337$ nm, 90% d'atténuation laser)

Les zones encadrées présentent quant à elles des massifs de signaux plus particuliers et sont présentées agrandies sur la Figure IV. 9 et la Figure IV. 13.

II. B. 2. iii. Identification des chlorophylles

Les massifs autour de 593 et 607 sont attribuables aux *phéophorbides a* et *b* et ceux à 871 et 885 aux *phéophytines* correspondantes (structures présentées sur la Figure IV. 8).

³⁵ Wang, J., Sporns, P., *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 5, p 1657

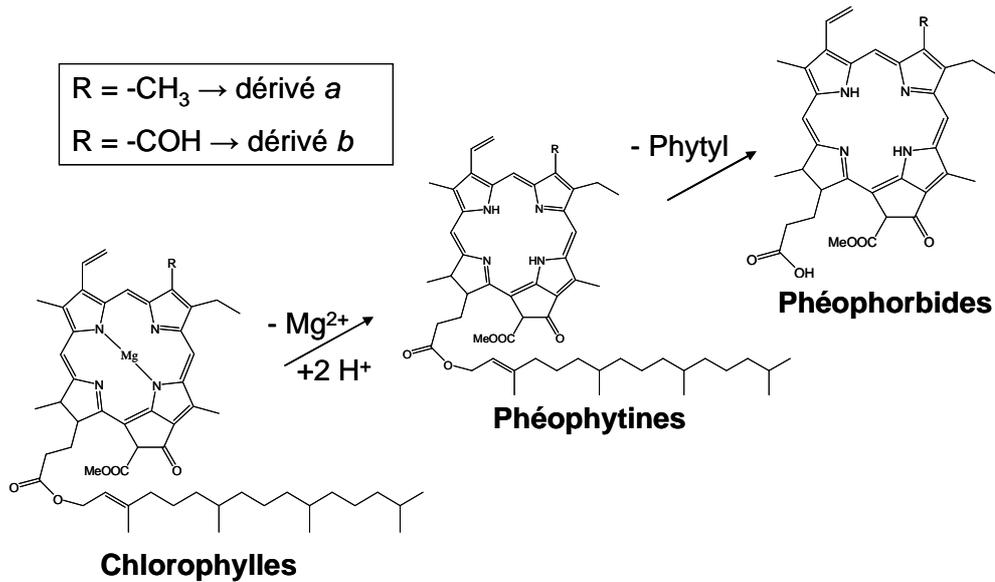


Figure IV. 8 : Structures des chlorophylles, phéophytines et phéophorbides

Cependant, les massifs isotopiques observés pour ces dérivés de chlorophylle ne sont pas compatibles avec les données obtenues théoriquement (exemple de la *phéophytine a* : le pic monoisotopique est à 871,6, la contribution en M+1 correspond théoriquement à 62% du pic monoisotopique et la contribution en M+2 à 20%) ; pourtant, les massifs isotopiques observés pour les autres composés d'intensité comparable sur le spectre de l'extrait sont corrects, une saturation du signal à $[M+H]^+$ est donc peu probable.

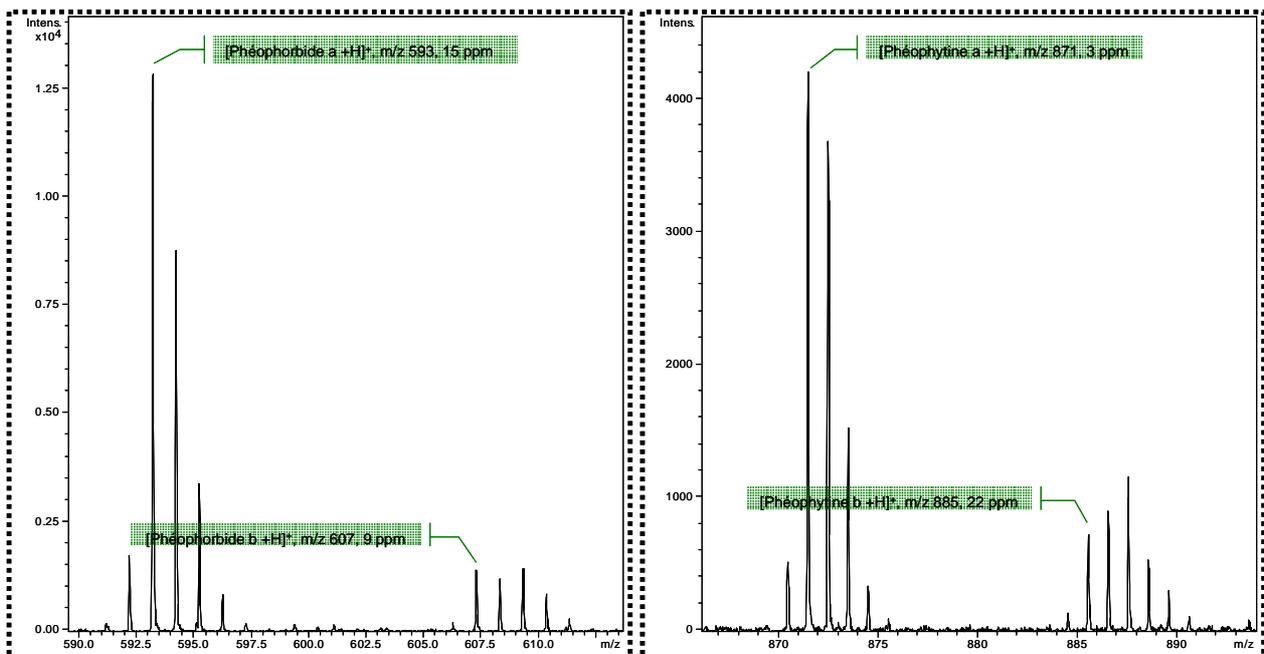


Figure IV. 9 : Agrandissement des zones du spectre de l'extrait de Millepertuis correspondant aux dérivés de la chlorophylle

Afin de préciser le comportement de la chlorophylle vis-à-vis de la désorption laser, l'analyse d'un échantillon standard de *chlorophylle a* à 10^{-5} M a été réalisée avec la 2,5-DHB.

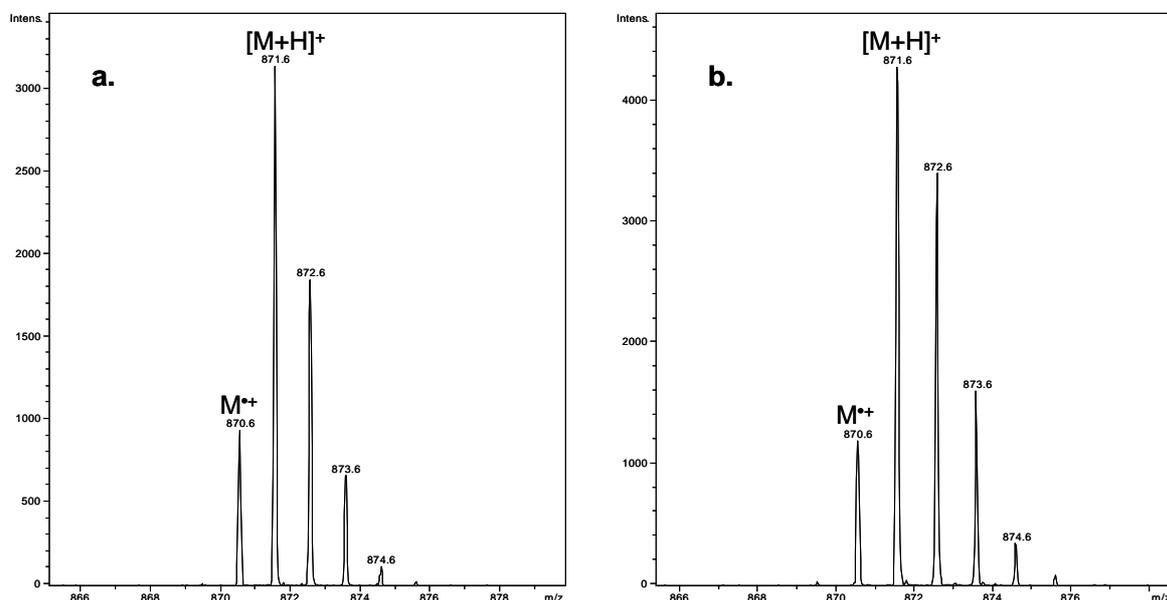


Figure IV. 10 : Spectre MALDI-TOFMS de la *chlorophylle a* à : a. 95 %, b. 90 % d'atténuation laser ($\lambda=337$ nm)

Aucun résultat n'a été obtenu avec la matrice à 10^{-1} M, en revanche le composé est bien détecté avec une concentration en 2,5-DHB 10^{-2} M, mais sous la forme phéophytine, c'est-à-dire sans l'atome de magnésium. Ce résultat semble indiquer que la chlorophylle ne peut pas être détectée intacte en MALDI-TOF dans les conditions que nous avons utilisées pour notre extrait ; ceci pourrait s'expliquer par l'acidité de la 2,5-DHB ($pK_a \approx 3$ ³⁶) qui induit des pH de l'ordre de 2 à 3 dans les solutions déposées sur la plaque MALDI, et qui sont susceptibles de conduire au remplacement de l'atome de magnésium de la *chlorophylle* par deux atomes d'hydrogène³⁷.

Les recherches bibliographiques que nous avons menées amènent le constat que la désorption laser a été très peu utilisée pour les *chlorophylles* ; Xu et al.³⁸ ont analysé la *chlorophylle b* identifiée à 907,7 Th, attribué à l'ion $[M+H]^+$, et un autre à 630,7, consécutif d'après eux à la perte du groupement phytyl (chaîne carbonée de la *chlorophylle*). Cependant, la matrice utilisée, le terthiophène (présenté sur la Figure IV. 11), permet plutôt

³⁶ Kapp, E. M., Coburn, A. F., *Journal of Biological Chemistry*, 1942, **145**, p 549

³⁷ Koca, N., et al., *Food Chemistry*, 2007, **100**, 2, p 609

³⁸ Xu, H., et al., *Plant Biology*, 2001, **98**, 24, p 14168

l'ionisation par transfert d'électron que par transfert de proton³⁹, et joue plutôt un rôle de protection de l'échantillon ; l'obtention d'un adduit protoné est donc peu probable, et l'ion à m/z 907 pourrait par conséquent correspondre à l'adduit sodique de la *phéophytine b* (la précision en masse obtenue ne permet pas de les discriminer).

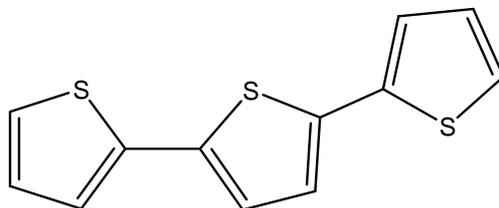


Figure IV. 11 : Structure du terthiophène

Finalement, il semble que la détection de la *phéophytine* puisse correspondre soit à une présence réelle de la *phéophytine* dans l'extrait, soit à la présence de *chlorophylle*. En ce qui concerne les massifs isotopiques, l'analyse de la *chlorophylle a* a révélé que la distribution était très sensible à l'énergie laser déposée sur l'échantillon. A titre d'exemple, la Figure IV. 10 présente les spectres obtenus à 90 et 95 % d'atténuation, qui présentent des massifs isotopiques sensiblement différents.

II. B. 2. iv. Propositions de structures pour les espèces lipidiques

Les signaux observés entre 750 et 850 se présentent quant à eux sous la forme de massifs de pics séparés de deux unités de masse, indiquant la présence possible d'une longue chaîne carbonée pouvant présenter plusieurs insaturations. Parmi les composés de cette gamme de masse susceptibles d'être présents dans les extraits de plante et de présenter une partie aliphatique, les phospholipides ont retenu notre attention. Ces molécules, constituant les membranes lipidiques des cellules de nombreux organismes, se présentent sous la forme de deux acides gras unis par un groupement phosphate lui-même relié à un motif variable R (Figure IV. 12, nomenclature présentée en Annexes).

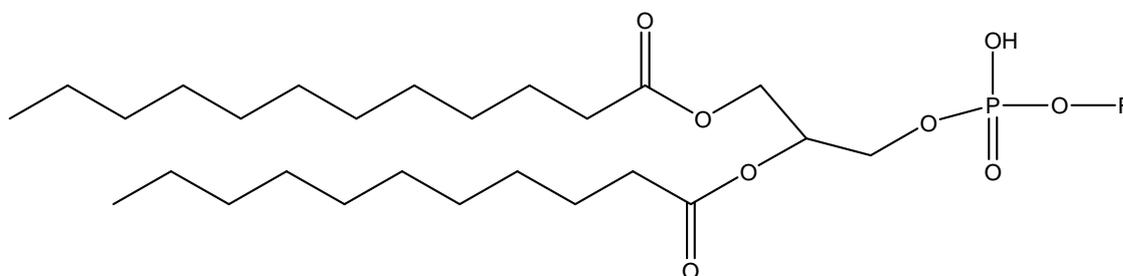


Figure IV. 12 : Structure générale des phospholipides

³⁹ McCarley, T. D., *et al.*, *Anal. Chem.*, 1998, **70**, 20, p 4376

La variété des types de groupement R possibles rend difficile l'attribution directe des pics soupçonnés d'être des phospholipides. Afin de faciliter celle-ci, un tableau regroupant les masses des ions issus de toute une gamme de phospholipides (de 24 à 44 carbones sur les chaînes latérales) est présenté en Annexe. La consultation de ce tableau a permis d'attribuer les pics observés sur le spectre de masse comme étant des dérivés de phosphatidylcholine PC ($R = -CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$); ces ions n'ayant pas fait l'objet d'expériences de fragmentation pouvant permettre la description des chaînes latérales, la nomenclature que nous avons adoptée est de type PC(x, y), avec x le nombre total d'atomes de carbones sur les chaînes, et y le nombre d'insaturations qu'elles comportent. La précision en masse observée sur ces signaux, 5 ppm en moyenne, ainsi que la prédominance de la famille des phosphatidylcholines généralement constatée au sein des membranes de la plupart des organismes eukaryotes⁴⁰, viennent appuyer ces attributions.

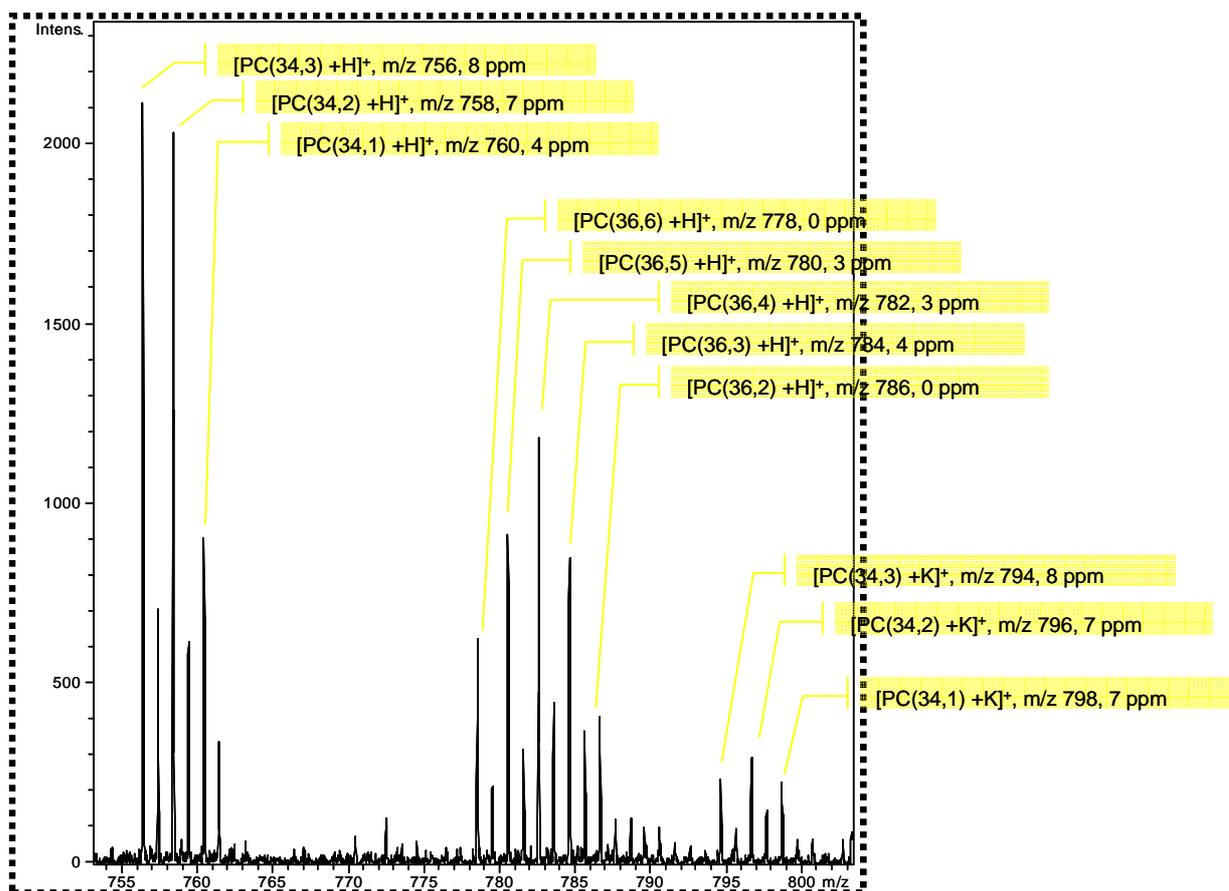


Figure IV. 13 : Agrandissement de la zone du spectre de l'extrait de Millepertuis correspondant aux phospholipides

⁴⁰ Exton, J. H., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*, 1994, **1212**, 1, p 26

II. B. 3. Conclusions

Finalement, la précision en masse moyenne que nous avons obtenue sur l'ensemble des pics que nous avons pu identifier, 20 ppm, est compatible avec les performances décrites dans la littérature sur l'analyse d'extrait végétal, sur lesquels la précision en masse varie généralement entre 50⁴¹ et 500 ppm⁴². La résolution moyenne des pics identifiés, 8800 (de 3800 à 12000), est satisfaisante mais ne permet par exemple de distinguer que des ions séparés d'au moins 0,05 Da dans la zone autour de 450 Da. Ainsi, la résolution est suffisante pour attribuer le pic à m/z 433 à l'apigénin glucoside ($[M+H]^+$, 433,113 Da) même si l'extrait peut aussi contenir de la kielcorin C ($[M+H]^+$, 433,165 Da) ; en revanche, les limites instrumentales ne permettent pas d'attribuer sans ambiguïté le pic à m/z 487, qui peut correspondre à la quercitrine ($[M+K]^+$, 487,064 Da) ou à l'hypéroside ($[M+Na]^+$, 487,085 Da)

La technique MALDI-TOFMS permet donc, grâce à la combinaison des informations obtenues en mode positif et négatif, de détecter des molécules de type polyphénols, naphthodianthrones, phloroglucinol, dérivés chlorophyllés et phospholipides. Le MALDI-TOFMS s'avère donc être une technique de choix, de par sa rapidité, pour la détermination rapide de l'empreinte spectrale d'un extrait de plante. Cependant, l'efficacité du dépouillement des spectres obtenus avec cette technique est conditionnée pour le mode positif, par une systématisation de la distinction entre pics de matrice et ions issus du mélange étudié, et dans les deux modes par l'exhaustivité des données bibliographiques rassemblées sur la composition du mélange étudié. En effet, l'erreur constatée sur les masses ne permet pas l'obtention directe de la formule brute des composés, et hormis le mode PSD, qui nécessite des quantités d'ions assez importantes, aucun autre mode de fragmentation n'est disponible sur l'appareil. Nous avons donc souhaité dans un second temps évaluer le potentiel de la technique MALDI couplé cette fois à la Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions à Transformée de Fourier (FTICRMS). La haute résolution apportée par la FTICRMS allait sans doute permettre une identification facilitée ; cependant le laser installé sur la source MALDI de notre FTICRMS est plus haut en longueur d'onde (355 nm), et l'ionisation des composés peut s'en trouver affectée.

⁴¹ Carpentieri, A., *et al.*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, **389**, 3, p 969

⁴² Wang, J., *et al.*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2000, **48**, 8, p 3330

II. C. Analyse de l'extrait par MALDI-FTICRMS

II. C. 1. Mode négatif

Les analyses en mode négatif sur l'extrait méthanolique de Millepertuis ont, dans un premier temps, été réalisées dans les mêmes conditions qu'en LDI-TOFMS. Cependant, le dépôt d' $1\mu\text{L}$ d'extrait n'a pas permis d'obtenir un spectre exploitable, et il a été nécessaire de déposer 10 fois $1\mu\text{L}$. Le spectre obtenu est présenté sur la Figure IV. 14 ; il correspond à la somme de 20×8 tirs lasers à une puissance correspondant à 22% de la valeur maximale.

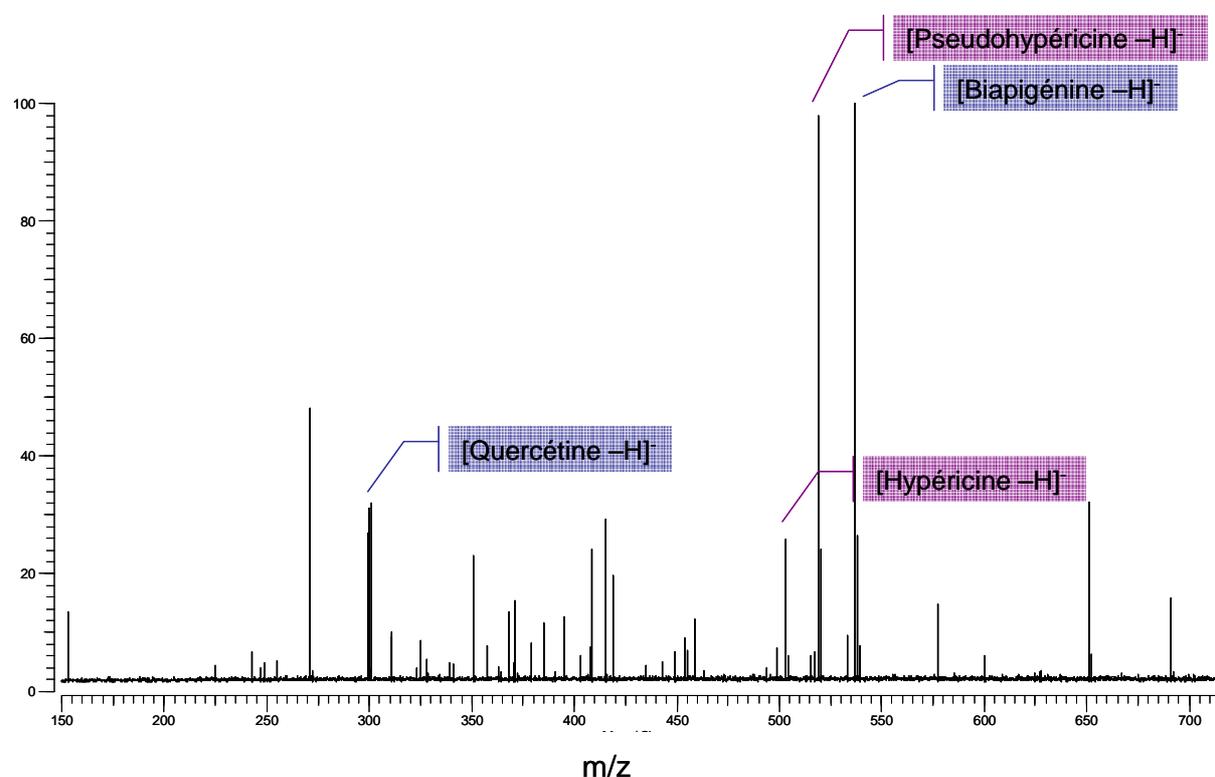


Figure IV. 14 : Spectre LDI-FTICRMS en mode de détection **négatif** pour $10\mu\text{L}$ d'extrait déposés

Le rapport signal/bruit calculé est faible et le nombre de composé détectés moins important qu'en LDI-TOFMS. La mauvaise détection des hypéricines peut s'expliquer par un coefficient d'extinction molaire environ deux fois plus faible à 355 nm qu'à 337 nm (spectre d'absorption, Chapitre III).

Quant à l'hyperforine, dont le spectre d'absorption est présenté sur la Figure IV. 15, son coefficient d'extinction molaire nul à 355 nm peut expliquer son absence sur le spectre. A

l'inverse, l'amentoflavone est bien détectée car son coefficient d'extinction molaire est identique à 337 et 355 nm⁴³.

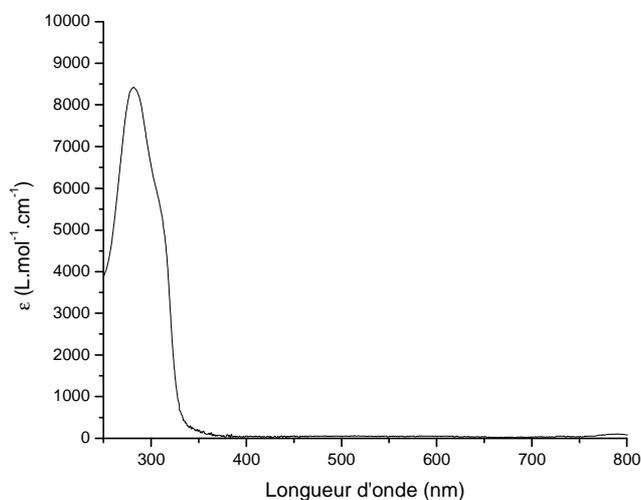


Figure IV. 15 : Spectre d'absorption UV-Visible enregistré pour l'hyperforine dans le méthanol

Ainsi, même si la précision en masse est meilleure, la technique LDI-FTICRMS en mode négatif à 355 nm s'est avérée peu intéressante dans le cadre de l'étude des extraits de Millepertuis.

II. C. 2. Mode positif

Pour les analyses MALDI-FTICRMS, nous avons utilisé la 2,5-DHB à 1M ; les spectres réalisés avec la matrice à 10⁻¹M, soit la même concentration que pour les analyses MALDI-TOF, se sont révélés moins riches.

II. C. 2. i. Spectre obtenu pour l'extrait méthanolique de Millepertuis

La Figure IV. 16 présente le spectre obtenu en accumulant les ions issus de 20 impacts laser à une puissance correspondant à 20% de la valeur maximale. Ce spectre est largement dominé par un pic à la masse 539, et se trouve être très différent de celui obtenu en MALDI-TOF.

⁴³ Uddin, Q., et al., *Toxicology in Vitro*, 2004, **18**, 4, p 435

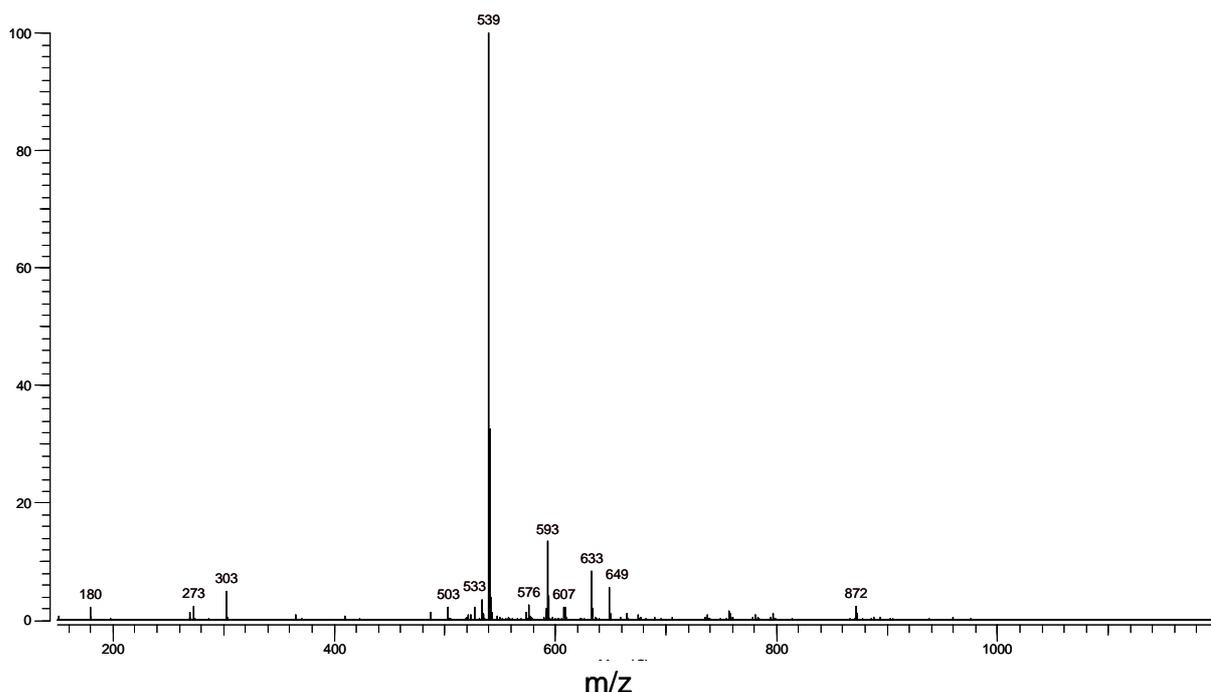


Figure IV. 16 : Spectre MALDI-FTICRMS obtenu en mode de détection **positif** pour l'extrait méthanolique de fleurs de Millepertuis

L'analyse de la 2,5-DHB seule n'a pas révélé de pic à 539 ; il semble donc bien être dû à notre extrait. La calibration, réalisée sur des ions déjà identifiés précédemment sur les spectres MALDI-TOFMS (m/z 273, 303, 503, 633, 649 et 871), nous donne une masse exacte de 539,09291, qui pourrait correspondre à la biapigénine, mais avec une erreur non négligeable de 8 ppm ; le spectre étant calibré en interne sur des pics d'intensité faible par rapport à celui à 539, cette erreur importante pourrait être due à la faiblesse de la gamme dynamique en FTICRMS. Afin de confirmer cette attribution, une fragmentation SORI-CID a été réalisée sur cet ion.

II. C. 2. ii. Caractérisation de l'espèce détectée à m/z 539

Le spectre correspondant à la fragmentation en mode SORI-CID pour l'espèce détectée à m/z 539 est présenté sur la Figure IV. 17. La bibliographie référence relativement peu d'ions fragments pour ce composé⁴⁴ ; à l'inverse notre spectre est plutôt riche, nous avons donc entrepris d'attribuer les fragments les plus notables, afin d'identifier sans équivoque le pic m/z 539. Un mécanisme de fragmentation à partir de l'ion pseudomoléculaire des

⁴⁴ Sánchez-Rabaneda, F., *et al.*, *Journal of Mass Spectrometry*, 2003, **38**, 1, p 35

biapigénines est présenté sur la Figure IV. 18 ; sur cette figure sont rappelées les structures des deux isomères de biapigénine susceptibles d'être détectés dans les extraits de Millepertuis, à savoir la I3-II8 biapigénine (notée ici biapigénine) et la I3'-II8 biapigénine (amentoflavone), d'après la nomenclature qui a été présentée dans la Chapitre II.

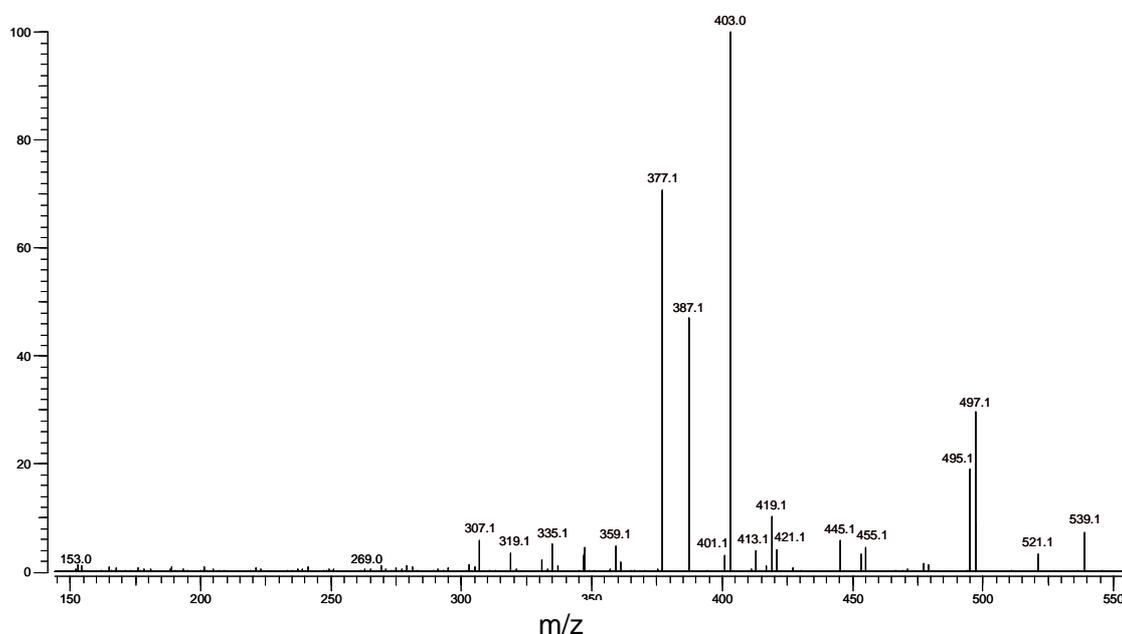


Figure IV. 17 : Spectre de fragmentation obtenu en mode SORI-CID pour le pic $m/z = 539$

Le mécanisme de fragmentation proposé pour l'amentoflavone et la biapigénine fait essentiellement intervenir des pertes de neutres ($\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$, CO_2 , CO , $\text{CH}\equiv\text{CH}$ et H_2O), qui ont déjà été décrites pour ces composés et dont les mécanismes ont été précisés tout récemment grâce à des expériences de deutération⁴⁵. Ces pertes de neutres sont associées à des coupures de type Rétro Diels Alder (RDA), couramment observées pour les flavones, et déjà décrites dans le début de ce chapitre. La numérotation présentée sur la molécule d'amentoflavone correspond à celle utilisée pour nommer ces coupures de type RDA. Les fragmentations qui viennent d'être mentionnées nous ont permis de proposer des structures pour la majorité des ions détectés en MS^2 , renforçant ainsi l'hypothèse de la présence de biflavone uniquement à $m/z 539$. Les fragments observés ne permettent pas de déterminer lequel des deux composés est majoritaire, la plupart des étapes de fragmentation pouvant s'appliquer aux deux dérivés. Bien que la RMN reste la technique de référence pour la différenciation de ce type d'isomères, l'analyse des deux standards pourra par la suite

⁴⁵ McNab, H., *et al.*, *International Journal of Mass Spectrometry*, 2008, **doi: 10.1016/j.ijms.2008.05.039**

s'avérer intéressant afin de déterminer s'il est possible d'observer des différences entre les spectres de fragmentation de ces deux composés.

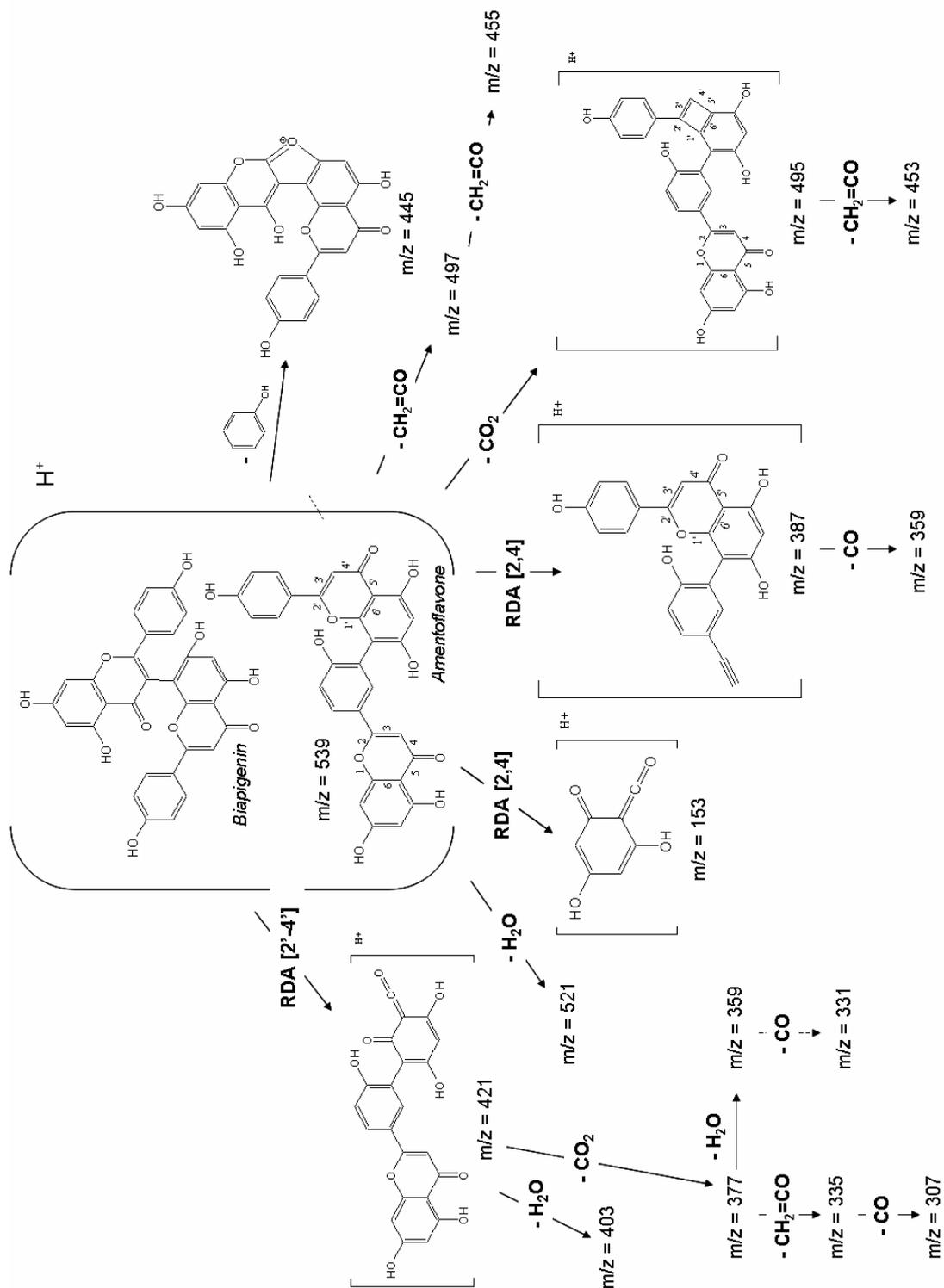


Figure IV. 18 : Schéma de fragmentation proposé pour le pic $m/z = 539$ (les fragmentations sont présentées sur la molécule d'amentoflavone, sauf dans le cas de perte de phénol)

II. C. 2. iii. Identification des autres espèces présentes sur le spectre
MALDI-FTICRMS

Si le pic observé très majoritairement à m/z 539 sur notre spectre appartient bien à l'extrait de Millepertuis, il n'en demeure pas moins gênant pour la mesure précise de la masse des autres composés détectés et générant des ions d'intensité plus faible. Il est généralement constaté que la présence d'un ion très majoritaire dans la cellule d'analyse FTICR peut modifier le mouvement des autres ions. Cet effet, connu sous le nom d' « effet de charge », peut engendrer une incertitude plus grande sur la masse mesurée pour les ions minoritaires⁴⁶. Cependant nous avons tout de même pu obtenir une erreur moyenne de 1 ppm. Le spectre de masse est présenté en deux parties : la première correspond à la partie du spectre située avant le pic majoritaire (Figure IV. 19) et la seconde aux hautes masses (Figure IV. 20). Il est à noter que le spectre obtenu présente beaucoup moins d'agrégats de 2,5-DHB que le spectre obtenu en MALDI-TOF, ce qui facilite l'identification des signaux dus aux molécules de l'extrait.

⁴⁶ Beauchamp, J. L., Armstrong, J. T., *Review of Scientific Instruments*, 1969, **40**, 1, p 123

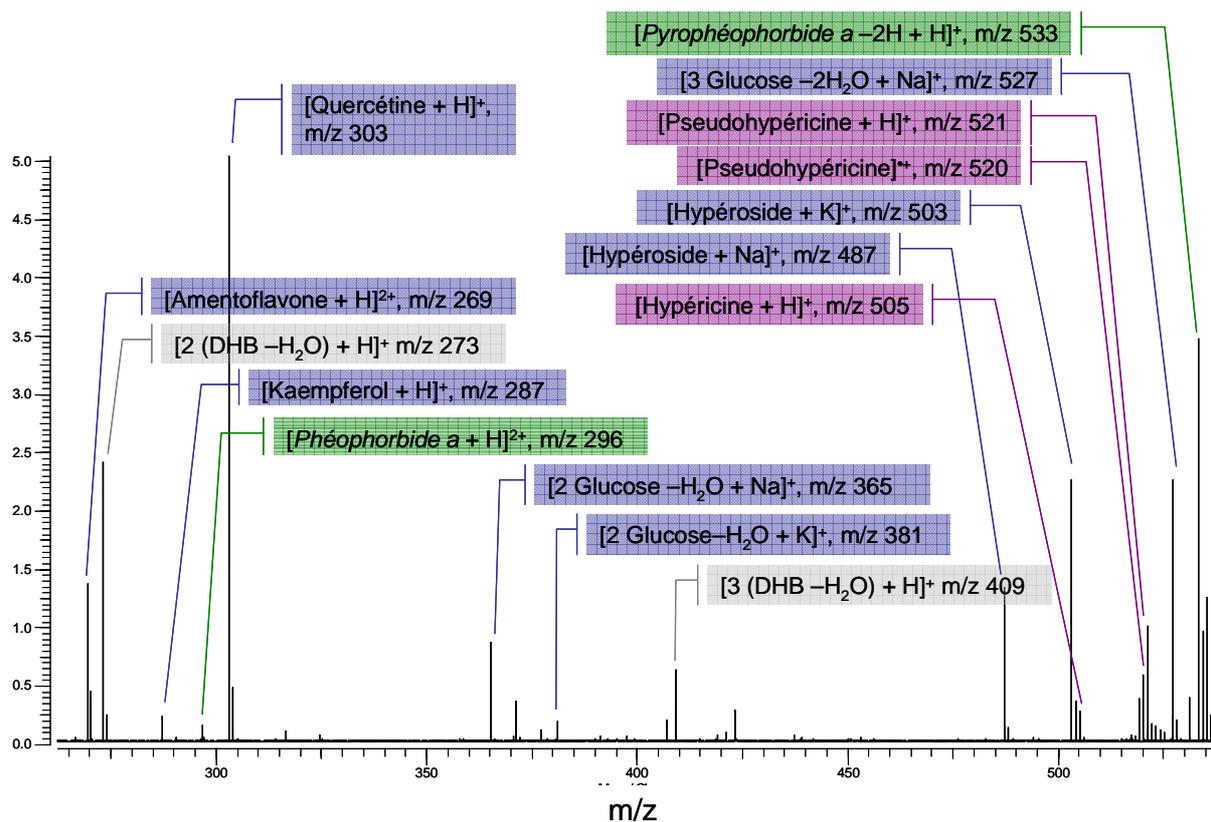


Figure IV. 19 : Spectre MALDI-FTICRMS obtenu en mode de détection **positif** pour l'extrait méthanolique de Millepertuis ($m/z < 539$, matrice 2,5 DHB à 1M, $\lambda = 355$ nm)

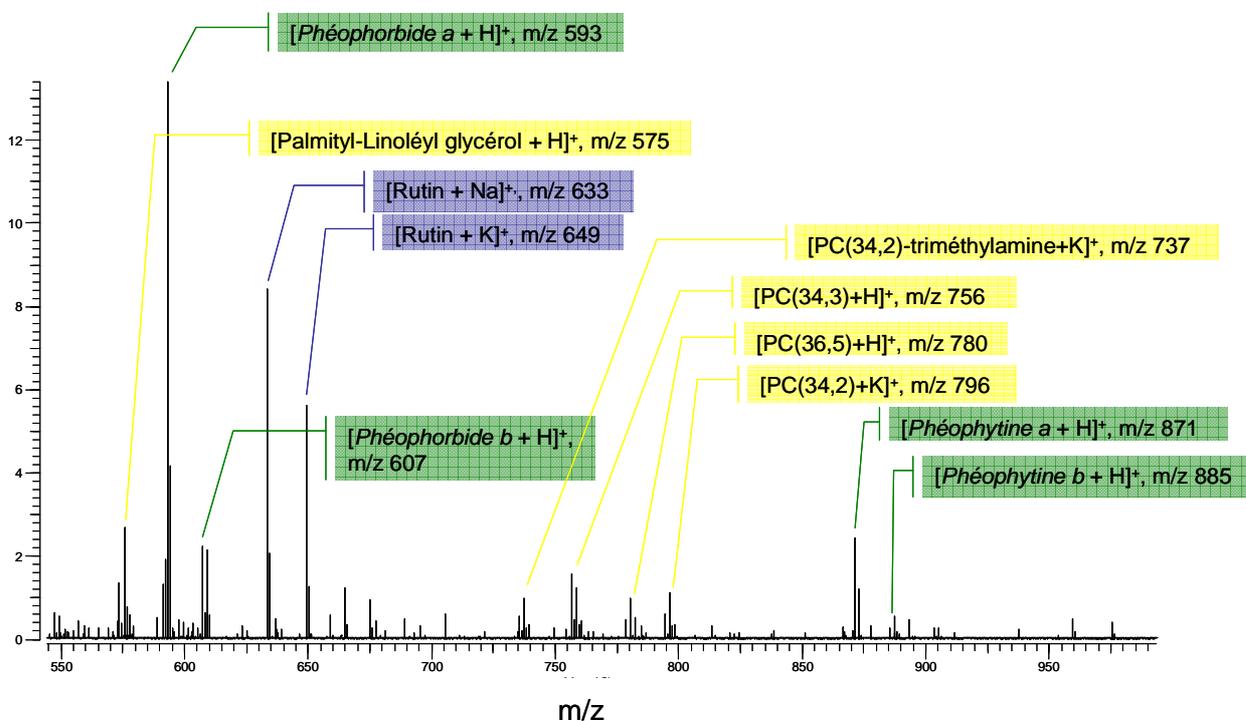


Figure IV. 20 : Spectre MALDI-FTICRMS obtenu en mode de détection **positif** pour l'extrait méthanolique de Millepertuis ($m/z > 539$, matrice 2,5 DHB à 1M, $\lambda = 355$ nm)

Ion détecté	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
[Kaempférol+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	287.05501	287.05518	0.6	824300
[Quercétine+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁺	303.04993	303.04971	0.7	785000
[2Glucose-H ₂ O+Na] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ Na ⁺	365.10543	365.10549	0.2	665100
[2Glucose-H ₂ O+K] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ K ⁺	381.07937	381.07977	1	644000
[Hypéroside +Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ Na ⁺	487.08470	487.0848	0.2	503200
[Hypéroside+K] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ K ⁺	503.05863	503.05871	0.2	486600
[Hypéricine+H] ⁺	C ₃₀ H ₁₇ O ₈ ⁺	505.09179	505.09238	1.2	501100
[Pseudohypéricine] ⁺⁺	C ₃₀ H ₁₆ O ₉ ⁺	520.07888	520.07924	0.7	463800
[Pseudohypéricine+H] ⁺	C ₃₀ H ₁₇ O ₉ ⁺	521.08671	521.0869	0.4	471000
[3Glucose-2H ₂ O+Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ Na ⁺	527.15826	527.15811	0.3	454200
[Pyrophéophorbide a-2H +H] ⁺	C ₃₃ H ₃₃ N ₄ O ₃ ⁺	533.25472	533.25436	0.7	457900
[Fragment PC(34,2)+H] ⁺	C ₃₇ H ₆₇ O ₄ ⁺	575.50339	575.50316	0.4	421200
[Phéophorbide a+H] ⁺	C ₃₅ H ₃₇ N ₄ O ₅ ⁺	593.27585	593.27547	0.6	419600
[Phéophorbide b+H] ⁺	C ₃₅ H ₃₅ N ₄ O ₆ ⁺	607.25511	607.25513	0	396800
[Rutine+Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ Na ⁺	633.14261	633.14094	2.6	388900
[Rutine+K] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ K ⁺	649.11654	649.11577	1.2	383300
[PC(34,2)-triméthylamine+K] ⁺	C ₃₉ H ₇₁ O ₈ PK ⁺	737.45181	737.45314	1.8	321400
[PC(34,3)+H] ⁺	C ₄₂ H ₇₉ NO ₈ P ⁺	756.55378	756.55462	1.1	319200
[PC(36,5)+H] ⁺	C ₄₄ H ₇₉ NO ₈ P ⁺	780.55378	780.55410	0.4	316400
[PC(34,2)+K] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ PK ⁺	796.52531	796.52651	1.5	301800
[Phéophytine a+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₅ ⁺	871.57320	871.57336	0.2	273400
[Phéophytine b+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₃ N ₄ O ₆ ⁺	885.55246	885.55541	3.3	279600

Tableau IV. 3 : Données expérimentales et théoriques pour les ions détectés en mode de détection positif en MALDI-FTICRMS sur l'extrait de Millepertuis

Si la majorité des signaux observés est identique à ceux observés en MALDI-TOF, le spectre ProMALDI-FTICRMS est plus riche, avec notamment la détection des hypéricines sous la forme d'ions M⁺⁺ et [M+H]⁺. La très haute résolution permet de confirmer les attributions faites précédemment concernant les ions phospholipidiques ; on constate également que dans ces conditions ces composés se fragmentent avec la perte d'un groupement triméthylamine puis l'obtention du glycérol correspondant. L'identification des dérivés chlorophyllés se confirme également, avec la détection supplémentaire du *pyrophéophorbide a*. En ce qui concerne les polyphénols, seuls les flavonoïdes majoritaires, quercétine, hypéroside et rutin, sont détectés.

II. D. Analyse du matériel végétal *in situ*

II. D. 1. L'Imagerie par Spectrométrie de Masse (IMS)

Le profilage de tissus intacts est une technique émergente qui permet la détermination de la distribution spatiale de composés et leur taux d'expression relatif, sans avoir besoin de recourir à l'utilisation de composés exogènes, tels que les réactifs basés sur les anticorps, ni à des techniques de marquage par fluorescence ou radioactivité. L'Imagerie par Spectrométrie de Masse (ISM) est une technique destructrice. Cependant dans bien des cas, le nombre de molécules affectées par l'analyse est faible, et l'échantillon peut être réutilisé. En ce qui concerne le transfert des ions en phase gazeuse, trois méthodes peuvent être utilisées en ISM : l'irradiation par un laser ou par un faisceau d'électrons de haute énergie, ou l'ionisation par électronébulisation. Les deux premières sont des méthodes bien établies qui ont été largement utilisées, tandis que l'imagerie par l'électronébulisation émerge depuis seulement quelques années.

Les premiers travaux de profilage par MALDI-TOFMS ont été réalisés en 1997 par Caprioli et al.⁴⁷, qui ont analysé dans la gamme de masse 2-30 kDa plusieurs peptides et protéines présents sur des coupes tissulaires murines issues de différents organes. La technique de l'ISM par MALDI a ensuite permis de réaliser des avancées importantes avec notamment la découverte de protéines surexprimées dans les tissus de cancer humain de la prostate par rapport aux cellules saines⁴⁸. L'IMS a également été utilisée pour la détection de petites molécules au sein de tissus, par exemple dans le cas du paclitaxel⁴⁹, dont la distribution spatiale a été étudiée sur des coupes de foie de rat et de xénogreffes de cancer ovarien humain (spectromètre de masse hybride quadripôle/temps de vol). Dans le cas de la réalisation d'expérience d'IMS via la technique d'ionisation MALDI, une attention toute particulière doit être portée à la conservation des molécules cible lors de l'analyse, et au maintien de leur organisation spatiale. La résolution de l'image obtenue est alors la conséquence de la taille des cristaux de matrice, et du diamètre de l'impact laser.

La deuxième technique couramment utilisée pour l'IMS est le SIMS (Spectrométrie de Masse des Ions Secondaires). Les pionniers dans ce domaine ont été Castaing et Slodzian, au

⁴⁷ Caprioli, R. M., et al., *Analytical Chemistry*, 1997, **69**, 23, p 4751

⁴⁸ Zheng, Y., et al., *Cancer*, 2003, **98**, 12, p 2576

⁴⁹ Troendle, F. J., et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 1999, **10**, 12, p 1315

début des années 60⁵⁰. La technique SIMS utilise un faisceau d'ions primaires de type monoatomique (Ar^+ , Xe^+ , Cs^+ , Au^+ , Ga^+), polyatomique (O_2^+ , He_3^+ , SF_6^+ , CO_2^+ , C_2F_6^+) ou cluster (clusters d'ion Au ou C_{60}^+) qui vont être accélérés et focalisés par un champ électrique pour former un faisceau d'ions continus qui est typiquement pulsé pour réaliser l'ionisation. L'impact de ce faisceau d'ions avec la surface analysée engendre des collisions binaires avec les atomes ou molécules de l'échantillon, dont certains sont éjectés de sa surface pour se retrouver en phase gazeuse sous forme d'ions ou de neutres. Le principal avantage du SIMS pour l'imagerie repose sur sa résolution latérale de l'ordre de 50 nm⁵¹, alors que la résolution spatiale maximale atteinte en MALDI-LDI-IMS est de l'ordre de quelques dixièmes de micromètres⁵². Cependant, bien que cette technique soit adaptée à l'étude de molécules de petite taille, son utilisation pour la cartographie de biopolymères reste un défi.

La technique d'imagerie la plus récemment mise au point concerne l'utilisation d'une source d'ionisation par électrobulbation. La première analyse DESI (Desorption Electrospray Ionization) en deux dimensions a été réalisée en 2004 par Ford et al.⁵³ sur des plaques de C_{18} communément utilisées pour la Chromatographie en Phase Gazeuse, sur lesquelles ils ont étudié la distribution spatiale d'une part d'un mélange de colorants, et d'autre part de composés issus d'un extrait de *Ilex vomitoria* (arbuste à baies d'Amérique du Nord). L'un des principaux avantages de cette technique réside dans le fait que l'ionisation de l'échantillon s'effectue à pression atmosphérique, contrairement aux techniques précédemment décrites qui nécessitent l'introduction de l'échantillon dans une zone maintenue à un vide poussé. De plus, cette technique ne nécessite pas l'utilisation d'une matrice.

Les trois techniques d'imagerie par spectrométrie de masse qui viennent d'être décrites ont été longtemps utilisées en réalisant des déplacements successifs dans deux directions sur l'échantillon. Cependant les dernières années ont également vu l'émergence de l'imagerie par spectrométrie de masse en mode microscope, technique par laquelle l'image « chimique » est obtenue de la même façon qu'une image « optique ». Les ions générés par l'ionisation de l'échantillon sont séparés par un élément optique qui préserve leur position relative⁵⁴. Dans ce cas, une acquisition correspond à la détection d'ions correspondant à une valeur de m/z.

⁵⁰ Castaing, R., Slodzian, G., *Microscopie*, 1962, **1**, p 395

⁵¹ Guerquin-Kern, J. L., et al., *BioMedical Engineering OnLine*, 2004, **3**, 1, p 10

⁵² Spengler, B., Hubert, M., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2002, **13**, 6, p 735

⁵³ Ford, M. J., Van Berkel, G. J., *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2004, **18**, 12, p 1303

⁵⁴ Luxembourg, S. L., et al., *Analytical Chemistry*, 2004, **76**, 18, p 5339

II. D. 2. IMS sur les échantillons végétaux

Les échantillons végétaux font plus rarement l'objet d'expériences d'IMS que les échantillons de tissus animaux et humains : les principales applications de l'analyse directe par spectrométrie de masse dans le domaine végétal sont résumées dans le Tableau IV. 2.

Le nombre important de métabolites secondaires susceptibles d'être produits par une espèce végétale rend difficile les expériences de métabolomique (science qui étudie l'ensemble des métabolites présents dans une cellule, un organe ou un organisme) *in situ*. Pour cette raison la plupart des expériences de spectrométrie de masse de ce type sont ciblées sur une ou plusieurs catégories de métabolites.

Echantillons	Technique d'imagerie	Composés étudiés	Référence
<i>Radix Aconiti, Coptis chinensis, Corydalis yanhusuo</i> W.T.Wang (herbes médicinales chinoises)	(MA)LDI-TOFMS	Profils alcaloïdiques	⁵⁵
<i>Sinomenium acutum</i>	MALDI-MS	Profils alcaloïdiques + MS ²	⁵⁶
Tiges de blé	MALDI-MS	Oligosaccharides	⁵⁷
Maïs, <i>Arabidopsis Thaliana</i>	LDI-TOFMS	Cires cuticulaires	⁵⁸
<i>Conium maculatum, Datura stramonium, Atropa belladonna</i>	DESI	Alcaloïdes	⁵⁹
<i>Lycopersicum esculentum</i> Mill	SIMS	Chrome	⁶⁰
Pomme, fraise (chair, peau)	GALDI-MS	Acides gras, flavonoïdes, sucres	⁶¹

Tableau IV. 4 : Utilisation de la Spectrométrie de Masse pour l'analyse directe d'échantillons végétaux

La fleur de Millepertuis, et plus particulièrement ses métabolites secondaires de la famille des naphthodianthrones, n'avaient jusqu'alors jamais fait l'objet de ce type d'étude. Pourtant la présence ou non d'hypéricines a une valeur taxonomique importante pour la classification interne des différentes espèces d'*Hypericum*, notamment car il semble que ces métabolites,

⁵⁵ Wu, W., et al., *Journal of Mass Spectrometry*, 2007, **42**, 1, p 58

⁵⁶ Ng, K. M., et al., *Analytical Chemistry*, 2007, **79**, 7, p 2745

⁵⁷ Robinson, S., et al., *New Phytologist*, 2007, **173**, 2, p 438

⁵⁸ Sluszny, C., et al., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2005, **16**, 1, p 107

⁵⁹ Talaty, N., et al., *Analyst*, 2005, **130**, p 1624

⁶⁰ Mangabeira, P. A., et al., *Applied Surface Science*, 2006, **252**, 10, p 3488

⁶¹ Zhang, H., et al., *Analytical Chemistry*, 2007, **79**, 17, p 6575

absents des espèces les plus primitives d'*Hypericum*, soient spécifiques à des espèces phylogénétiquement plus avancées⁶². Ainsi, la présence ou non d'hypéricine a par exemple longtemps été discutée pour l'espèce *Hypericum elodes*. En 1963, Mathis et Ourisson ont mis au point une méthode permettant d'obtenir, après réalisation d'une empreinte de l'échantillon végétal sur du papier chromatographique, la localisation de l'hypéricine⁶³. Par cette méthode ils n'ont pas détecté d'hypéricine dans *Hypericum elodes*, en raison probablement du manque de sensibilité de la technique utilisée. Ce n'est qu'en 2001 que la présence d'hypéricine au sein de cette espèce a été démontrée par Koch⁶⁴, puis confirmée en 2004 par Piovan et al.⁶⁵ qui ont utilisé l'ionisation par électronébulisation couplée à la spectrométrie de masse (trappe ionique). Ils ont également précisé la localisation de ces composés au sein de la plante ; cependant, dans cette étude l'échantillonnage a posé problème puisque le microéchantillonnage direct des glandes, que ce soit celles situées au bord des pétales ou en leur milieu n'était pas possible. Un protocole alternatif a donc été mis au point, qui consistait à découper dans un premier temps les zones contenant les glandes à analyser, puis à inciser l'échantillon avec une lame de rasoir sous microscope afin de récupérer les glandes et de pouvoir les extraire. Cependant ce type de protocole est long à réaliser et doit faire l'objet d'attentions toutes particulières afin d'éviter la contamination des échantillons entre eux.

II. D. 3. Analyses *in situ* et IMS sur les pétales de fleurs de Millepertuis

Compte-tenu des résultats obtenus lors de l'analyse LDI-TOFMS des extraits de Millepertuis en mode négatif, qui ont montré une détection possible des hypéricines sans que cela ne nécessite l'ajout d'une matrice chimique, nous avons décidé d'évaluer le potentiel offert par cette technique pour l'analyse directe d'échantillons de fleurs de Millepertuis. Ces expériences s'inscrivent dans une volonté de compréhension et de sélection des propriétés du matériel végétal utilisé dans cette étude ; en effet la fleur de Millepertuis présente différents types de glandes à sa surface, qui ne contiennent pas toutes les pigments phototoxiques de la famille des hypéricines, nous avons donc souhaité faire la distinction entre ces organes, afin d'être capables de détecter d'éventuelles disparités importantes entre les divers échantillons mis à notre disposition.

⁶² Kitanov, G. M., *Biochemical Systematics and Ecology*, 2001, **29**, 2, p 171

⁶³ Mathis, C., Ourisson, G., *Phytochemistry*, 1963, **2**, 2, p 157

⁶⁴ Koch, W., *Farmatsevtichnii Zhurnal (Kiev)*, 2001, **4**, p 50

⁶⁵ Piovan, A., et al., *Phytochemistry*, 2004, **65**, 4, p 411

Chapitre IV : Caractérisation par LDI-MS des extraits de Millepertuis

Nos expériences ont été réalisées par Spectrométrie de Masse à Temps de vol, couplée à la Désorption-Ionisation Laser. Le laser utilisé est un laser Nd-YAG quadruplé en fréquence, de longueur d'onde 266 nm, de diamètre d'impact sur l'échantillon de l'ordre de 10 μm . Les déplacements successifs réalisés sur l'échantillon dans les deux directions de l'espace étaient de l'ordre de 20 μm .

Le laser à 337 nm, qui permettait l'analyse en solution de l'hypericine avec un rapport signal/bruit légèrement supérieur (cf Tableau IV. 1), n'a pas été utilisé pour l'IMS en raison d'une part d'un diamètre d'impact plus élevé, d'autre part d'un faisceau de forme elliptique ne permettant pas une couverture aisée de la quasi-totalité de notre échantillon. Les pétales de fleurs de Millepertuis étudiés ont été placés avec précautions sur le support MALDI et fixés avec de l'adhésif en aluminium. L'introduction de l'échantillon dans le spectromètre a rapidement conduit à une stabilisation de la pression à une valeur permettant de réaliser les analyses ($2 \cdot 10^{-6}$ mbar), ce qui montre que le passage des fleurs de Millepertuis à l'étuve (réalisé à l'INRA) est suffisant pour permettre l'analyse par LDI-TOFMS sans qu'aucun autre traitement de l'échantillon ne soit nécessaire.

La source lumineuse présente dans la chambre d'ionisation de notre appareil n'a été allumée que brièvement afin de placer le faisceau laser au point de départ de la cartographie, afin d'éviter toute dégradation des pigments photosensibles. La répartition spatiale en intensité des pics correspondant respectivement à m/z 503 et 519 au niveau d'une glande présente à la surface d'un pétale est présentée sur la Figure IV. 21. Les « images » obtenues sont cohérentes et il semble qu'il y ait une certaine homogénéité des intensités absolues enregistrées pour ces deux pics de masse.

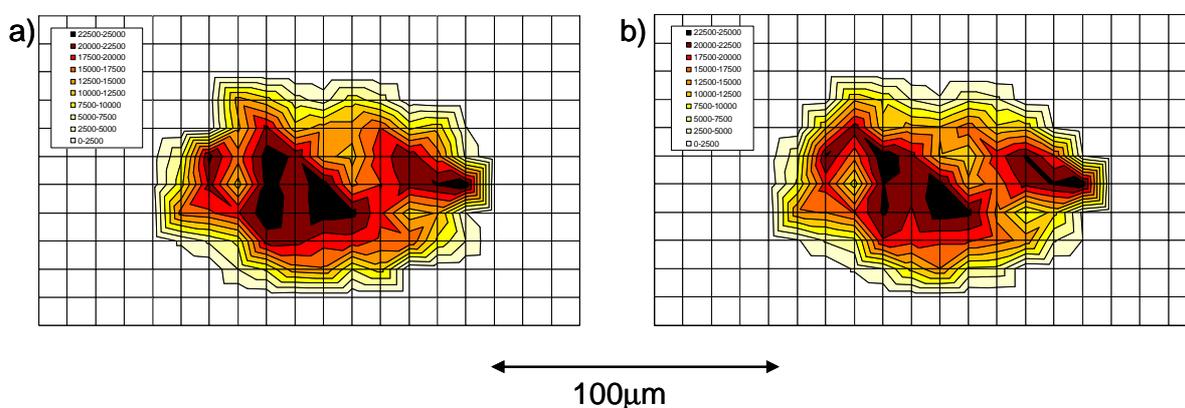


Figure IV. 21 : Répartition spatiale en intensité absolue des pics à m/z 503 (a) et 519 (b) sur une surface du pétale contenant une glande

Cependant, l'examen d'un spectre de masse typiquement obtenu sur une glande à hypéricines, présenté sur la Figure IV. 22, révèle la présence de pics de masse à m/z 487 et 517, dont les masses exactes nous orientent vers des formules brutes proches de celles des pics à 503 et 519.

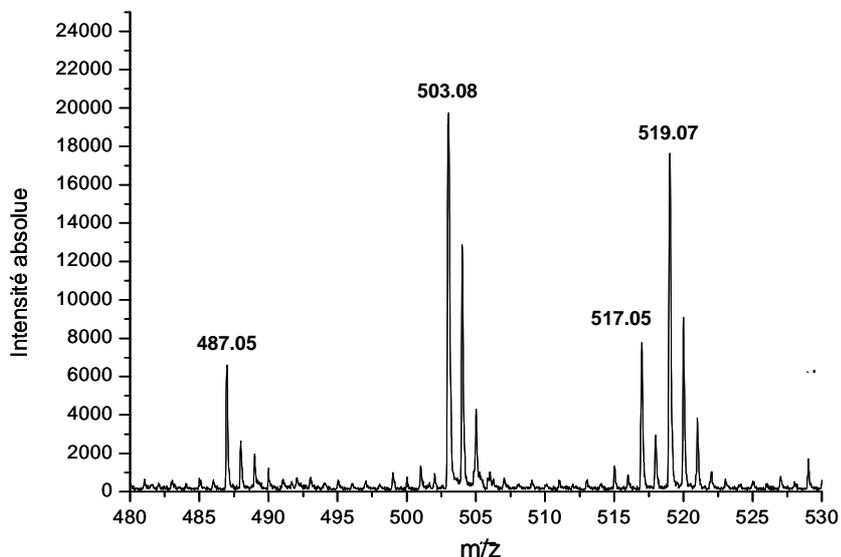


Figure IV. 22 : Spectre de masse obtenu en LDI-TOFMS (mode de détection **néгатif**) sur une glande à hypéricines ($\lambda = 266$ nm)

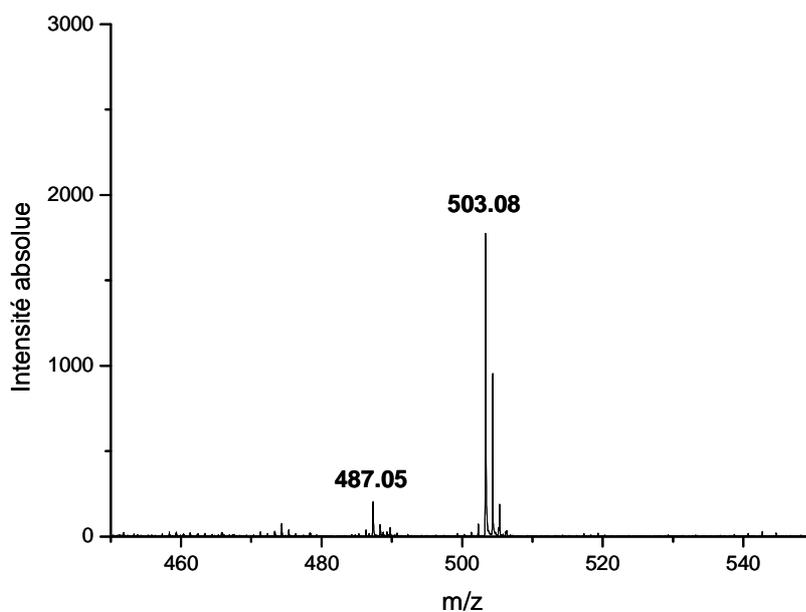


Figure IV. 23 : Spectre LDI-TOFMS obtenu à 65% d'atténuation laser en mode de détection **néгатif** sur une solution méthanolique d'hypericine (10^{-5} M)

Nous avons donc cherché à savoir si ces deux pics, que nous n'avions jamais observés lors des analyses effectuées en LDI-TOFMS sur les solutions standard et d'extraits, étaient liés aux pics correspondant à l'hypéricine et à la pseudohypéricine. Compte-tenu de l'énergie laser plus importante nécessitée par l'analyse directe du matériel végétal, nous avons donc analysé dans des conditions d'irradiation laser similaires, des solutions méthanoliques d'hypéricine et de pseudohypéricine (10^{-5} M). La Figure IV. 23 indique que l'analyse par LDI-TOFMS de l'hypéricine pure en solution dans ces conditions conduit à la détection du pic pseudomoléculaire à m/z 503 et d'un fragment correspondant à $[\text{Hypéricine-CH}_4\text{-H}]^-$ à m/z 487.

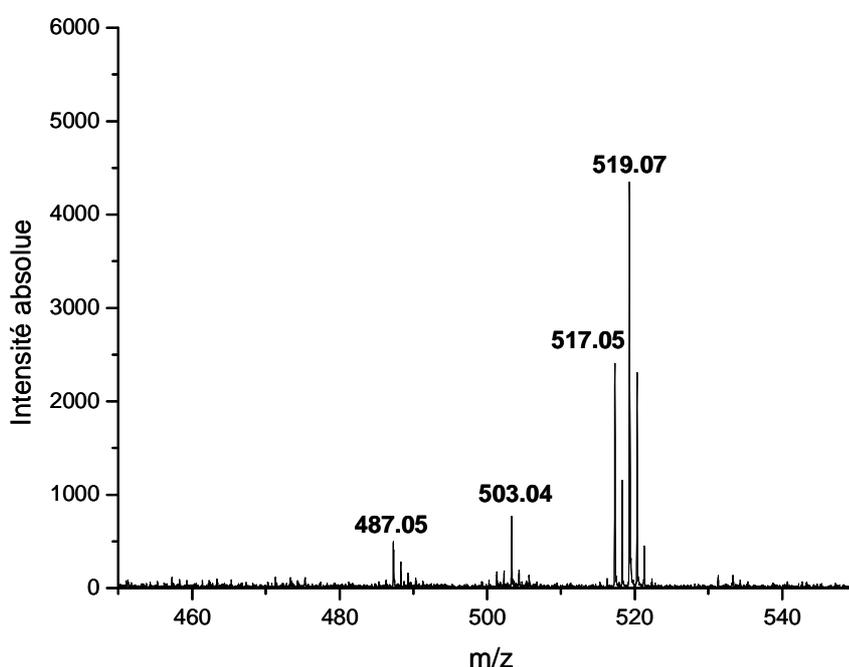


Figure IV. 24 : Spectre LDI-TOFMS obtenu à 65% d'atténuation laser en mode de détection **néгатif** sur une solution méthanolique de pseudohypéricine (10^{-5} M)

La Figure IV. 24, qui correspond à l'analyse de la pseudohypéricine pure en solution révèle la présence en plus de l'ion pseudomoléculaire à m/z 519, d'ions à m/z 517, 503 et 487, correspondant respectivement à $[\text{Pseudohypéricine-2H-H}]^-$, $[\text{Pseudohypéricine-CH}_4\text{-H}]^-$ et $[\text{Pseudohypéricine-CH}_3\text{OH-H}]^-$; ces fragmentations seront décrites plus en détail dans la partie du Chapitre V qui leur sera consacrée.

De plus, nous avons pu constater que le rapport d'intensités entre les pics pseudomoléculaires des pigments et leur contribution isotopique en $M+1$ ne correspond pas aux simulations effectuées pour chacun de ces massifs. Cette différence peut trouver deux origines :

- soit une saturation en ce qui concerne l'intensité du pic pseudomoléculaire,
- soit la détection simultanée des ions $[M-H]^-$ et M^+ pour ces deux composés.

Compte-tenu de la forte irradiance nécessaire pour détecter l'hypéricine et la pseudohypéricine *in situ* au niveau du matériel végétal, il se produit probablement une saturation du signal obtenu pour les ions $[M-H]^-$.

L'utilisation de la LDI-TOFMS pour la détection *in situ* de l'hypéricine et de la pseudohypéricine s'est avérée intéressante puisqu'elle ne nécessite aucune préparation de l'échantillon, en dehors du séchage à l'étuve, et qu'elle permet de détecter ces composés directement sur la plante avec un rapport signal/bruit correct (jusqu'à 100 pour le pic à m/z 503). Cependant, les irradiances nécessaires sont plus élevées que lors de l'analyse des solutions, ce qui conduit à une fragmentation des composés étudiés. Dès lors, la détermination du taux d'expression relatif de ces deux composés dans une zone de la plante s'avère difficile, notamment en raison des pics de masse à m/z 503 et 487, qui peuvent provenir à la fois de l'hypéricine et de la pseudohypéricine. De plus, le fait que les intensités relatives des différents pics des massifs isotopiques considérés ne correspondent pas aux simulations effectuées pour les ions $[M-H]^-$ restreint les applications concernant la détection de la protohypéricine et de la protopseudohypéricine ; en effet, par exemple dans le cas de la protohypéricine qui donne un ion $[M-H]^-$ à m/z 505, il serait nécessaire de déterminer la contribution isotopique en $M+2$ (505) du signal de l'hypéricine.

La technique LDI-TOFMS est donc utile pour la détection *in situ* de l'hypéricine et de la pseudohypéricine, composés dont la présence est souvent considérée comme un gage de qualité des fleurs de Millepertuis. Dans les conditions dans lesquelles nous avons effectué nos expériences (laser à 266 nm), cette technique nous a permis de faire la distinction entre deux types de glandes présentes à la surface des pétales (Figure IV. 25). La cartographie semi-quantitative de ces pigments par LDI à 266 nm peut être réalisée de façon globale, sans faire la distinction entre les deux molécules. Quant à la détermination de la répartition spatiale des protopigments associés, elle nécessite la mise au point d'un protocole plus spécifique, avec éventuellement l'utilisation d'un laser de plus faible énergie, afin de minimiser les phénomènes de fragmentation et de saturation des signaux observés.

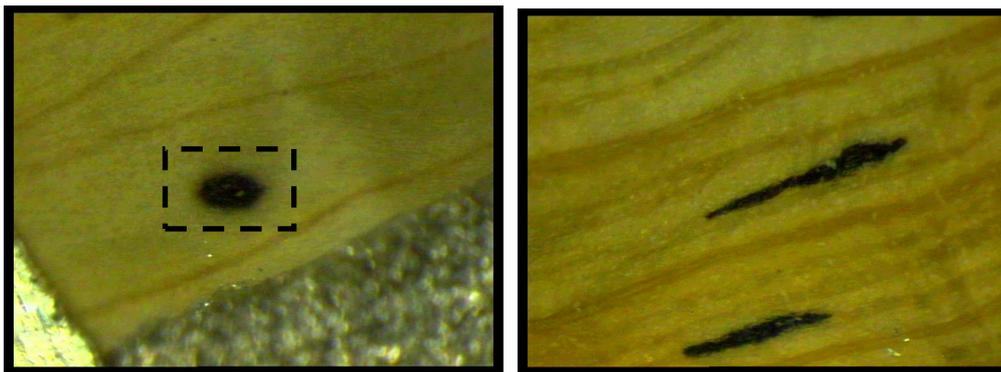


Figure IV. 25 : A gauche, l'échantillon de pétale de Millepertuis analysé par IMS (rectangle en pointillés = zone étudiée), à droite, des taches ne conduisant pas à la détection des hypéricines

Il est également à noter que nous n'avons pas détecté d'hyperforine dans la glande que nous avons étudiée. Ce résultat a été confirmé récemment par Soelberg et al.⁶⁶ qui ont montré, grâce à un isolement manuel des glandes réalisé sous microscope et à une analyse par HPLC-UV des extraits obtenus, que l'hyperforine se situait essentiellement dans les glandes transparentes du Millepertuis, et qu'elle était quasi absente des nodules noirs contenant les hypéricines.

Dans un but prospectif nous avons effectué l'acquisition in situ du spectre de masse obtenu sur une glande à hypéricines par Désorption-Ionisation Laser couplée à la Spectrométrie de Masse FTICR, appareil sur lequel nous disposons d'un laser à 355 nm, dans le but de voir si l'utilisation d'un laser moins énergétique pouvait conduire à une meilleure détection des ions pseudomoléculaires de l'hypéricine et de la pseudohypéricine.

Le spectre de masse présenté sur la Figure IV. 26 montre que la Désorption-Ionisation Laser à 355 nm permet la détection de l'hypéricine et de la pseudohypéricine. Nous avons pu constater également que la fragmentation de ces molécules était beaucoup moins marquée que lors des expériences de désorption à 266 nm ; il semble donc que la LDI à 355 nm puisse permettre de déterminer les répartitions spatiales respectives de l'hypéricine et de la pseudohypéricine, en tenant compte des contributions à m/z 487 et 503 pour l'hypéricine, et m/z 517 et 519 pour la pseudohypéricine. De plus, l'examen des massifs isotopiques agrandis sur la Figure IV. 26 révèle que les intensités relatives des contributions isotopiques en $M+1$ sont conformes aux données théoriques pour l'hypéricine et la pseudohypéricine, ce qui permet d'envisager la cartographie des protopigments donnant des signaux respectivement à m/z 505 et 521. Cependant il est à noter que le diamètre d'impact du laser à 355 nm ($>200 \mu\text{m}$) est plus élevé que celui du laser à 266 nm ($10 \mu\text{m}$).

⁶⁶ Soelberg, J., et al., *Annals of Botany*, 2007, **99**, 6, p 1097

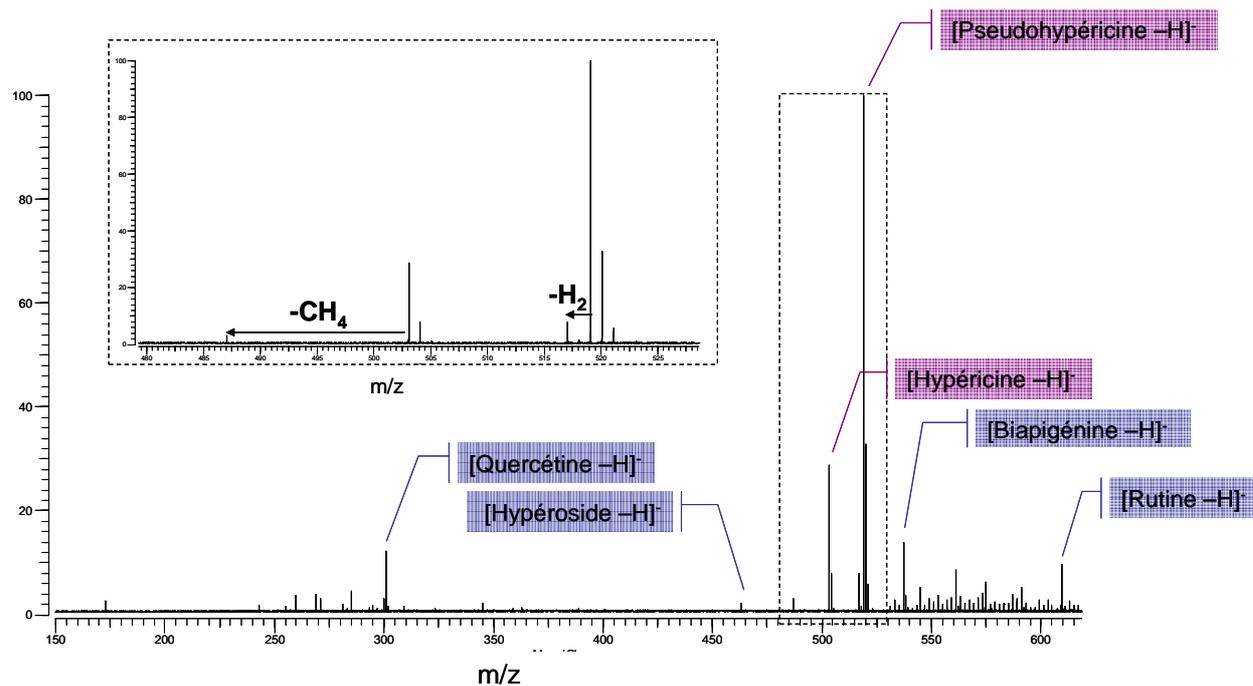


Figure IV. 26 : Spectre ProMALDI-FTICRMS obtenu en mode de détection **néгатif** par analyse directe d'une glande noire présente sur un pétale de fleur de Millepertuis

Conclusions du Chapitre :

Les expériences menées en désorption laser sur les échantillons de Millepertuis, extraits et pétales de fleurs, ont permis de mettre en avant le potentiel de cette technique d'ionisation qui n'avait encore jamais été employée pour ce type d'échantillons.

Dans le cadre de l'ionisation à 337 nm couplée à la Spectrométrie de Masse à Temps de Vol, le mode de détection négatif permet d'observer les composés de type naphthodianthrones (dérivés de l'hypéricine) et phloroglucinols (dérivés de l'hyperforine) avec un rapport signal/bruit satisfaisant, et, dans une moindre mesure, les flavonoïdes majoritaires, quercétine, hypéroside, biapigénine et rutine. L'utilisation de la matrice 2,5-DHB ($10^{-1}M$) en mode de détection positif, si elle nécessite dans un premier temps l'identification des agrégats de matrice, permet d'obtenir des signaux plus intenses pour les flavonoïdes, et de les détecter en plus grand nombre ; la forme sous laquelle s'ionisent les différents dérivés est cohérente avec les observations faites par d'autres équipes, avec une tendance à la formation d'adduits alcalins par les composés les plus glycosylés, et une protonation des dérivés non glycosylés. Le mode de détection positif permet également de mettre en évidence des dérivés de la chlorophylle, ainsi que des phospholipides ; dans le cadre de notre étude, la détection des premiers pourra s'avérer importante compte-tenu de leurs propriétés photochimiques, tandis que les seconds, bien que biologiquement peu actifs en tant que composés exogènes, peuvent jouer un rôle concernant la formulation des extraits.

L'ionisation à 355 nm couplée à la Spectrométrie de Masse FTICR s'est avérée peu intéressante en mode de détection négatif, probablement en raison d'une longueur d'onde plus défavorable à l'absorption d'énergie photonique par la plupart des composés que nous avons détectés en LDI-TOFMS à 337 nm. En revanche, en mode de détection positif, la matrice 2,5-DHB, utilisée pourtant à 1M, ne génère que très peu d'ions, dont les rapports m/z restent faibles. Le spectre de masse obtenu pour l'extrait méthanolique de Millepertuis est largement dominé par une espèce que les expériences de fragmentation SORI-CID ont permis d'attribuer à un mélange de biapigénines ; malgré la prédominance de cet ion, la précision en masse moyenne obtenue sur l'ensemble des signaux identifiés, de l'ordre de 1 ppm, est suffisante pour déterminer la formule brute des ions. Nous avons ainsi détecté les flavonoïdes majoritaires, des espèces constituées uniquement de sucres, les naphthodianthrones sous forme d'ion M^{*+} et $[M+H]^+$, et les dérivés de chlorophylle (phéophytines, phéophorbides et pyrophéophorbide) ; la précision en masse obtenue a

permis de confirmer les attributions faites en MALDI-TOF concernant les phospholipides ; des fragments de ces composés ont également été détectés.

Les analyses menées directement sur le matériel végétal en LDI-TOF à 266 nm ($h\nu = 4,66$ eV) ont mis en avant la difficulté de désorber les composés de leur support tout en gardant les molécules intactes ; dans le cas de l'hypéricine et de la pseudohypéricine, nous avons constaté une fragmentation importante qui compromet l'accès à des mesures semi-quantitatives. Les expériences menées en LDI-FTICRMS à la longueur d'onde moins énergétique de 355 nm ($h\nu = 3,5$ eV) ont permis une meilleure conservation des ions pseudomoléculaires, cependant compte-tenu de la différence de diamètre importante entre les deux lasers ($10\mu\text{m}$ à 266 nm et $>200\mu\text{m}$ à 355 nm), cet effet ne peut être attribué uniquement à l'énergie photonique de la source lumineuse utilisée. De plus, il est à noter que la durée d'analyse en LDI-FTICRMS est plus longue qu'en LDI-TOFMS.

Ces expériences à 355 nm ont été effectuées dans un but prospectif. Elles pourront s'avérer utiles dans le cadre notamment de l'identification à l'échelle microscopique des structures végétales impliquées dans la biosynthèse de l'hypéricine, dont le siège n'a pour le moment pas été localisé de façon certaine.

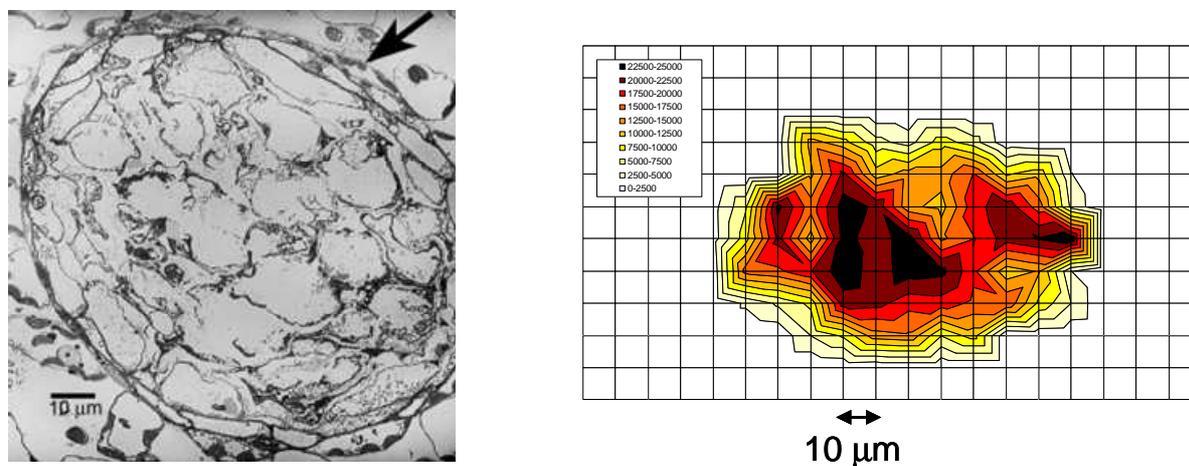


Figure IV. 27 : A gauche, image obtenue par MET sur une glande à hypéricines (la flèche indique les cellules périphériques aplaties soupçonnées d'être les siège de la biosynthèse des hypéricines d'après ⁶⁸) ; à droite, répartition spatiale du pic pseudomoléculaire (m/z 503) de l'hypéricine obtenue par LDI-TOFMS sur un pétale de fleur de Millepertuis

En effet, Kornfeld et al.⁶⁷ ont récemment entrepris de comparer la morphologie des nodules noirs de deux souches de Millepertuis, l'une produisant respectivement 6 et 14 fois plus

⁶⁷ Kornfeld, A., et al., *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, **45**, p 24

d'hypericine et de pseudohypericine que l'autre. Leurs observations par microscopie classique, microscopie électronique à balayage (MEB) et microscopie électronique à transmission (MET), ont montré que ces nodules noirs étaient constitués d'une gaine périphérique de cellules aplaties entourant un cœur de cellules contenant une substance rougeâtre, et qui sont typiquement mortes à maturité, même si leur enveloppe est intacte (Figure IV. 27). Les cellules périphériques étant plus plates chez les fleurs de la souche la plus productive en hypericines, elles pourraient être engagées dans les phénomènes conduisant à la production d'hypericines par la plante. L'analyse in situ par LDI-TOFMS pourrait s'avérer utile afin de détecter la présence de précurseurs biosynthétiques de l'hypericine au niveau de ces structures.

Chapitre V

Caractérisation par Ionisation Electrospray couplée à la
Spectrométrie de Masse de l'extrait de Millepertuis

INTRODUCTION :	131
I. EMPREINTES SPECTRALES OBTENUES EN INJECTION DIRECTE.....	132
<i>I. A. Influence des tensions appliquées</i>	132
I. A. 1. Potentiel appliqué à l'extrémité de la pointe électrospray.....	132
I. A. 2. Différence de potentiel entre les cônes.....	133
I. A. 3. Influence de la valeur du shutter DC.....	136
<i>I. B. Influence de la durée d'accumulation dans Q3</i>	136
<i>I. C. Composition des extraits méthanoliques</i>	137
I. C. 1. Analyse en mode négatif.....	137
I. C. 2. Analyse en mode positif.....	140
I. C. 3. Bilan des espèces non identifiées.....	142
II. APPORT DE L'ANALYSE DE COMPOSES STANDARD ET DES TECHNIQUES DE FRAGMENTATION POUR L'IDENTIFICATION DES COMPOSES AU SEIN DES EXTRAITS.....	144
<i>II. A. Les hyperforines</i>	144
II. A. 1. Analyse par ESIFTICRMS du composé de référence.....	144
II. A. 2. Techniques de fragmentation.....	145
<i>II. B. Les flavonoïdes</i>	151
<i>II. C. Les lipides</i>	153
<i>II. D. Les naphtodianthrone</i>	156
II. D. 1. L'hypéricine.....	157
II. D. 2. La pseudohypéricine.....	163
II. D. 3. L'isopseudohypéricine.....	167
II. D. 4. La protohypéricine et la protopseudohypéricine.....	169
II. D. 5. Conclusion.....	170
CONCLUSIONS DU CHAPITRE :	172

Introduction :

Si la Désorption Laser a permis comme nous l'avons montré dans le Chapitre précédent de détecter la plupart des familles de métabolites secondaires du Millepertuis dans l'extrait méthanolique, certaines familles, et notamment les acides hydroxycinnamiques et les procyanidines, n'ont été observées ni en mode de détection négatif, ni en mode de détection positif. Un autre mode d'ionisation, l'Ionisation par Electronébullisation ou Electrospray, a donc été mis en œuvre ; généralement utilisée consécutivement à une séparation par Chromatographie en Phase Liquide dans le cadre de l'analyse d'extraits végétaux, nous avons souhaité ici en évaluer le potentiel lorsqu'elle est couplée à la Spectrométrie de Masse Très Haute Résolution.

L'ionisation par électronébulisation fait partie des méthodes mises au point assez récemment pour permettre d'étendre les applications de la spectrométrie de masse aux composés peu volatiles et thermolabiles. C'est une méthode d'ionisation douce qui permet, dans des conditions favorables, de produire des ions moléculaires intacts et de minimiser les phénomènes de fragmentation. Cependant, les caractéristiques énergétiques de cette production d'ions sont bien moins définies que dans le cas d'autres méthodes d'ionisation. Par exemple, dans le cas de l'ionisation par impact électronique, l'énergie fixe des électrons et le vide utilisé dans la source conduit à une bonne reproductibilité des énergies internes des ions, quel que soit l'instrument utilisé, ce qui a permis la compilation de bases de données. Ce n'est pas le cas de l'ionisation par électronébulisation. En effet, dans ce cas les ions traversent une région de vide peu poussé, où leur énergie interne peut être modifiée avant qu'ils n'entrent dans le spectromètre de masse. Par conséquent, les spectres de masse obtenus par électronébulisation peuvent différer de façon significative avec les conditions expérimentales employées : pression, tensions d'accélération, nature de la solution. Dans le cadre de l'analyse par ESI-MS de nos extraits de Millepertuis, nous avons souhaité dans un premier temps évaluer l'influence de certains paramètres expérimentaux sur l'allure des spectres de masse obtenus. Dans un second temps, nous avons étudié l'empreinte spectrale obtenue pour un extrait méthanolique, et utilisé les techniques de dissociation IRMPD et SORI-CID afin d'une part de confirmer certaines attributions, d'autre part de préciser les voies de fragmentation de certains composés d'intérêt.

I. Empreintes spectrales obtenues en injection directe

Les extraits méthanoliques de Millepertuis ont été injectés dans la source Electrospray à un débit de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ et les spectres ont été acquis sur une gamme de masse allant de m/z 150 à m/z 1200.

I. A. Influence des tensions appliquées

I. A. 1. Potentiel appliqué à l'extrémité de la pointe électrospray

S'il n'existe pas de règle universelle concernant l'influence de la différence de potentiel entre la pointe électrospray et l'orifice par lequel entrent les ions (qui détermine le champ électrique auquel sont soumis les ions) sur l'intensité des pics observés, on constate en général qu'en dessous d'une certaine valeur, l'intensité diminue en raison d'une ionisation moins efficace, et qu'au dessus d'une valeur seuil, on a également une diminution due cette fois à l'instabilité des composés face au champ électrique. Cependant la position de ces deux valeurs limites varie, sur la gamme de potentiels généralement disponibles sur les sources, selon le type d'échantillon analysé. Si Suzuki et al.¹ ont constaté une augmentation constante de l'intensité moyenne des ions sur une gamme de différences de potentiel allant de 0 à 3000 V dans le cadre de l'analyse de divers composés (carbonyls, alcools, acides carboxyliques et amines primaires) ionisés par l'ajout d'une fonction amine quaternaire, Matz et al.², dans le cadre d'une étude sur les benzodiazépines réalisée en ESI-IMSMS (Electrospray Ionization Ion mobility Spectrometry Mass Spectrometry), n'ont pu obtenir de signaux qu'à partir de 3500 V et ont constaté une diminution des signaux dès 4000 V.

La Figure V. 1 présente les résultats que nous avons obtenus en mode négatif pour notre extrait méthanolique de Millepertuis. On constate que l'intensité maximale est obtenue dès 3300 V, et que cette intensité reste alors constante jusqu'à 4500 V (valeurs données pour le potentiel de la pointe électrospray, le potentiel du cône d'échantillonnage étant fixé à 90V).

Si dans le cas de nos extraits nous avons obtenu une intensité maximale et constante sur une large gamme de potentiels, il est à noter que les potentiels élevés peuvent conduire à la fragmentation de certains composés et à une modification de l'empreinte spectrale ; ce problème a par ailleurs été soulevé dans le cadre de leur étude par Matz et al., qui ont

¹ Suzuki, Y., et al., *Analytical Sciences*, 2004, **20**, 3, p 475

² Matz, L. M., Hill, H. H., *Analytica Chimica Acta*, 2002, **457**, 2, p 235

montré que pour l'oxazepam, l'augmentation de la différence de potentiel était corrélée avec la diminution de l'intensité de l'ion pseudomoléculaire au profit de l'ion résultant de la perte de H₂O. A cette étape de notre étude, les seuls composés ayant montré une propension à se fragmenter sont l'hypéricine et la pseudohypéricine (hypéricine à m/z 503 → m/z 487 et pseudohypéricine à m/z 519 → m/z 517, m/z 503 et m/z 487). L'examen des spectres aux différentes valeurs de potentiel n'a pas révélé de fragmentation de ces composés.

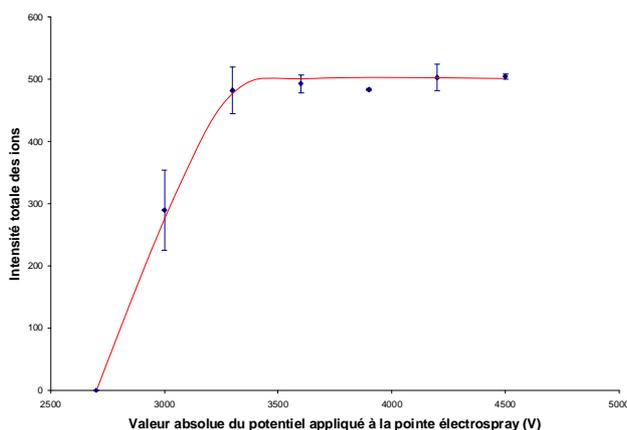


Figure V. 1 : Influence du potentiel appliqué à la pointe électrospray sur l'intensité totale des ions détectés dans le cadre de l'analyse d'un extrait méthanolique de Millepertuis

I. A. 2. Différence de potentiel entre les cônes

Sur l'appareil que nous avons utilisé, le potentiel du cône d'extraction est en général fixe : -10V en mode négatif et +10V en mode positif. Nous faisons donc varier le potentiel du cône d'échantillonnage dont la valeur maximale est fixée à 130V en valeur absolue.

Concernant l'analyse des extraits de Millepertuis, nous avons constaté que la différence de potentiel (ddp) appliquée entre les deux cônes avait une influence sur l'empreinte obtenue pour les extraits : comme le montre la Figure V. 2, qui traite des spectres obtenus en mode positif, une différence de potentiel importante entre les deux cônes favorise la détection des hautes masses, tandis que des différences de potentiel plus faible conduisent à plus d'informations dans les basses masses. A l'inverse, certains ions présents en basse masse apparaissent aux ddp élevées mais sont probablement dus à des phénomènes de fragmentation. Il est à noter que cet effet est moins marqué sur les spectres obtenus en mode négatif.

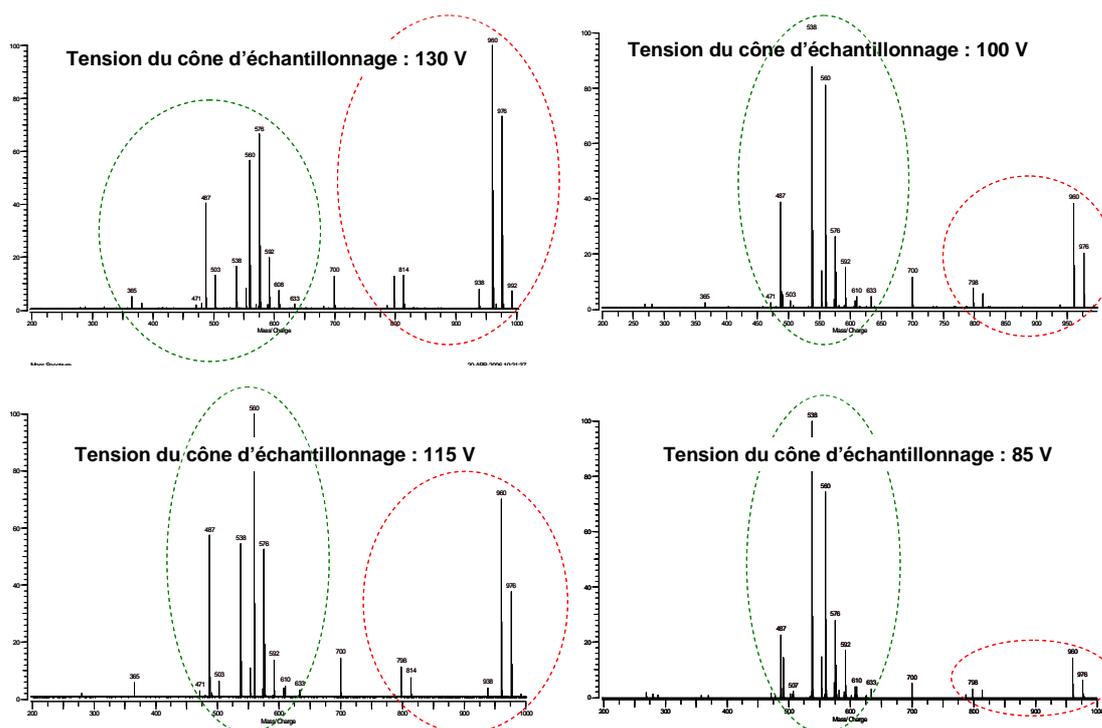


Figure V. 2 : Influence de la tension du cône d'échantillonnage sur le spectre de masse de l'extrait de Millepertuis en mode de détection **positif**

Parallèlement à cet effet sur la répartition en masse, on constate, comme le montre la Figure V. 3 a., que l'intensité totale mesurée est quasi constante sur la gamme de ddp étudiée. Une légère diminution est cependant observée pour une ddp trop faible. En ce qui concerne l'effet de la ddp sur la stabilité des hypéricines, la Figure V. 3 b. indique qu'on observe des phénomènes de fragmentation après 90 V (cône d'échantillonnage). Les potentiels inférieurs à 90 V peuvent donc être indifféremment employés d'autant que le rapport d'intensité pseudohypéricine/hypéricine est constant sur cette gamme (Figure V. 3, c) ; ainsi, on obtiendra pour ces composés une meilleure répétabilité concernant leurs intensités relatives.

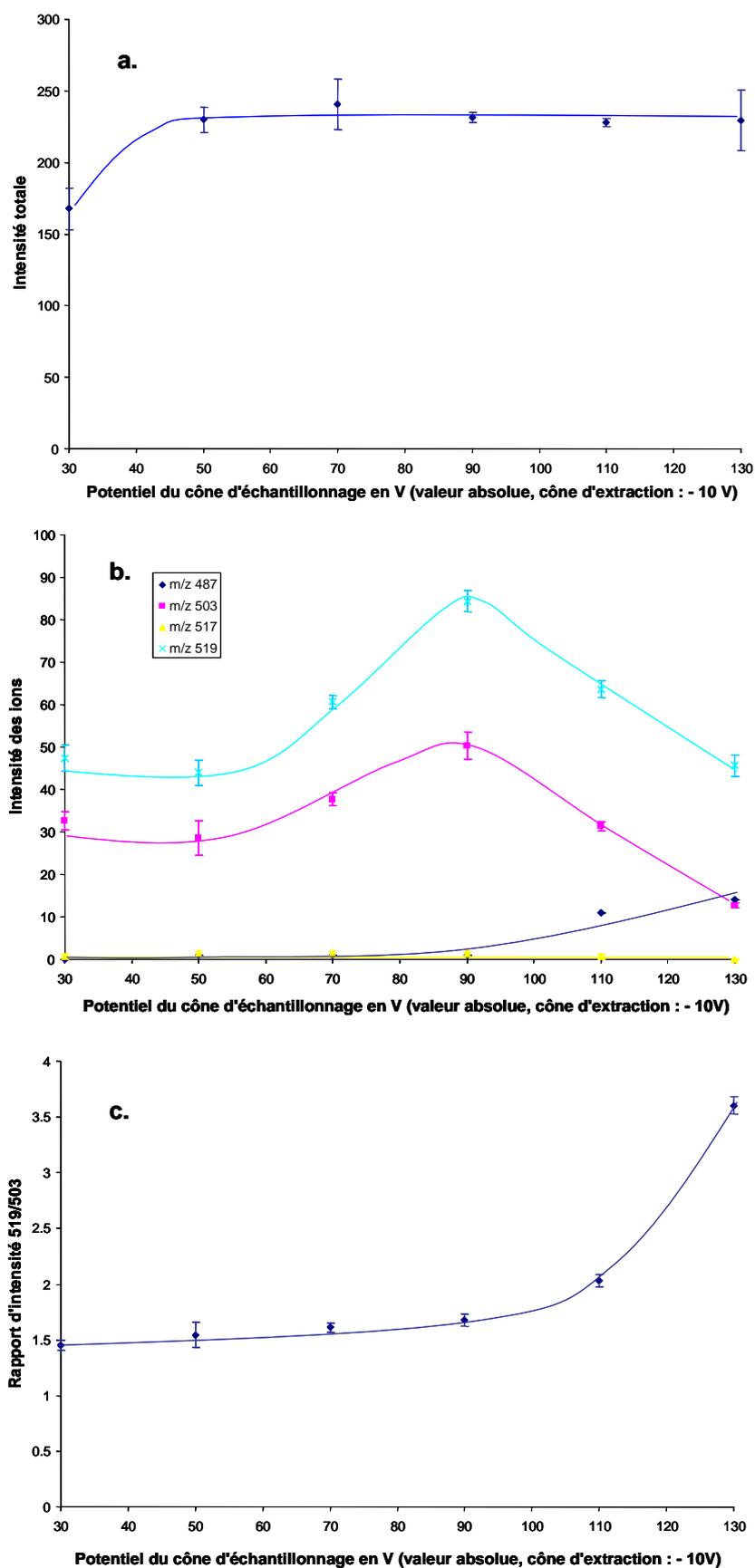


Figure V. 3 : Influence du potentiel du cône d'échantillonnage sur a. : l'intensité totale mesurée, b. : l'intensité des pics à m/z 487, 503, 517 et 519, c. : le rapport d'intensités 519/503)

I. A. 3. Influence de la valeur du shutter DC

Le shutter DC est un potentiel appliqué en sortie de Q3 afin de pousser les ions vers le guide d'ions. Si on peut penser en première approche que plus ce potentiel va être élevé, plus les ions vont être transmis par le guide d'ions, l'énergie cinétique importante acquise par les ions dans le cas d'un shutter DC élevé peut induire leur fragmentation lors de l'arrivée dans la cellule où en général un pulse de gaz est injecté afin de stabiliser les ions. Ainsi, comme le montre la Figure V. 4, dans le cas des extraits de Millepertuis, l'intensité totale observée est inversement proportionnelle à la valeur du shutter DC sur une large gamme de potentiels, et ce sont contre toute attente les valeurs de shutter les plus faibles permettent de détecter une plus grande quantité d'ions. Nous avons donc au cours de nos analyses utilisé la valeur de 10V.

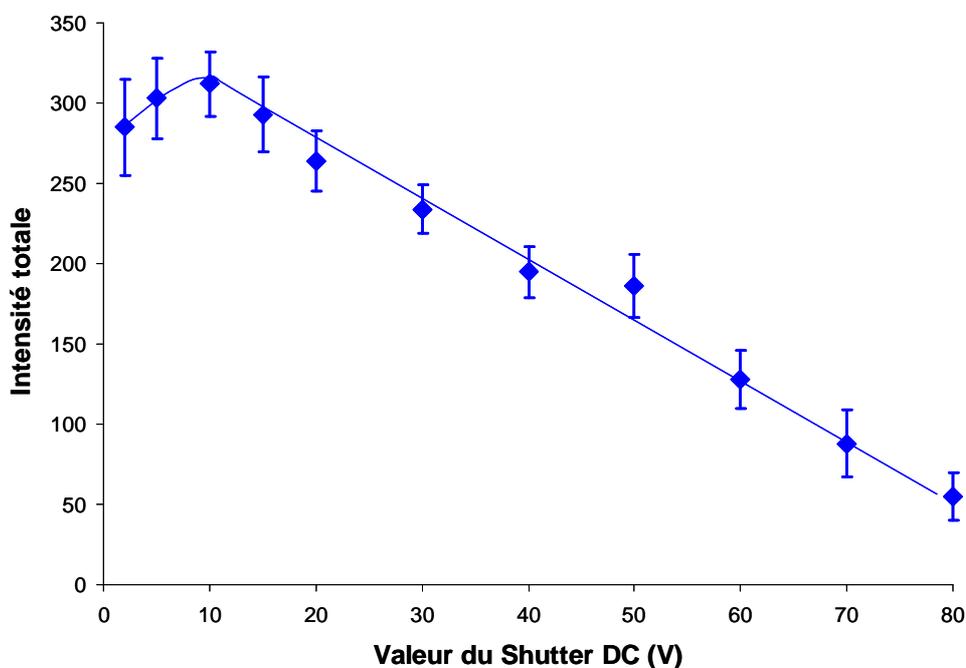


Figure V. 4 : Influence de la valeur du shutter DC sur l'intensité totale des pics observés sur les spectres de masse

I. B. Influence de la durée d'accumulation dans Q3

Notre appareil permet théoriquement d'accumuler les ions dans le troisième quadripôle pendant des durées allant de quelques millisecondes à plusieurs minutes. Cependant, il faut tenir compte du fait que des ions accumulés pendant des durées trop longues peuvent subir des fragmentations ou des recombinaisons, donnant une empreinte spectrale peu

représentative de la composition réelle du mélange étudié. Nous avons dans un premier temps étudié l'influence de la durée d'accumulation dans Q3 sur l'intensité totale des ions détectés ; les résultats, présentés sur la Figure V. 5, indiquent que sur une gamme allant de 1 à 30 secondes, on obtient deux segments de droite : de 1 à 5 secondes on observe une augmentation importante de l'intensité totale avec la durée d'accumulation, alors qu'après 10 secondes l'augmentation devient plus lente. Au vu de ces résultats et avant examen des spectres, un temps d'accumulation situé entre 5 et 10 secondes semble un bon compromis entre la durée de l'analyse et la quantité d'ions détectés, d'autant que l'examen des spectres ne révèle pas de modification de l'empreinte massique observée.

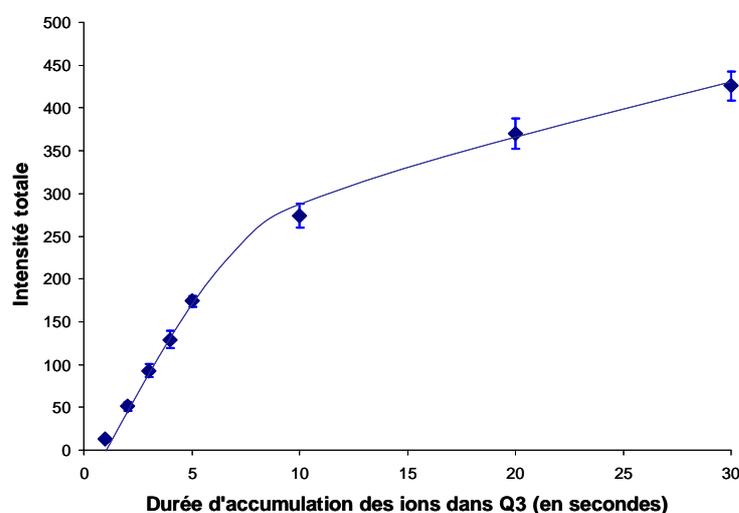


Figure V. 5 : Influence de la durée d'accumulation (en secondes) des ions dans Q3

I. C. Composition des extraits méthanoliques

I. C. 1. Analyse en mode négatif

Un spectre typiquement obtenu pour l'analyse de l'extrait total de Millepertuis en mode négatif, dans les conditions optimales d'après les expériences précédentes, est présenté sur la Figure V. 6. Afin de pouvoir déterminer les formules brutes des composés détectés dans les extraits, il a été nécessaire d'une part d'obtenir une résolution sur les pics de l'ordre de 200000. Dans ce but l'acquisition des spectres a en général été réalisée avec le nombre maximal de points possibles, soit 8192K. D'autre part, afin d'obtenir une bonne précision en masse, les spectres ont été calibrés en interne à l'aide de composés de référence. La stratégie utilisée a été d'employer des composés ne risquant pas de réagir avec les

composés de l'extrait. Pour cela nous avons par exemple choisi pour la calibration du mode négatif d'ajouter à la solution de l'émodyne, précurseur biosynthétique de l'hypéricine donnant un signal à m/z 269. De plus, un ajout d'hypéricine dans la solution juste avant l'analyse a permis de détecter son dimère à m/z 1007, ce qui nous a permis de calibrer les plus hautes masses.

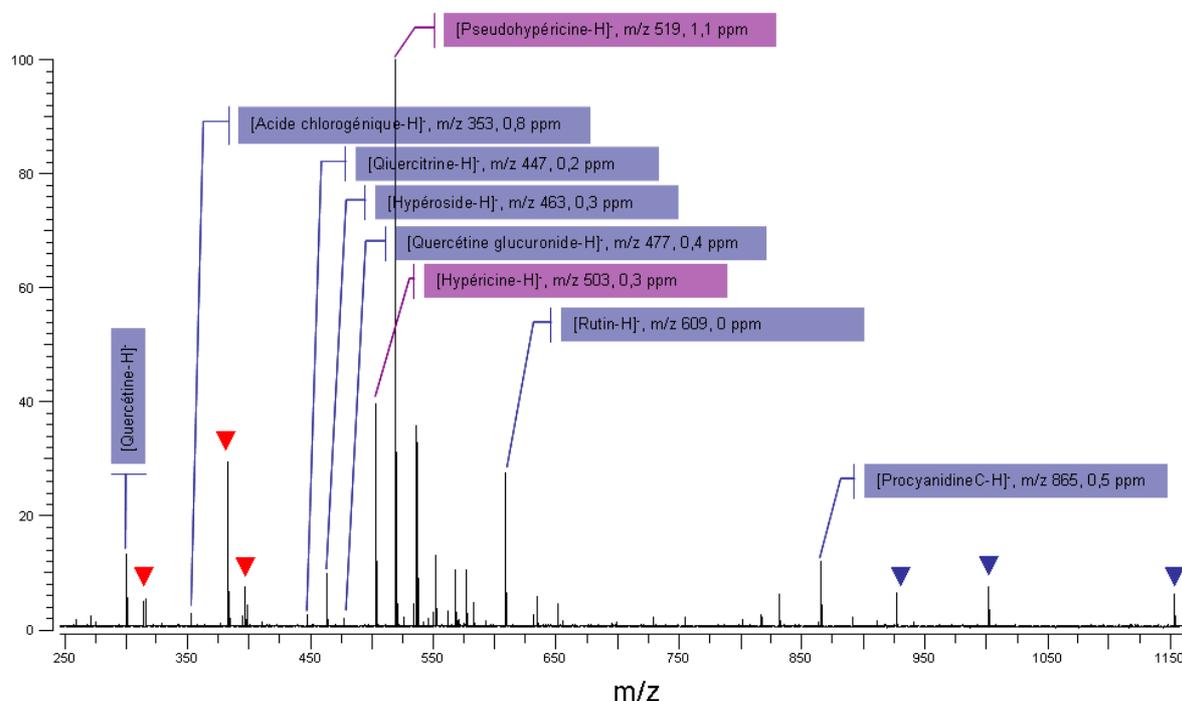


Figure V. 6 : Spectre ESI-FTICRMS en mode de détection **négatif** d'un extrait de Millepertuis brut

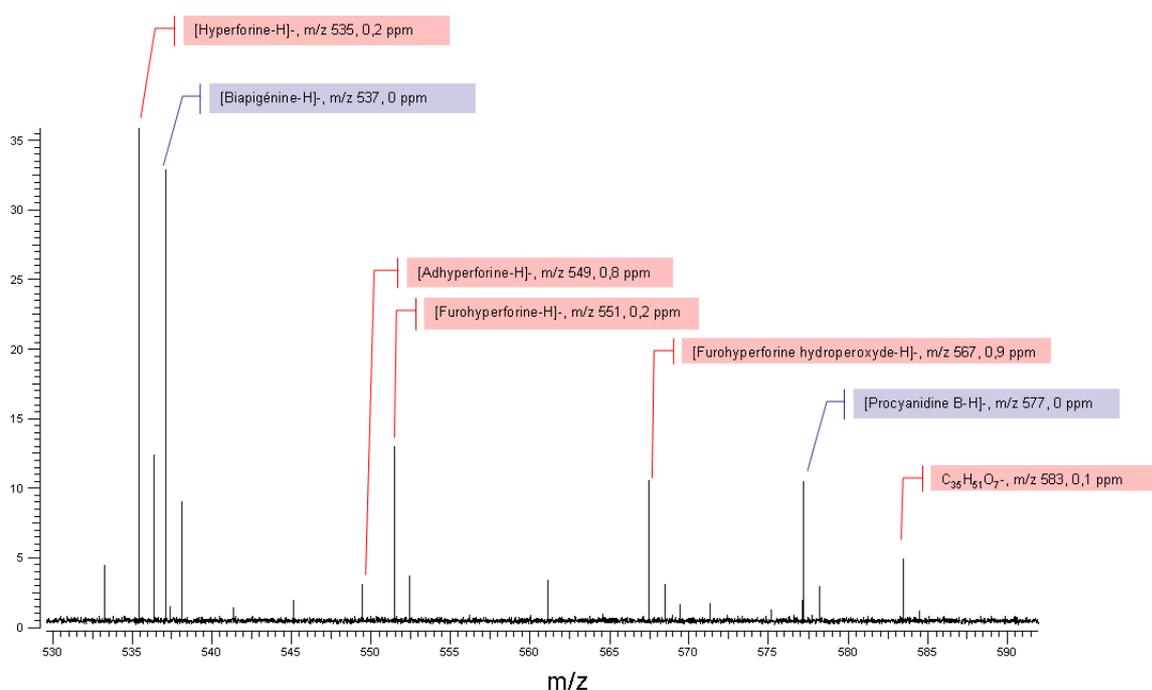


Figure V. 7 : Agrandissement de la zone correspondant aux phloroglucinolins

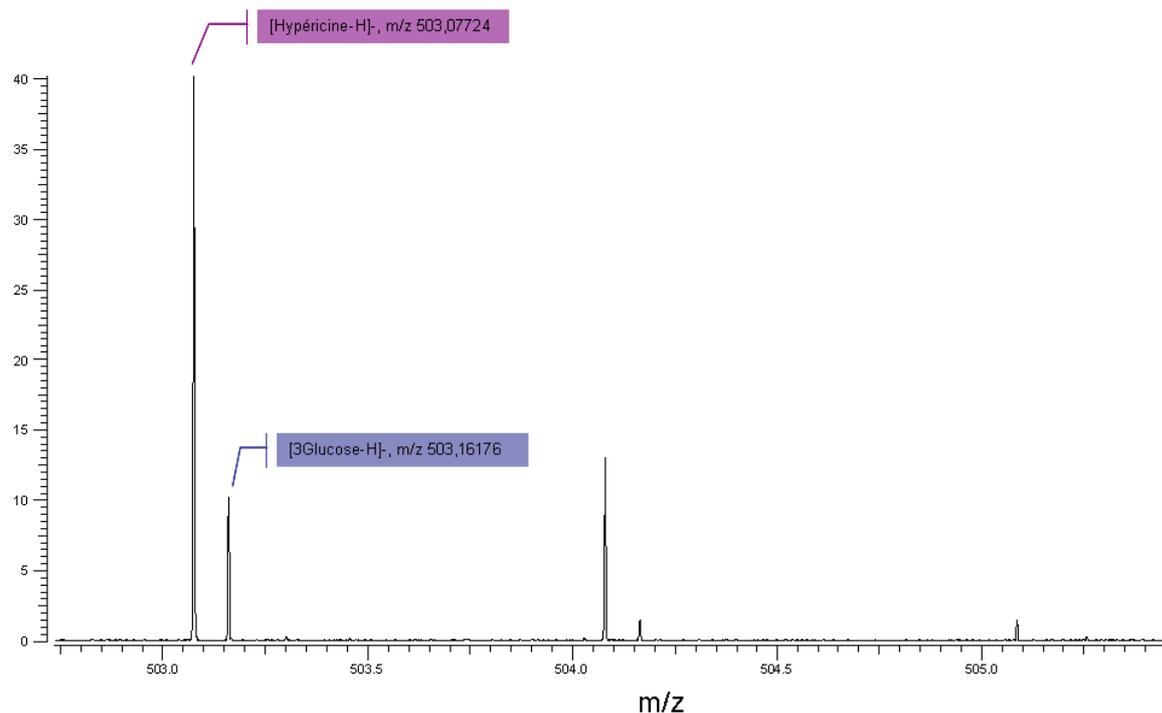


Figure V. 8 : Agrandissement de la zone correspondant à l'hypéricine

Dans un premier temps notre démarche a été d'essayer d'attribuer ces pics à des composés susceptibles d'entrer dans la composition des extraits de Millepertuis, d'après les recherches bibliographiques que nous avons réalisées et dont une synthèse est présentée en Annexe 2. Nous avons ainsi pu identifier par leur masse exacte (à 0,4 ppm près en moyenne) un grand nombre de composés faisant partie des polyphénols, des hypéricines et des phloroglucinols. Il est à noter que nous avons également détecté un dérivé de l'hyperforine encore non répertorié de formule brute $C_{35}H_{51}O_7^-$ (Figure V. 7). Concernant les signaux observés pour les hypéricines, il est à noter qu'un second ion, correspondant à un trisaccharide, est détecté à la masse nominale 503 (Figure V. 8). L'écart de masse entre ces deux composés, 0,08452 Da, nécessite une résolution de 6000 afin de pouvoir les séparer ; il est bon de noter ici que les résolutions que nous avons obtenues en LDI-TOFMS, de l'ordre de 4000 sur le pic à m/z 503, permettent non pas de séparer ces ions mais de détecter éventuellement la présence d'un épaulement, ce qui n'est pas le cas sur le spectre que nous avons obtenu (cf Chapitre IV). Les ions signalés par ▼ correspondent à des fragments d'hyperforine et seront décrits dans la partie II. A. 2 ; quand aux ions ▲, ce sont des espèces oligomériques qui seront discutées plus en détail en II. B.

Composé (sous forme [M-H] ⁻)	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
Quercétine	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301.03482	301.03497	0.5	288100
Fragment hyperforine	C ₁₉ H ₂₁ O ₄ ⁻	313.14453	313.14447	0.2	296900
Fragment hyperforine	C ₂₀ H ₂₅ O ₃ ⁻	313.18092	313.18089	0.1	303000
Fragment hyperforine	C ₁₉ H ₂₃ O ₄ ⁻	315.16018	315.16027	0.3	254700
Acide chlorogénique	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353.08725	353.08746	0.6	246700
Fragment hyperforine	C ₂₄ H ₃₁ O ₄ ⁻	383.22278	383.22312	0.9	255800
Fragment hyperforine	C ₂₆ H ₃₅ O ₃ ⁻	395.25917	395.25921	0.1	242900
Fragment hyperforine	C ₂₅ H ₃₃ O ₄ ⁻	397.23843	397.23803	1	245700
Quercitrine	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09293	0,8	209500
Hypéroside	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463.08820	463.08852	0,7	199200
Quercétine glucuronoside	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃ ⁻	477.06746	477.06765	0,4	198500
Hypéricine	C ₃₀ H ₁₅ O ₈ ⁻	503.07724	503.07664	1,2	214100
[3 Glucose – 2H ₂ O]	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ ⁻	503.16176	503.16166	0.2	205000
Pseudohypéricine	C ₃₀ H ₁₅ O ₉ ⁻	519.07216	519.07174	0,8	230900
Hyperforine	C ₃₅ H ₅₁ O ₄ ⁻	535.37928	535.37933	0,1	196500
Amentoflavone/Biapigenin	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	537.08272	537.08234	0,7	194800
Furohyperforine	C ₃₅ H ₅₁ O ₅ ⁻	551.37420	551.37376	0,8	187600
Furohyperforine hydropéroxyde	C ₃₅ H ₅₁ O ₆ ⁻	567.36911	567.36854	1,0	184100
Procyanidine B2	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂ ⁻	577.13515	577.13550	0,6	156400
Rutin	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14654	0,7	145600
Procyanidine C2	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ ⁻	865.19854	865.19932	0,9	120400
2 Hypéroside	C ₄₂ H ₃₉ O ₂₄ ⁻	927.18368	927.18349	0.2	117700
Hypéroside + Amentoflavone	C ₅₁ H ₃₇ O ₂₂ ⁻	1001.17820	1001.17770	0.5	97000
Procyanidine D2	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₄ ⁻	1153.26193	1153.26251	0.5	90500

Tableau V. 1 : Données expérimentales et théoriques pour les ions détectés en mode de détection négatif en ESI-FTICRMS sur l'extrait de Millepertuis

I. C. 2. Analyse en mode positif

Ce mode d'ionisation n'a jamais été employé pour l'analyse en injection directe des extraits de Millepertuis, car il est communément admis que l'ionisation en mode positif ne permet pas de détecter les molécules de la famille de l'hypéricine, souvent ciblées lors des analyses. Cependant nous avons souhaité évaluer le potentiel qu'offraient de telles conditions d'analyse pour la détection des autres familles de composés. Dans un premier temps nous

avons analysé l'extrait de Millepertuis brut. Sur le spectre présenté Figure V. 9, qui correspond à une analyse avec une ddp entre les deux cônes importante.

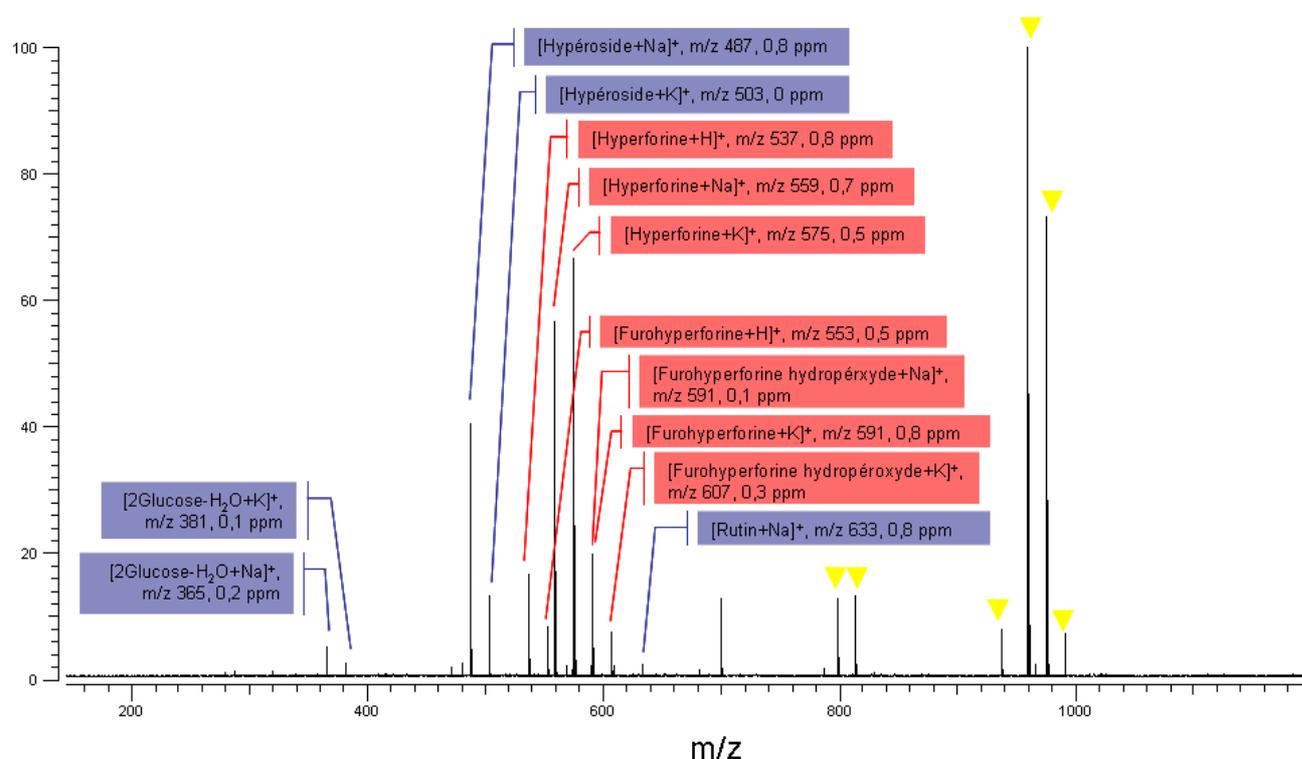


Figure V. 9 : Spectre ESI-FTICRMS obtenu en mode de détection **positif** pour un extrait méthanolique de Millepertuis avec une différence de potentiel importante entre le cône d'échantillonnage et le cône d'extraction (120V)

Nous avons pu en première approche identifier une dizaine d'ions, correspondant à des ions protonés, sodiques ou potassiques des deux flavonoïdes majoritaires sur le spectre en négatif, l'hypéroside et la rutine, et de l'hyperforine et de ses dérivés. Ce mode de détection semble intéressant pour les dérivés de l'hyperforine, qui sont détectés en plus grand nombre et pour certaines avec un meilleur rapport signal/bruit qu'en mode de détection négatif. Les espèces marquées ▼ correspondent à des espèces lipidiques qui seront discutées dans la partie II. C de ce Chapitre.

Dans un second temps nous avons analysé notre extrait de Millepertuis après ajout d'acide formique dans la solution, dans une proportion de 1%, afin de déterminer si ce protocole permettait d'obtenir des informations supplémentaires quant à sa composition. Lorsque la ddp entre les cônes est faible, on constate l'apparition de nombreux pics dans la gamme de masse 300-550 (Figure V. 10). De plus, quelles que soient les conditions d'analyse, l'ajout d'acide formique favorise l'ionisation de l'hyperforine sous forme protonée, et le pic à m/z 537 devient majoritaire.

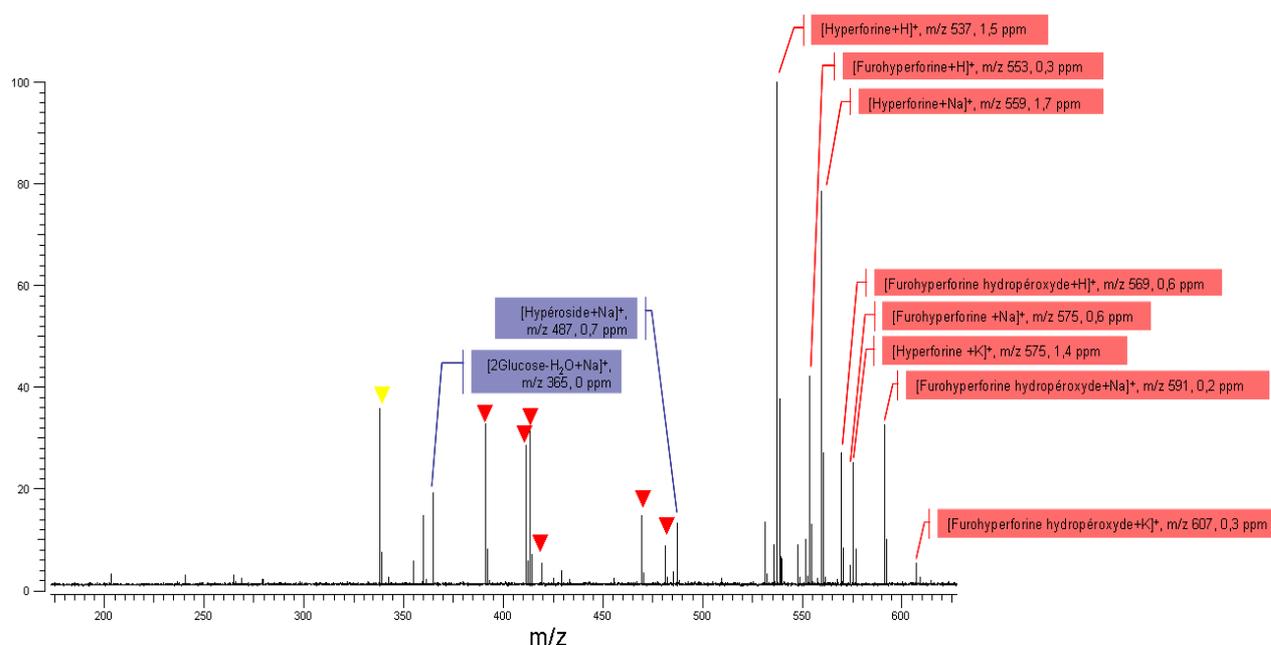


Figure V. 10 : Spectre obtenu en mode de détection **positif** pour un extrait total de Millepertuis avec une différence de potentiel entre le cône d'échantillonnage et le cône d'extraction de 40V et après un ajout d'1% d'acide formique pur dans la solution

Le mode de détection positif ne fournit à ce stade de l'étude pas d'informations supplémentaires par rapport aux spectres obtenus sur les extraits de Millepertuis en mode de détection négatif, puisque seuls les dérivés de l'hyperforine sont bien détectés. Quant aux nouvelles espèces de plus basse masse, elles n'ont pu être attribuées à cette étape de l'étude.

I. C. 3. Bilan des espèces non identifiées

Les formules brutes théoriques obtenues pour les signaux non identifiés (en mode de détection positif et négatif) grâce à la calibration en masse effectuée sur les composés connus sont présentées dans le Tableau V. 2. Elles ont été obtenues en interrogeant le logiciel Elemental Composition Calculator (IonSpec, Lake Forest, California), avec une erreur tolérée de 2 ppm et un état de charge valant -1 ou +1. Les contraintes imposées sur le nombre d'atomes étaient les suivantes : pour le carbone, l'oxygène et l'hydrogène, $0 \leq n \leq 100$ et pour le sodium et le potassium, $0 \leq n \leq 1$. Pour les ions présentant une masse impaire, l'élément azote a été rajouté à cette liste. Le logiciel est successivement interrogé : pour C, H et O, uniquement, puis pour C, H, O et 1Na, et enfin pour C, H, O et 1K. Le même travail a été effectué sur le spectre obtenu en mode négatif ; les résultats sont présentés dans ce même tableau.

Masse mesurée	Masse exacte	Erreur (ppm)	Formule brute
Mode de détection positif			
797,51646	797,51742	1,2	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₀ Na ⁺
	797,51757	1,4	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₁ K ⁺
813,51257	813,51233	0,3	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₁ Na ⁺
	813,51249	0,1	C ₄₂ H ₇₈ O ₁₂ K ⁺
937,58764	937,58830	0,7	C ₅₁ H ₈₅ O ₁₅ ⁺
959,57009	959,57040	0,3	C ₄₈ H ₈₈ O ₁₆ K ⁺
	959,57025	0,2	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₅ Na ⁺
975,56418	975,56516	1	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₆ Na ⁺
	975,56531	1,2	C ₄₈ H ₈₈ O ₁₇ K ⁺
Mode de détection positif avec acide formique			
481,33174	481,33124	1	C ₃₁ H ₄₅ O ₄ ⁺
469,33156	469,33124	0,7	C ₃₀ H ₄₅ O ₄ ⁺
419,31534	419,31559	0,6	C ₂₆ H ₄₃ O ₄ ⁺
413,26659	413,26638	0,5	C ₂₁ H ₄₂ O ₅ K ⁺
	413,26623	0,9	C ₂₄ H ₃₈ O ₄ Na ⁺
411,28929	411,28937	0,2	C ₂₇ H ₃₉ O ₃ ⁺
391,28464	391,28429	0,9	C ₂₄ H ₃₉ O ₄ ⁺
360,32332	360,32369	1	C ₂₂ H ₄₃ NONa ⁺
	360,32341	0,2	C ₂₁ H ₄₄ O ₄ ⁺⁺
355,22659	355,22677	0,5	C ₂₃ H ₃₁ O ₃ ⁺
338,34160	338,34174	0,4	C ₂₂ H ₄₄ NO ⁺
Mode de détection négatif			
313,14442	313,14453	0,4	C ₁₉ H ₂₁ O ₄ ⁻
313,18089	313,18092	0,1	C ₂₀ H ₂₅ O ₃ ⁻
315,15993	315,16018	0,8	C ₁₉ H ₂₃ O ₄ ⁻
383,22240	383,22278	1	C ₂₄ H ₃₂ O ₄ ⁻
395,25965	395,25917	1,2	C ₂₆ H ₃₅ O ₃ ⁻
397,23834	397,23843	0,2	C ₂₅ H ₃₃ O ₄ ⁻
399,21778	399,21770	0,2	C ₂₄ H ₃₁ O ₅ ⁻
411,25458	411,25408	1,2	C ₂₆ H ₃₅ O ₄ ⁻
927,18275	927,18368	1	C ₄₂ H ₃₉ O ₂₄ ⁻
1001,17871	1001,17820	0,5	C ₅₁ H ₃₇ O ₂₂ ⁻
1153,26229	1153,26193	0,3	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₄ ⁻

Tableau V. 2 : Formules brutes théoriques des ions non identifiés sur les spectres ESI-FTICRMS de l'extrait méthanolique de Millepertuis

Si l'excellente précision en masse obtenue et nos recherches bibliographiques sur la composition des extraits de Millepertuis ont permis d'identifier un grand nombre d'ions observés en ESI-FTICRMS sur l'extrait méthanolique, le nombre d'espèces restant à caractériser est important. En mode de détection négatif, la précision en masse est suffisante pour obtenir sans ambiguïté la formule brute des ions ; en revanche, en mode de détection positif, la possibilité d'observer des ions protonés aussi bien que des adduits alcalins, ainsi que des ions azotés compte-tenu de la détection de deux ions de masse paire, rend l'identification plus difficile. Les expériences qui vont être présentées maintenant ont pour but de proposer des structures pour ces ions.

II. Apport de l'analyse de composés standard et des techniques de fragmentation pour l'identification des composés au sein des extraits

L'objectif de cette partie du travail consiste en premier lieu à analyser certains composés de référence dans les conditions expérimentales utilisées pour les extraits, afin de déterminer s'ils subissent des fragmentations spontanées au cours de l'analyse ou s'ils génèrent éventuellement des ions de masse supérieure à l'ion pseudomoléculaire, et notamment des espèces oligomériques. Dans un second temps, deux techniques de spectrométrie de masse en tandem, le SORI-CID et l'IRMPD, ont été employées afin d'une part de valider certaines attributions, et d'autre part de caractériser certains produits encore non identifiés à cette étape de l'étude.

II. A. Les hyperforines

II. A. 1. Analyse par ESIFTICRMS du composé de référence

Concernant ce composé, nous avons souhaité dans un premier temps l'analyser en mode MS simple, dans des conditions similaires à celles utilisées pour l'analyse des extraits de Millepertuis. En effet le spectre de masse obtenu en mode négatif pour l'extrait présente certains pics pouvant, d'après les formules brutes calculées, être issus d'une fragmentation spontanée de l'hyperforine ou de l'un de ses dérivés. La Figure V. 11 présente le spectre obtenu en mode de détection négatif pour une solution méthanolique d'hyperforine à 10^{-7} M.

Le spectre ne montre aucune fragmentation spontanée de l'hyperforine dans ces conditions d'analyse. Nous avons donc poursuivi notre étude par des expériences de fragmentation en SORI-CID puis IRMPD.

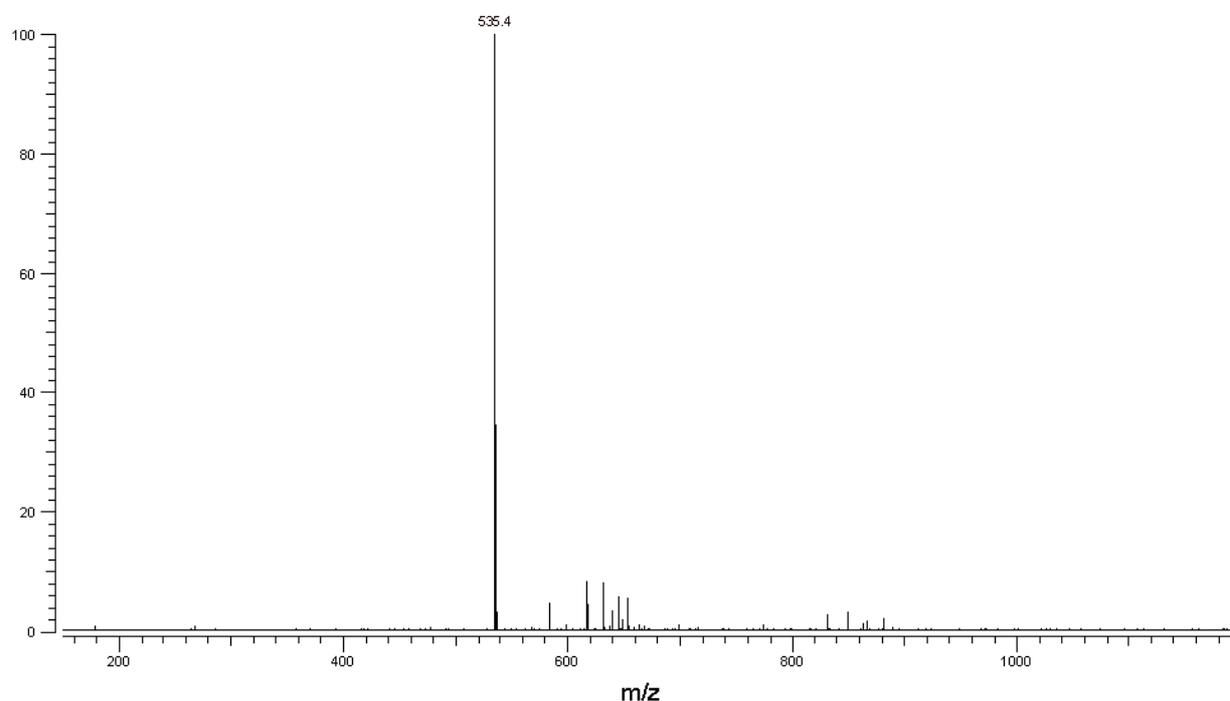


Figure V. 11 : Spectre ESI-FTICRMS de l'hyperforine (10^{-7} M dans le méthanol) en mode de détection **néгатif** (conditions d'analyse équivalentes à celles utilisées pour les extraits de Millepertuis)

II. A. 2. Techniques de fragmentation

Le spectre de fragmentation SORI-CID, présenté sur la Figure V. 12, correspond à l'envoi d'un pulse de gaz de 20 ms simultanément à une irradiation off-résonance de 10 V d'amplitude et d'une durée totale de 250 ms (centrée sur m/z 535,4, offset de 4000 Hz). Ce mode de fragmentation génère relativement peu d'ions, qui correspondent à l'éjection totale ou partielle des chaînes latérales, comme résumé dans le Tableau V. 3. Des fragments de ce type ont déjà été décrits en 2000 par Mauri et al.³, et les mécanismes correspondant, précisés en 2006 par Sleno et al.⁴, ne seront pas décrits ici.

³ Mauri, P., Pietta, P., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000, **14**, 2, p 95

⁴ Sleno, L., et al., *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2006, **20**, 18, p 2641

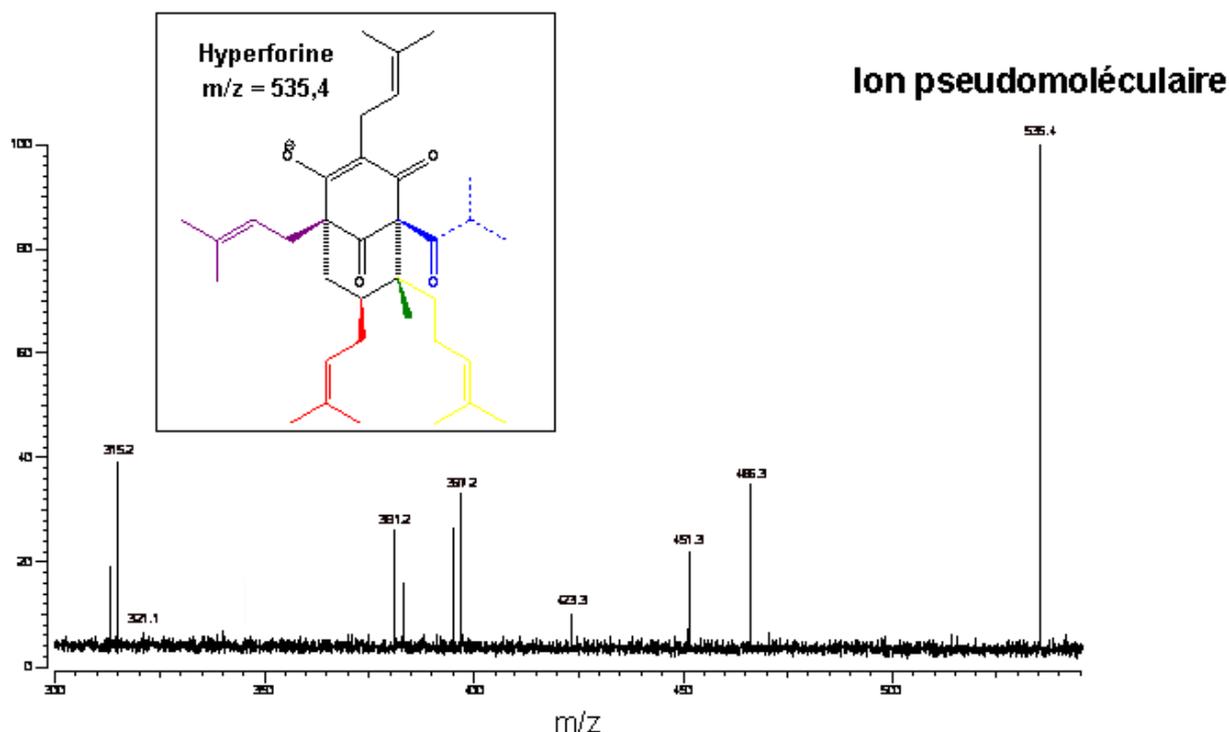


Figure V. 12 : Spectre MS² SORI-CID de l'hyperforine en mode de détection **négatif**

Parmi les fragments identifiés en SORI-CID, certains sont présents sur le spectre en mode de détection négatif de l'extrait de Millepertuis : m/z 397, 395, 383, 315, 313, et ont pu être identifiés grâce à cette expérience de MS² et aux formules brutes trouvées dans le Tableau V. 2.

Fragment	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)
Perte de - ou -	C ₃₀ H ₄₂ O ₄ ⁻	466.30886	466.30879	0.5
Perte de - + -	C ₂₉ H ₃₉ O ₄ ⁻	451.28538	451.28554	0.6
Perte de - + -	C ₂₅ H ₃₅ O ₄ ⁻	423.25429	423.25408	0.5
Perte de - et -	C ₂₅ H ₃₃ O ₄ ⁻	397.23843	397.23850	0.2
Perte de -, - et -	C ₂₆ H ₃₅ O ₃ ⁻	395.25917	395.25922	0.1
Perte de - et -	C ₂₄ H ₃₁ O ₄ ⁻	383.22278	383.22281	0.1
Perte de -, -, - et -	C ₂₅ H ₃₃ O ₃ ⁻	381.24352	381.24340	0.3
Perte de -, - et -	C ₁₉ H ₂₃ O ₄ ⁻	315.16018	315.16020	0.1
Perte de -, -, - et -	C ₂₀ H ₂₅ O ₃ ⁻	313.18092	313.18110	0.6

Tableau V. 3 : Identification des fragments détectés pour l'hyperforine en mode SORI-CID

Afin d'obtenir des informations complémentaires, l'hyperforine a été fragmentée par IRMPD. Le spectre MS² ainsi obtenu est présenté sur la Figure V. 13.

Le nombre de fragments obtenus en IRMPD est plus important qu'en SORI-CID. Certains fragments, signalés par une flèche bleue, sont communs aux deux techniques. D'autres, signalés par une flèche rouge, ont été récemment détectés par Sleno et al. sans que leur formation n'ait été expliquée, et les fragments restant n'ont jamais été détectés auparavant.

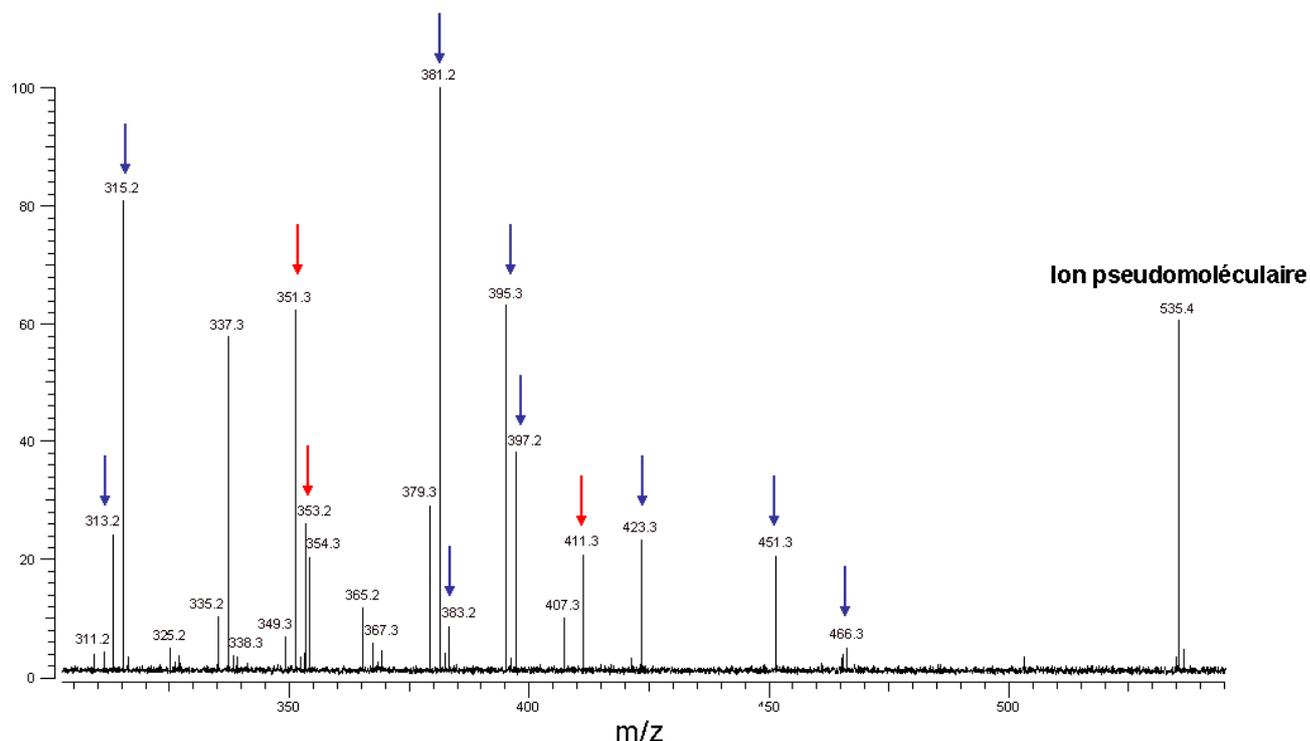


Figure V. 13 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'hyperforine en mode de détection **négatif**

Masse mesurée	Formule brute	Erreur (ppm)
411,25426	$C_{26}H_{35}O_4^-$	0,4
407,29590	$C_{28}H_{39}O_2^-$	0,9
379,26440	$C_{26}H_{35}O_2^-$	0,4
367,26417	$C_{25}H_{35}O_2^-$	0,2
365,24866	$C_{25}H_{33}O_2^-$	0,2
353,24839	$C_{24}H_{33}O_2^-$	0,6
351,26962	$C_{25}H_{35}O^-$	0,8
337,25370	$C_{24}H_{33}O^-$	0
313,14444	$C_{19}H_{21}O_4^-$	0,3

Tableau V. 4 : Fragments détectés pour l'hyperforine uniquement en mode IRMPD

L'ensemble des fragments non expliqués ou jamais encore répertoriés est synthétisé dans le Tableau V. 4 ; la calibration est effectuée grâce aux fragments déjà identifiés, et l'erreur est donnée en valeur absolue ; le fragment à m/z 313 correspond à un isobare du m/z 313 déjà répertorié dans la bibliographie.

Les informations fournies par la fragmentation IRMPD de l'hyperforine permettent de réaliser deux attributions supplémentaires sur le spectre de l'extrait méthanolique de Millepertuis obtenu en mode négatif, à savoir les ions à m/z 313 et 411. Dans cette gamme de masse le seul ion non encore attribué est celui à m/z 399 ; s'il n'a pas été détecté pour l'hyperforine dans le cas du SORI-CID et de l'IRMPD, la présence de 5 oxygènes dans sa structure laisse penser que ce fragment est issu d'un des produits d'oxydation de l'hyperforine.

Parmi les fragments répertoriés dans le tableau précédent (Tableau V. 4), ceux à m/z 353 et 351 ont retenu notre attention car ils ont également été obtenus par Sleno et al. en IRMPD. Ils correspondent à des pertes respectives de $C_{11}H_{18}O_2$ et $C_{10}H_{16}O_3$ par l'ion pseudomoléculaire. Des expériences de MS^3 (quadripôle-piège à ions linéaire) ont permis à cette équipe de les affilier aux fragments à m/z 397 ($C_{25}H_{33}O_4^-$) et 395 ($C_{26}H_{35}O_3^-$), indiquant que se produit la perte d'une molécule de CO_2 . L'examen des structures proposées par Sleno et al. pour les fragments à 397 et 395 montre qu'aucun atome de carbone n'est adjacent à deux atomes d'oxygène, et que le mécanisme de perte de CO_2 fait probablement intervenir l'ouverture du cycle trioxygéné et son réarrangement. Ce type de mécanisme a déjà été décrit dans la littérature dans le cadre de l'étude de la fragmentation des anions hydroxyphénoxydes, notamment par Flechtner et al.⁵, comme présenté sur la Figure V. 14.

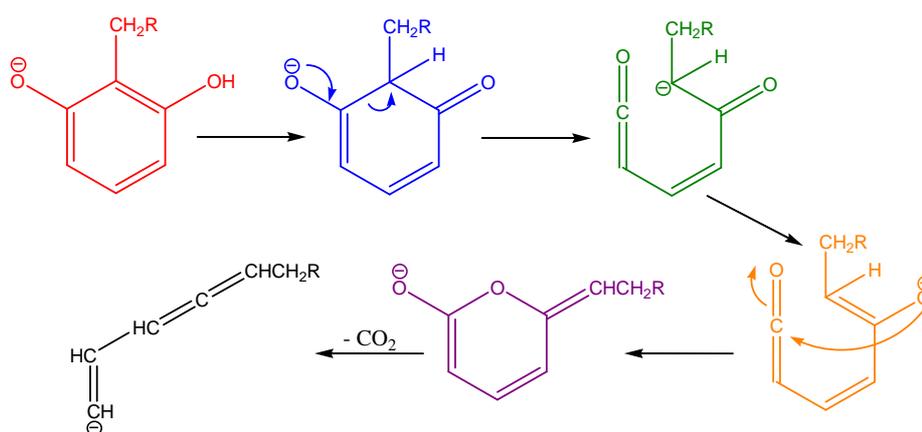


Figure V. 14 : Mécanisme de perte de CO_2 proposé par Flechtner et al. pour l'anion hydroxyphénoxyde

⁵ Flechtner, T. W., et al., *Journal of Mass Spectrometry*, 1996, **31**, p 377

Sa faisabilité sur la molécule d'hyperforine afin d'obtenir le fragment m/z 351 est illustrée par la Figure V. 15. Il est à noter que nous avons proposé pour l'ion m/z 395 une structure différente de celle avancée par Sleno et al., qui puisse nous permettre d'éliminer une molécule de CO_2 par le mécanisme précédemment décrit.

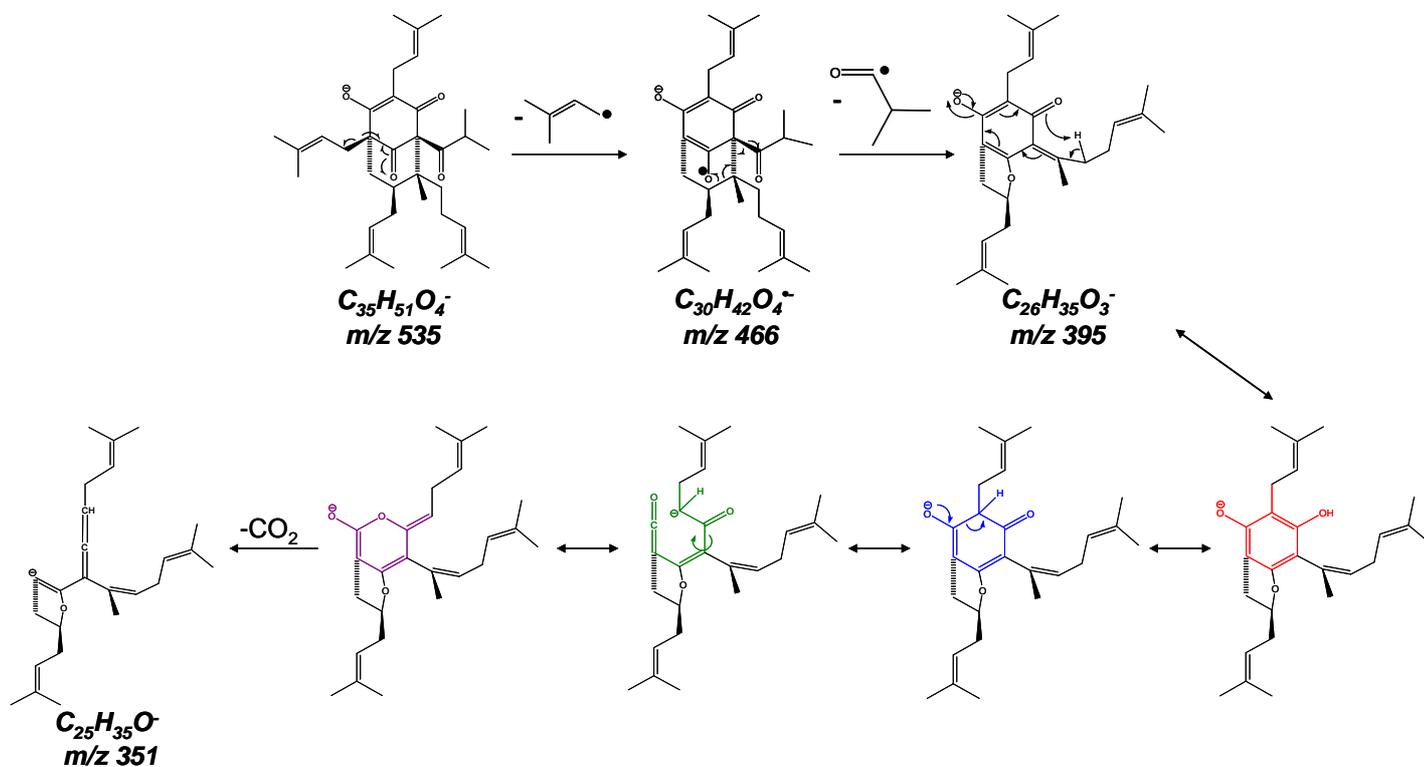


Figure V. 15 : Proposition de mécanisme de perte de CO_2 conduisant au fragment à m/z 351

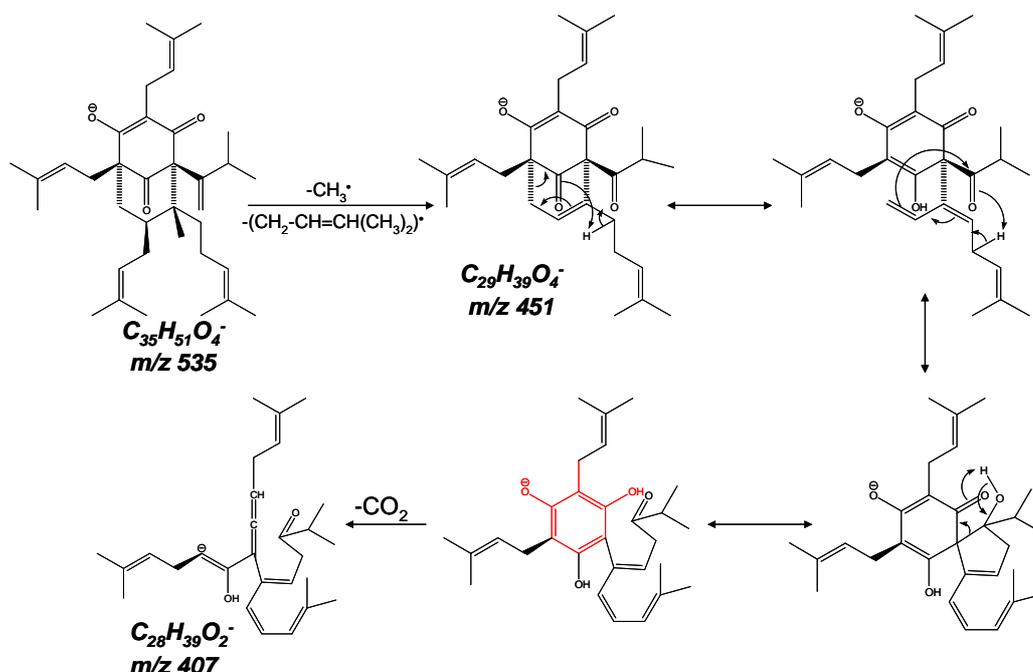


Figure V. 16 : Proposition de mécanisme pour la formation de l'ion m/z 407

De la même façon, le fragment observé à m/z 407 pourrait être issu de la perte de CO_2 par l'ion m/z 451, comme présenté sur la Figure V. 16. La Figure V. 17 propose également une voie possible de formation de l'ion à m/z 337 depuis l'ion à m/z 381.

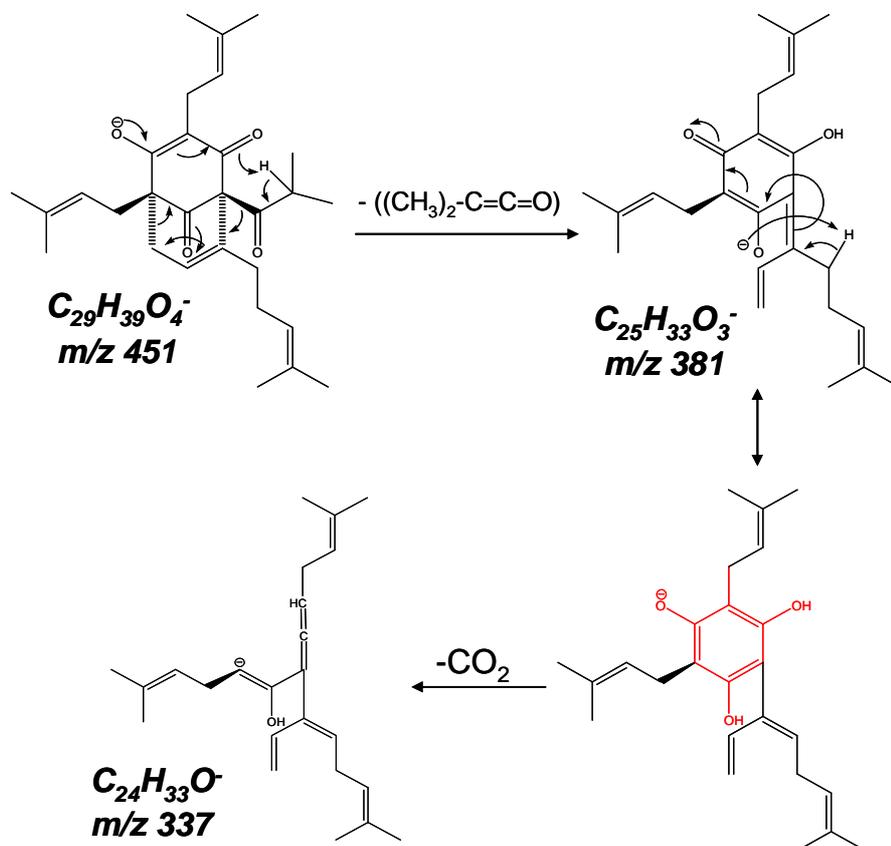


Figure V. 17 : Proposition de mécanisme pour la formation de l'ion m/z 337

Des mécanismes de fragmentation similaires peuvent être mis en œuvre afin d'expliquer la formation des fragments m/z 367 (perte de CO_2 par rapport à m/z 411), m/z 379 (perte de CO_2 par rapport à m/z 423) et m/z 353 (perte de CO_2 par rapport à m/z 397). Cependant nous n'avons pas décrits ces mécanismes ici car ils nécessitent l'étude de la conformation tridimensionnelle de l'hyperforine et l'évaluation de l'accessibilité de certains protons.

Les voies de fragmentation que nous avons proposées ici ne sont que des pistes à explorer pour comprendre le comportement de l'hyperforine et de ses dérivés ; elles pourront être des outils pour la caractérisation de nouveaux métabolites ou de dérivés synthétiques. Le mécanisme de perte de CO_2 proposé peut, selon que l'expulsion du neutre se produit par des ruptures hétérolytiques ou homolytiques, conduire à des fragments différents. Des précisions pourront être apportées par l'étude des fragments de masse inférieure à 300 ou par des expériences de MS^3 sur ces fragments.

Les expériences de fragmentations menées en mode de détection positif (Figure V. 18) ont également permis de caractériser certains ions observés sur les extraits de Millepertuis, à savoir à m/z 481, 469, 411 et 355. L'ensemble des autres ions non identifiés sur le spectre de l'extrait de Millepertuis (Tableau V. 2), hormis les deux ions de masses paires, présente des formules brutes compatibles avec le fait qu'ils soient issus des dérivés de l'hyperforine.

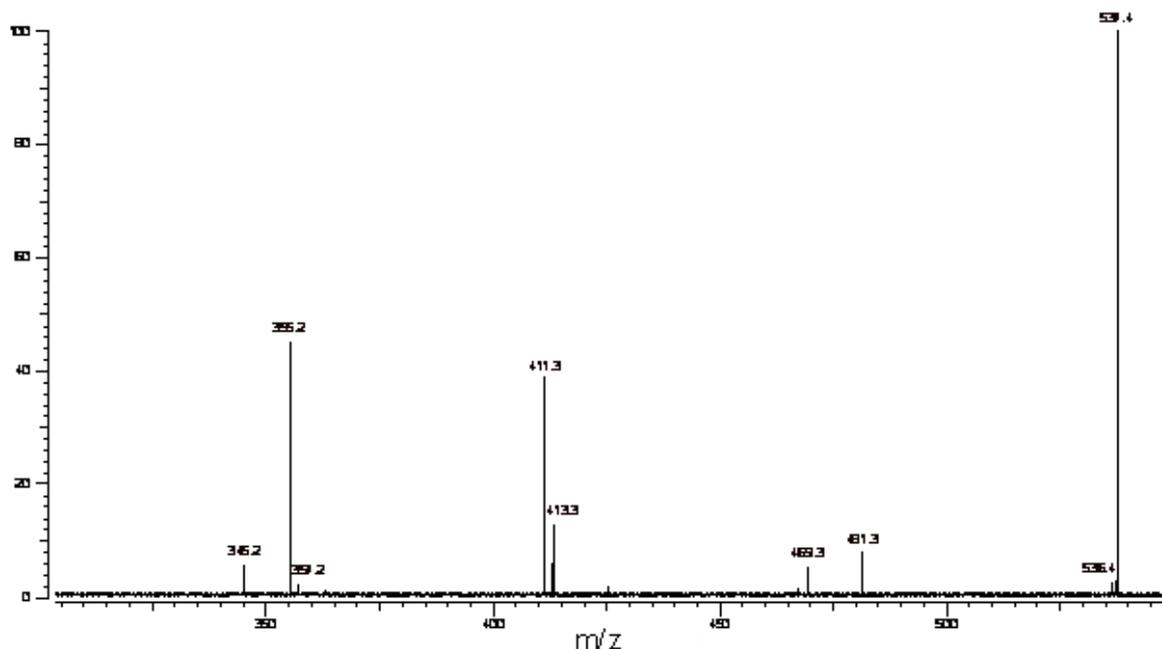


Figure V. 18 : Spectre de fragmentation SORI-CID de l'ion protoné (m/z 537,4) de l'hyperforine en mode de détection **positif**

II. B. Les flavonoïdes

Dans un premier temps, notre objectif a été d'analyser des flavonoïdes de référence afin de comprendre leur comportement lorsqu'ils sont soumis à une ionisation par électrospray.

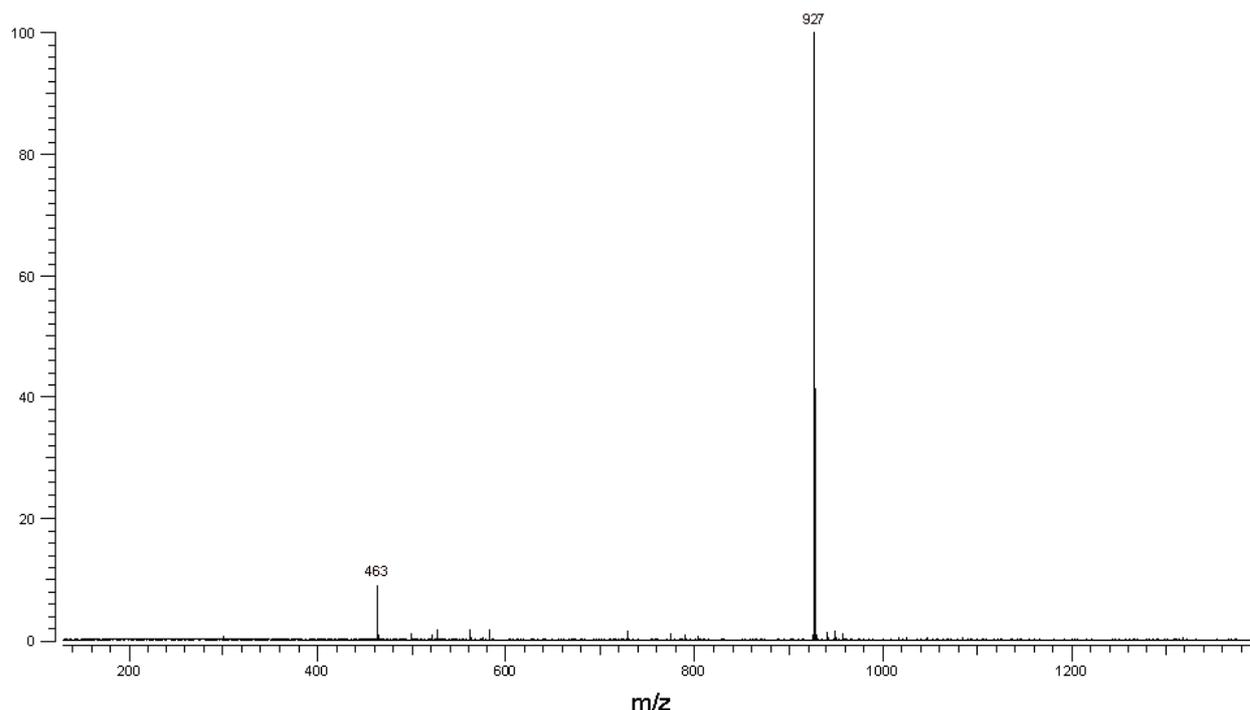


Figure V. 19 : Spectre ESI-FTICRMS obtenu en mode de détection **négatif** pour une solution méthanolique d'hypéroside à 10^{-6} M

Le spectre de masse présenté sur la Figure V. 19 correspond à l'analyse réalisée en mode négatif d'une solution méthanolique d'hypéroside à 10^{-6} M. On constate que l'ion correspondant au monomère à m/z 463 n'est pas majoritaire, mais qu'un ion dimérique à m/z 927 est préférentiellement formé. La présence sur le spectre de l'extrait de Millepertuis en mode négatif d'un pic à m/z 927 nous a conduits à réaliser une fragmentation sur ce pic, présentée sur la Figure V. 20. Nous avons bien retrouvé un fragment à m/z 463 correspondant à l'ion [Hypéroside - H]⁻, ainsi qu'un ion à m/z 301 correspondant à [Quercétine - H]⁻. Un raisonnement similaire appliqué au spectre de fragmentation de l'ion à m/z 1001 conduit à l'attribuer à un dimère non covalent [Hypéroside + Amentoflavone - H]⁻. Ce type d'oligomères a par ailleurs déjà été observé en phase gazeuse sur certains flavonoides, tels que l'apigénine⁶ ou la quercétine⁷. Quant à l'ion à m/z 1153, il correspond à un dimère cette fois covalent de procyanidine B2 (m/z 577).

⁶ Croley, T. R., *et al.*, *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, 2000, **14**, p 1494

⁷ Croley, T. R., *et al.*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2000, **14**, 23, p 2154

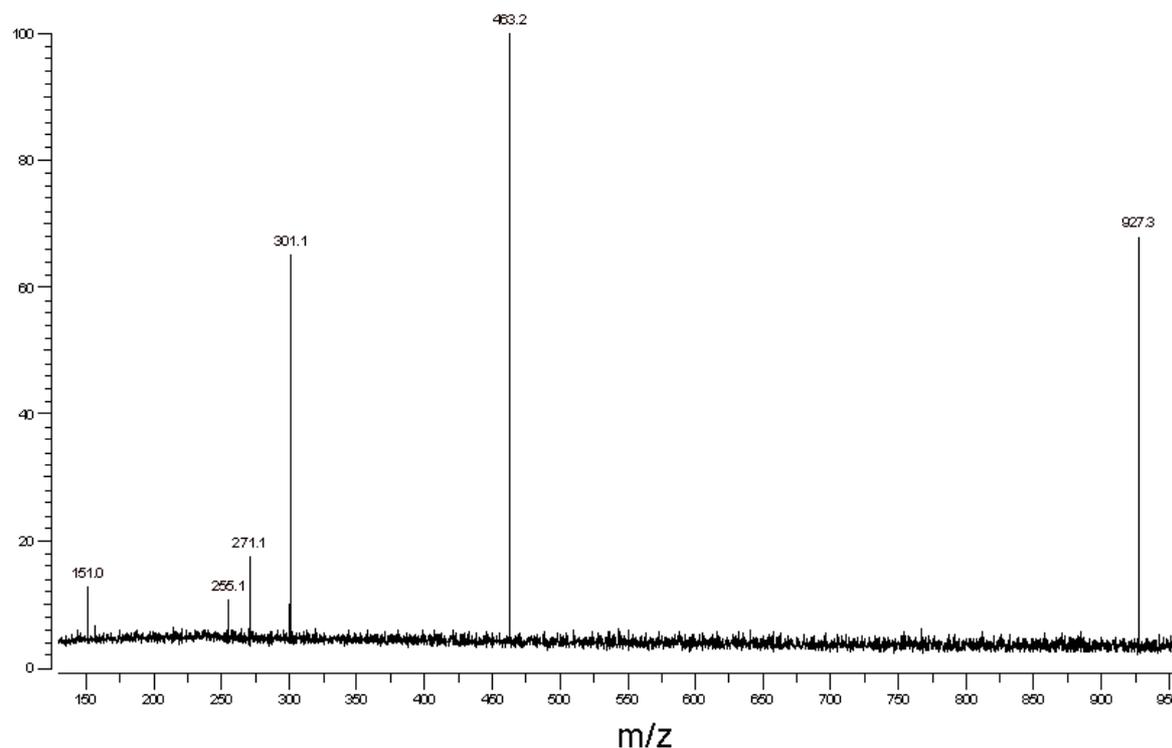


Figure V. 20 : Spectre de fragmentation MS² SORI-CID obtenu pour l'ion à m/z 927 présent sur le spectre ESIFTICRMS de l'extrait de Millepertuis en mode de détection **négalif**

II. C. Les lipides

Les formules brutes calculées pour les signaux observés en mode de détection positif sur l'extrait méthanolique de Millepertuis dans la gamme de masse située entre 900 et 1000 montrent que ces composés présentent des indices d'insaturation très faibles pour cette gamme de masse indiquant, si comme nous l'avons supposé ils ne sont constitués que de carbone, d'hydrogène et d'oxygène, la présence possible de chaîne(s) hydrocarbonée(s) peu insaturée(s). Ces composés sont donc probablement de la famille des lipides, et, ne se présentant pas sous la forme de massifs de type M, [M+2], [M+4] ..., ne sont pas des phospholipides. Nous nous sommes dans un premier temps intéressés au pic le plus intense à m/z 959 ; les formules brutes possibles pour cet ion sont C₄₈H₈₈O₁₆K⁺ (5 insaturations) et C₅₁H₈₄O₁₅Na⁺ (10 insaturations), la seconde étant privilégiée compte tenu de la présence à m/z 937 d'ion de formule brute C₅₁H₈₅O₁₅Na⁺.

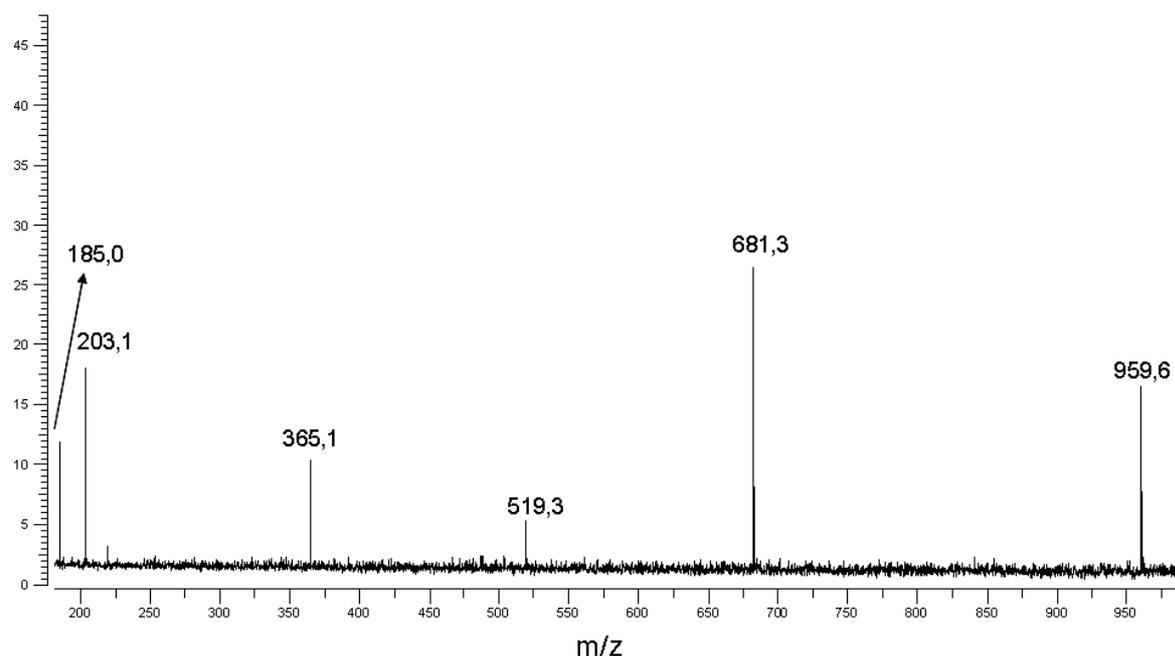


Figure V. 21 : Spectre de fragmentation MS² IRMPD du pic observé à m/z 959 sur les extraits de Millepertuis en mode de détection **positif** (100ms à 100%)

Le spectre de fragmentation IRMPD de l'ion à m/z 959 est présenté sur la Figure V. 21. Le fragment à m/z 365 est attribuable à un diglycoside, d'autant qu'on observe également un fragment à m/z 203 correspondant à l'adduit sodique d'un sucre. La différence de masse observée entre l'ion parent et son fragment à m/z 681 correspond à la perte de C₁₈H₃₀O₂, soit une molécules d'acide linoléique. On n'observe pas d'autre perte de chaîne carbonée depuis l'ion parent, ce qui indique que s'il y a bien une autre chaîne, soit c'est également de l'acide linoléique, soit cette chaîne est moins facilement éjectée de la molécule. Il a été démontré en LC-APCI-MS que dans le cas de la fragmentation des triacylglycérols, plus les chaînes latérales sont insaturées, moins elles sont éjectées facilement par la molécule⁸. Or, dans notre cas, compte tenu de l'indice d'insaturation de la molécule, la présence d'une deuxième chaîne plus insaturée n'est pas envisageable, et ce lipide contient probablement deux chaînes d'acide linoléique. Une proposition de structure de type digalactosyldiacylglycerol et un mécanisme de fragmentation sont présentés sur la Figure V. 22. Cette attribution est confortée par le fait que les lipides les plus abondants dans les tissus photosynthétiques sont des mono- et di-galactosyldiacylglycérols, avec en grande majorité des chaînes latérales de type 18 :3⁹; ceci permet également d'attribuer la pic observé sur l'extrait à m/z 797 au

⁸ Byrdwell, W. C., Emken, E. A., *Lipids*, 1995, **30**, 2, p 173

⁹ Browse, J., et al., *Biochemistry Journal*, 1986, **235**, p 25

monogalactosyl-dilinoléylglycérol associé. La précision en masse permet d'affirmer que la différence de masse observée entre l'ion à m/z 959 et celui à m/z 975 (ainsi qu'entre ceux à 797 et 813) correspond à un oxygène ; la présence de formes oxydées de mono- et digalactosyldiacylglycérol peut correspondre à une oxydation post-extraction, déjà observée par d'autres équipes¹⁰.

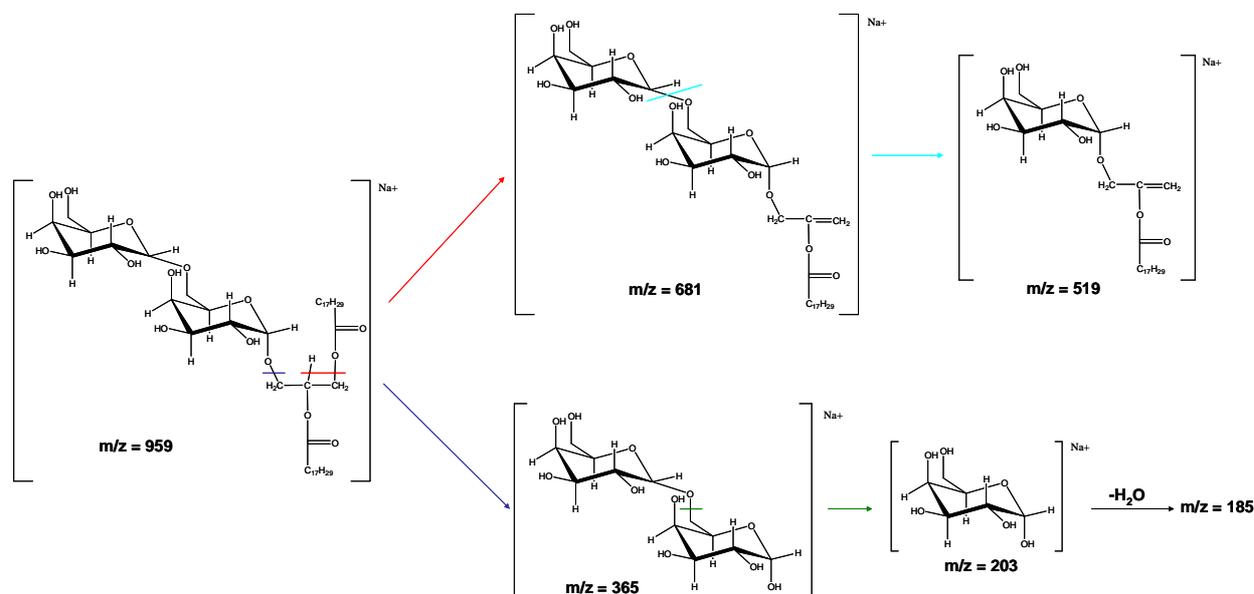


Figure V. 22 : Schéma de fragmentation proposé pour le diglycoside-diacylglycérol à m/z 959

La formule brute calculée pour l'ion m/z 338, $C_{22}H_{44}NO^+$, indique que cet ion contient uniquement deux insaturations ; cette longue chaîne azotée pourrait provenir d'une structure de type sphingolipidique ; les sphingolipides sont une classe de lipides complexes contenant des acides gras liés via une liaison amine à une base à longue chaîne. L'ion m/z 338 pourrait être issu des sphingolipides les plus simples, comme par exemple la sphingosine et ses dérivés, qui sont en général plus hydroxylés que l'ion que nous avons détecté mais qui peuvent être sujets à des pertes de motifs H_2O ¹¹ ; cependant la longueur de chaîne de ces composés est en général de 18 carbones dans les organismes végétaux¹². L'ion à m/z pourrait donc provenir de sphingolipides plus élaborés, par exemple les céramides (structure générale présentée sur la Figure V. 23), qui se fragmenteraient en milieu acide. Compte-tenu de la complexité de ces composés, il est difficile de se prononcer sur l'origine de cet ion ; la longueur de la chaîne aliphatique est compatible avec celles généralement observées pour cette catégorie de lipides qui sont constitués d'acide gras plus longs que dans le cas des phospholipides par exemple.

¹⁰ Deschamps, F. S., et al., *Journal of Separation Sciences*, 2004, **27**, p 1313

¹¹ Lieser, B., et al., *Journal of Lipid Research*, 2003, **44**, p 2209

¹² Lynch, D. V., Dunn, T., *New Phytologist*, 2004, **161**, p 677

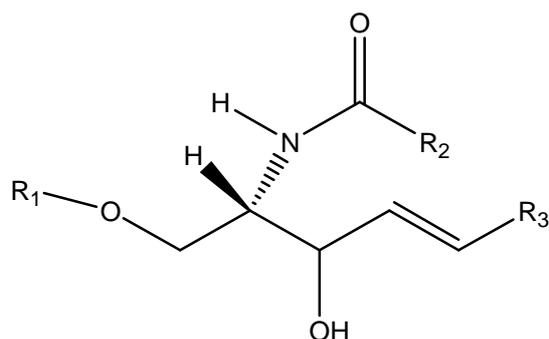


Figure V. 23 : Structure générale des céramides

II. D. Les naphtodianthrones

Cette partie traite de la caractérisation par MSⁿ des dérivés de l'hypéricine, également appelés naphtodianthrones. L'objectif de ces expériences de fragmentation est différent de celles présentées précédemment, puisqu'à cette étape de l'étude la très grande majorité des pics détectés sur les extraits de Millepertuis ont pu être identifiés. La caractérisation des hypéricines vise donc à préciser et à comprendre leurs mécanismes de fragmentation, et à mettre en avant les différences qui permettront d'une part de confirmer les attributions faites sur les extraits, d'autre part de se donner les moyens de détecter éventuellement des photomodifications de ces composés dans la suite de l'étude.

Les naphtodianthrones ont rarement fait l'objet d'études par spectrométrie de masse en tandem. Il n'existe pas dans les bases de données de spectre de masse en impact électronique pour ces composés, dont la vaporisation nécessite des températures trop élevées pour les sources à impact électronique conventionnelles. De plus, dans les cas rares qui ont pu conduire à l'étude de l'hypéricine par Désorption de Champs (Field Desorption Mass Spectrometry), l'ionisation conduit à un ion pseudomoléculaire à m/z 504 mais pas de fragments caractéristiques qui puissent permettre une identification sans ambiguïté du composé.

En revanche la fragmentation des naphtodianthrones a été décrite en 1997 par Piperopoulos et al.¹³, qui ont réalisé des expériences de CID (Collision Induced Dissociation) et émis des hypothèses concernant les pertes de neutres subies par ces molécules. Il existe également des données en ESI-MS² sur certaines anthraquinones, présentées dans le Tableau V. 5.

¹³ Piperopoulos, G., et al., *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 1997, **695**, 2, p 309

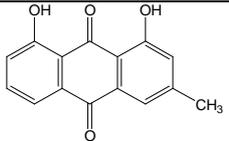
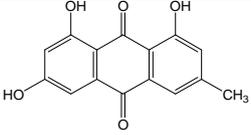
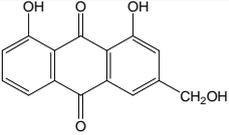
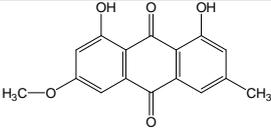
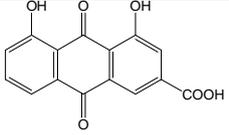
Molécule	Pertes de neutres observées
	- CO
	-CO -OH
	-CHO
	-CH ₃ -CO
	-C ₂ H ₂ -CO ₂

Tableau V. 5 : Pertes de neutres observées en ESI-MS/MS (mode **néga**tif) sur certaines anthraquinones¹⁴

Afin de préciser le comportement de ces composés, nous avons réalisé des expériences de fragmentation par SORI-CID et IRMPD. Les conditions d'analyse ont été optimisées afin d'obtenir une précision en masse permettant la détermination des formules brutes des fragments détectés. La calibration a été réalisée avec l'ion pseudomoléculaire de la molécule d'intérêt. L'irradiation laser a été réalisée à 100% de la puissance maximum et pendant une durée de 6 secondes. Pour chaque spectre de fragmentation présenté ici, un tableau regroupant les masses théoriques, expérimentales, et l'erreur calculée en ppm est présenté en Annexe.

II. D. 1. L'hypéricine

Le spectre de fragmentation obtenu en IRMPD pour une solution méthanolique d'hypéricine à 10⁻⁶M est présenté sur la Figure V. 24, et le Tableau V. 6 compare nos résultats à ceux de Piperopoulos et al. Chaque spectre présenté dans cette partie correspond à la fragmentation du pic monoisotopique uniquement.

¹⁴ Ye, M., et al., *American Society for Mass Spectrometry*, 2006, **18**, p 82

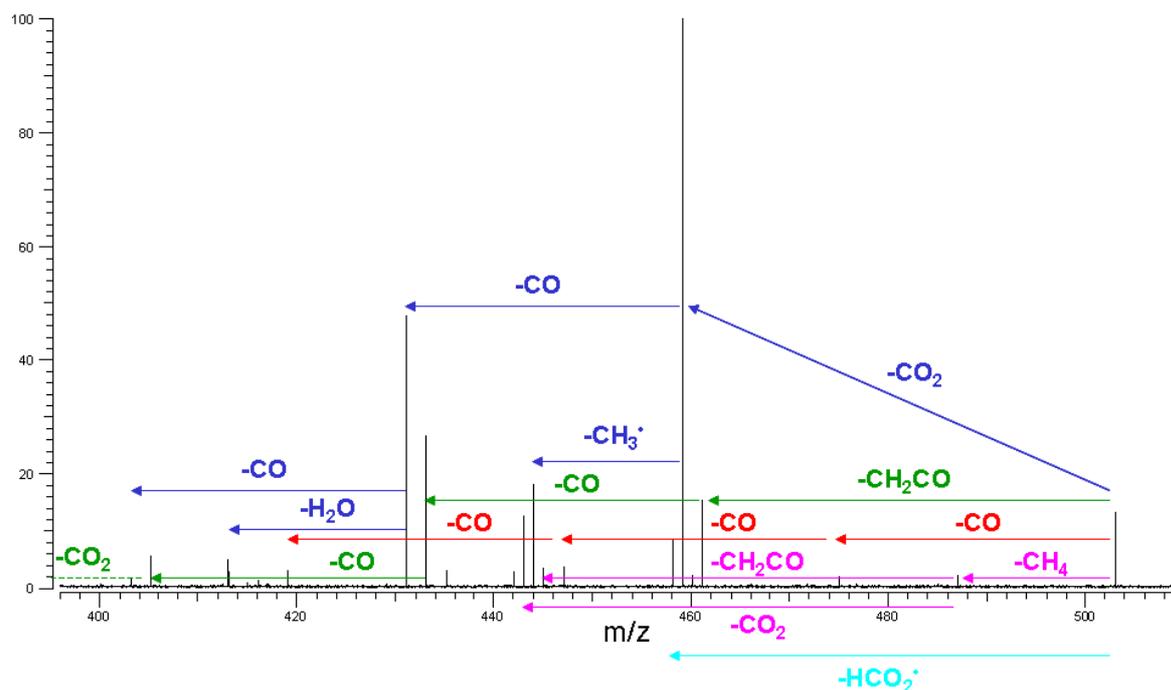


Figure V. 24 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'ion m/z 503 (analyse d'une solution méthanolique d'hypericine à 10⁻⁶M) en mode de détection **négatif**

Les voies de fragmentation indiquées sur le spectre ont été déterminées grâce à des expériences de MS³ et MS⁴, présentées à titre d'exemple pour le cas de l'hypericine sur la Figure V. 25. Les séquences de MS³ ont été acquises selon le schéma IRMPD-IRMPD ; en revanche dans le cas de la MS⁴, certains spectres ont été obtenus avec des séquences SORI-CID-IRMPD-IRMPD, car nous avons constaté que certains ions avaient une durée de vie trop limitée pour des séquences IRMPD-IRMPD-IRMPD ; l'étape de fragmentation en SORI-CID ne dure que 250 ms contre plusieurs secondes en IRMPD, ce qui nous a permis de réduire la durée d'acquisition ; cependant, la technique d'activation SORI-CID ne nous a permis d'obtenir que des pertes d'un seul neutre et n'a pu être utilisé que pour la première étape de la MS⁴.

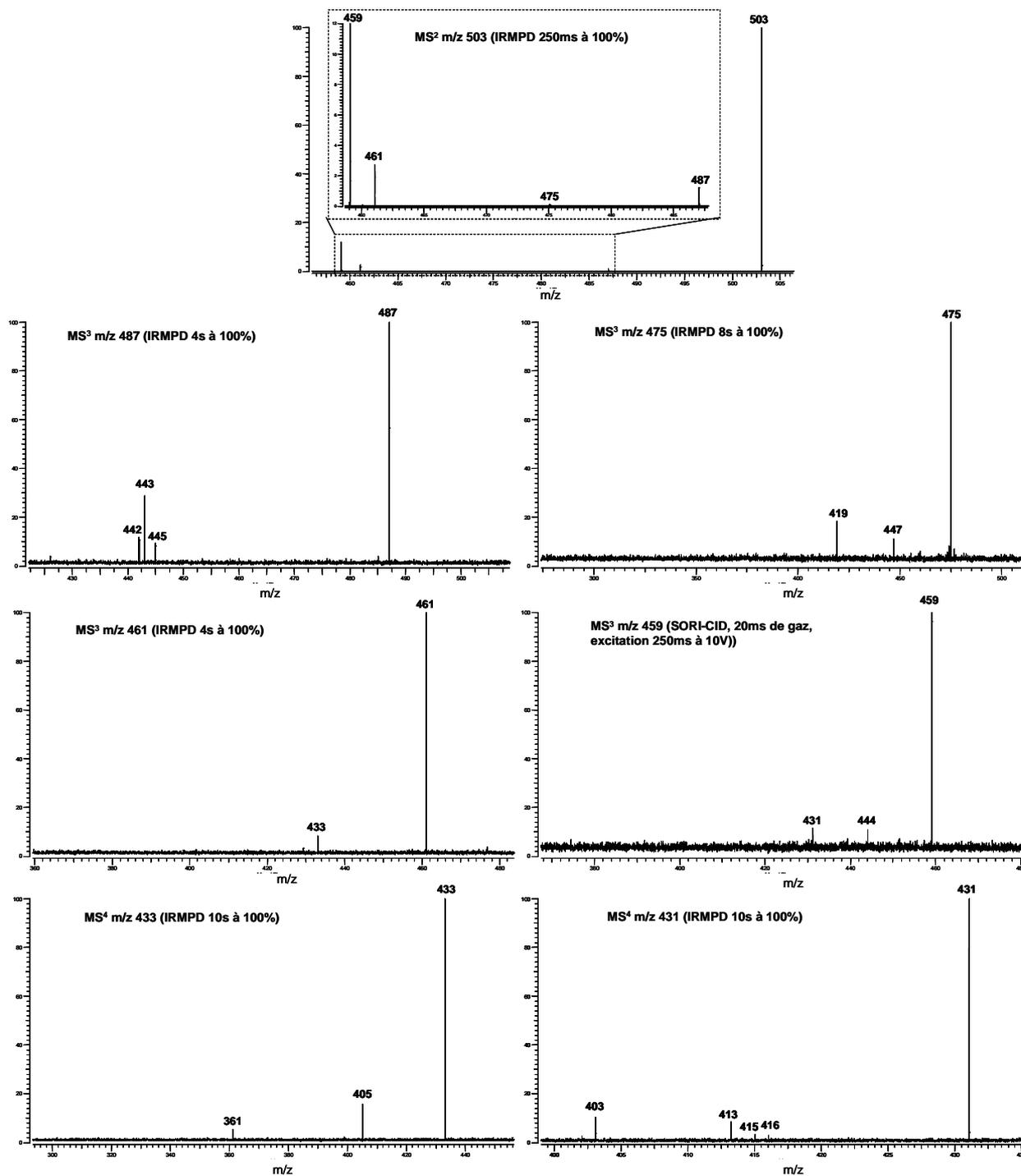


Figure V. 25 : Experiences de MS^3 et MS^4 réalisées sur la molécule d'hypericine dans le but d'en préciser les voies de fragmentation

La combinaison de la haute résolution et des techniques de fragmentation permet aisément de caractériser les fragments obtenus. Nous avons ainsi pu déterminer que le fragment à m/z 443 correspond à la perte successive de CH_4 et de CO_2 puisque la MS^3 révèle que ce fragment est issu de celui à m/z 487. Quant au fragment à m/z 419, la précision en masse

que nous avons obtenue, inférieure au ppm, permet d'affirmer qu'il correspond à une perte de 3 atomes de carbone et 3 atomes d'oxygène par rapport à l'ion pseudomoléculaire. Il est également à noter que nous avons obtenu un plus grand nombre de fragments, ceci étant probablement dû à l'utilisation de l'IRMPD, qui peut permettre d'obtenir des empreintes spectrales plus spécifiques aux composés.

m/z	HPLC-ESI-MS	HR-MS + MS ³ ou MS ⁴
503	[M-H] ⁻	[M-H] ⁻
487	[M-H-(CH ₄)] ⁻	[M-H-(CH ₄)] ⁻
458	[M-H-(CO ₂)] ⁻	[M-H-(CO ₂)] ⁻
443	[M-H-(CH ₂ =C=O)-(H ₂ O)] ⁻	[M-H-(CH ₄)-(CO ₂)] ⁻
433	[M-H-(CH ₂ =C=O)-(CO)] ⁻	[M-H-(CH ₂ =C=O)-(CO)] ⁻
431	[M-H-(CO ₂)-(CO)] ⁻	[M-H-(CO ₂)-(CO)] ⁻
419	[M-H-2(CH ₂ =C=O)] ⁻	[M-H-3(CO)] ⁻
405	[M-H-(CH ₂ =C=O)-2(CO)] ⁻	[M-H-(CH ₂ =C=O)-2(CO)] ⁻
387	[M-H-(CH ₂ =C=O)-2(CO)-(H ₂ O)] ⁻	Non détecté
361	[M-H-(CH ₂ =C=O)-(CO ₂)-2(CO)] ⁻	[M-H-(CH ₂ =C=O)-(CO ₂)-2(CO)] ⁻

Tableau V. 6 : Apport de la spectrométrie de masse très haute résolution et de la MS³ pour l'identification des fragments de l'hypéricine

Certains des mécanismes de fragmentation engagés pour ces pertes de neutres ont été avancés par Piperopoulos et al.. Cependant, les fragments obtenus ne nous ont pas toujours semblé être les plus stables, et nous avons trouvé judicieux de les repréciser ici.

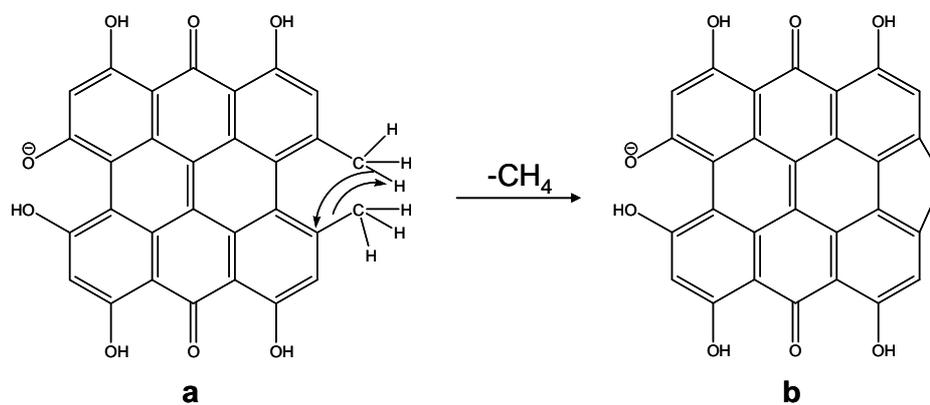


Figure V. 26 : Mécanisme de perte de CH₄ pour la molécule d'hypéricine **a**

La perte de méthane résulte d'un mécanisme favorisé par la grande stabilité de la molécule neutre éjectée, et conduit à la forme cyclisée **b** présentée sur la Figure V. 26.

La perte d'un groupement CO peut intervenir sur la fonction C=O de la quinone, ou sur les énols lorsque l'équilibre se déplace vers la forme cétone. Si cette perte est peu marquée sur l'ion pseudomoléculaire de l'hypéricine, elle intervient aisément après la perte d'un groupement CO₂. La perte de CO₂ conduit en effet au fragment majoritaire sur le spectre IRMPD de l'hypéricine ; cependant le mécanisme n'en est pas évident puisqu'aucun des atomes de carbones de la molécule n'est adjacent à deux atomes d'oxygène, et fait probablement intervenir un réarrangement.

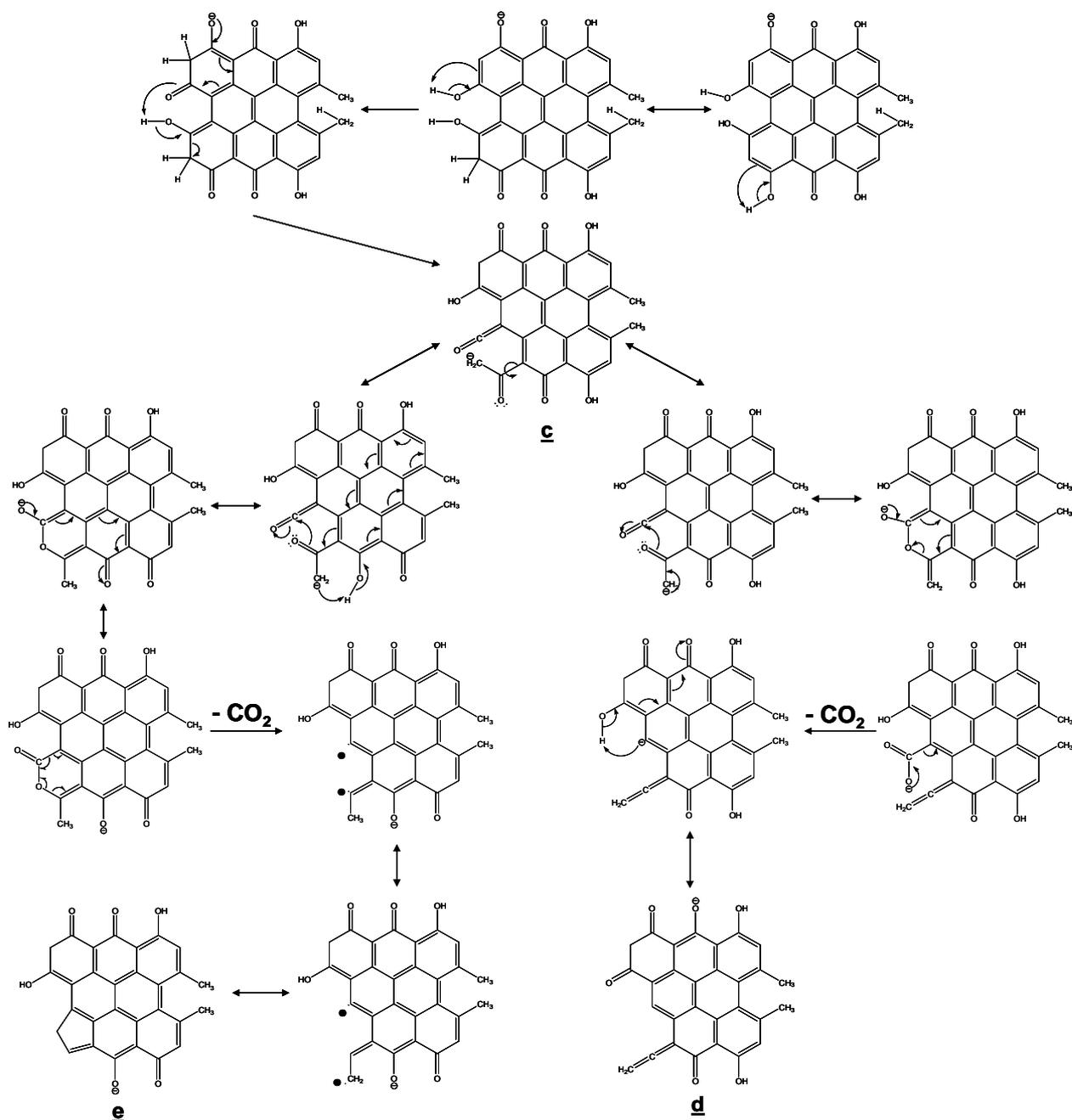


Figure V. 27 : Mécanismes proposés pour la perte de CO₂

Dans leurs travaux, Piperopoulos et al., s'ils n'ont pas précisé le mécanisme de perte de CO₂ par l'hypéricine, ont mentionné ceux de Flechtner et al.¹⁵ sur la fragmentation des anions méthylhydroxyphénoxides, que nous avons déjà abordé au cours de ce Chapitre concernant la fragmentation de l'hyperforine. Cette voie, présentée sur la Figure V. 27 (partie de droite) appliquée à la molécule d'hypéricine, devrait conduire à la formation d'une fonction allénique (ion **d**). Or, l'ion résultant de la perte de CO₂ dans l'article de Piperopoulos et al. ne présente pas de fonction allénique mais résulte de la formation d'un cycle à 5 atomes de carbones. Ce mécanisme ne nous ayant pas paru évident, nous avons jugé utile de le repréciser ici. La première voie que nous avons explorée débute, une fois le cycle ouvert, par la capture d'un proton voisin par le groupement -CH₂⁻, parallèlement à l'attaque nucléophile par le doublet de l'oxygène précédemment décrite. La réouverture par ruptures homolytiques du cycle nouvellement formé permet l'éjection d'une molécule de CO₂, et le réarrangement d'un des radicaux vers une forme plus stable permet ensuite de refermer le cycle à 5 carbones ; on constate alors que dans ce cas, la molécule finale **e** a perdu de l'aromaticité.

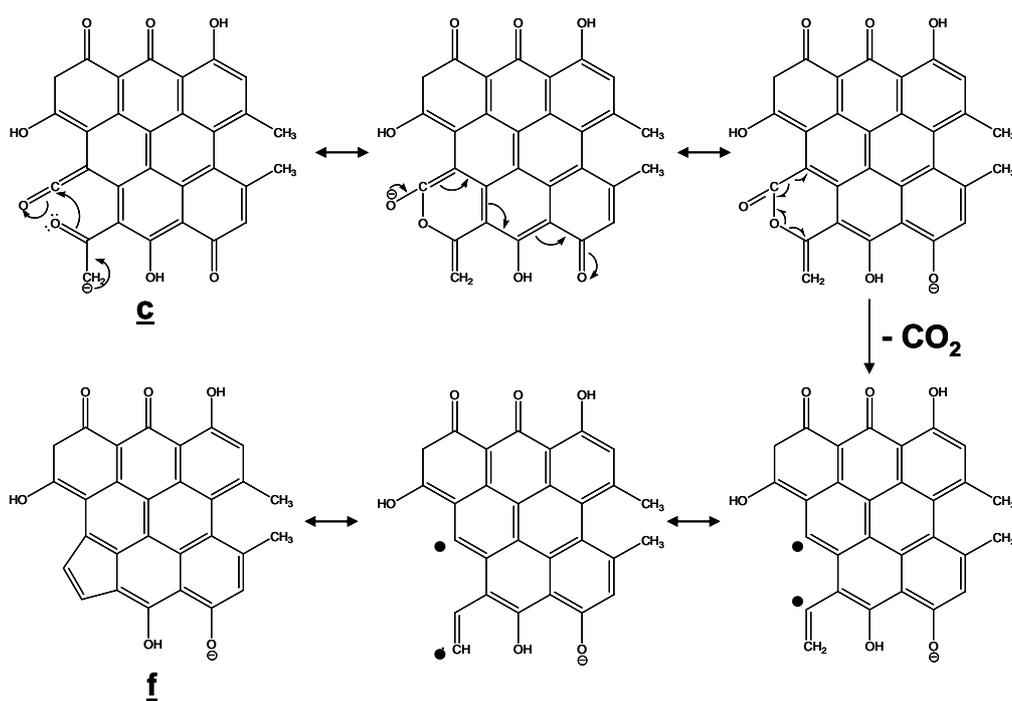


Figure V. 28 : Mécanisme le plus probable pour la perte de CO₂

Une autre alternative consiste, une fois le cycle initial ouvert, à rabattre la charge négative et à poursuivre le mécanisme précédemment décrit. On aura ici aussi réarrangement d'un des

¹⁵ Fletcher, T. W., et al., *Journal of Mass Spectrometry*, 1996, **31**, p 377

radicaux vers une forme plus stable, comme le montre la Figure V. 28, mais cette légère modification du début du mécanisme permet au final d'obtenir un ion (**f**) avec un fort degré de conjugaison, donc fortement stabilisé ; au final ce mécanisme semble être le plus probable.

La molécule d'hypéricine est également soumise à des pertes de motifs cétène et H₂O ; bien que la perte d'eau n'intervienne pas sur l'ion pseudomoléculaire mais à la suite d'autres fragmentations pour cette molécule, nous allons en décrire ici le mécanisme car ces deux voies de fragmentation sont liées. Elles débutent en effet par l'ouverture d'un cycle, comme le montre la Figure V. 29. Dans le cas de la perte d'eau, le sens d'ouverture a peu d'influence sur la faisabilité du mécanisme. Celui-ci génère la formation d'une triple liaison au lieu du benzyne précédemment avancé, qui présentait un manque de stabilité. La localisation de la perte d'eau sur cette partie de la molécule est cohérente avec les fragments obtenus pour l'hypéricine, puisque cette perte d'eau n'est jamais consécutive à deux pertes de CO₂ ou de CH₂=C=O. Dans le cas de la perte de groupement cétène, le sens d'ouverture du cycle influe sur la structure de l'ion obtenu. Le mécanisme présenté permet la stabilisation de la charge négative par capture d'un proton voisin, tandis que l'ouverture du cycle dans l'autre sens induirait la formation d'un cycle à 4 atomes de carbone très tendu.

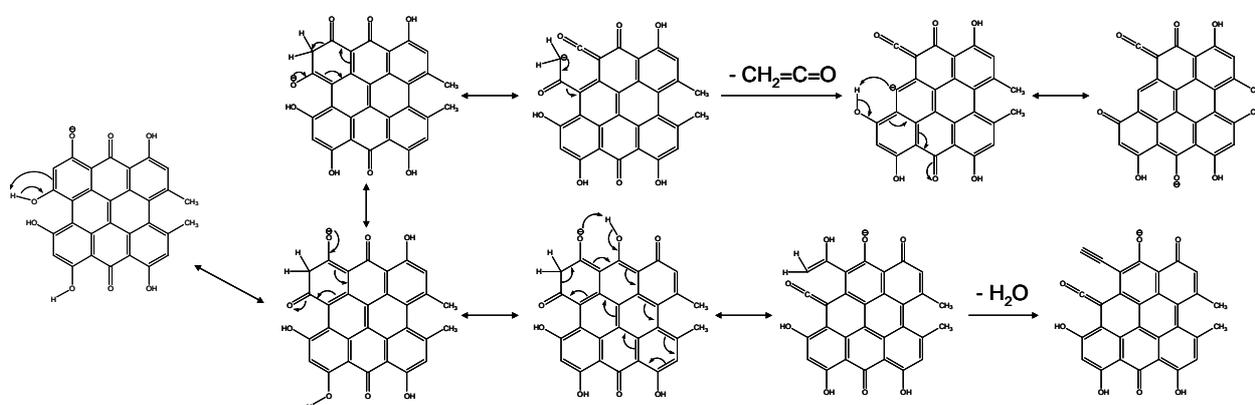


Figure V. 29 : Mécanismes de perte de CH₂=C=O et H₂O

II. D. 2. La pseudohypéricine

Dans un second temps nous avons réalisé le spectre de fragmentation IRMPD de la pseudohypéricine (**g**) ; l'objectif est d'une part de comparer les propriétés de ce composé à celles de l'hypéricine, et d'autre part de déterminer si la spectrométrie de masse permet de différencier ce composé de son produit de dégradation en milieu basique,

l'isopseudohypéricine (**h**), qui présente la même formule brute (Figure V. 30), sans avoir recours à la chromatographie en phase liquide.

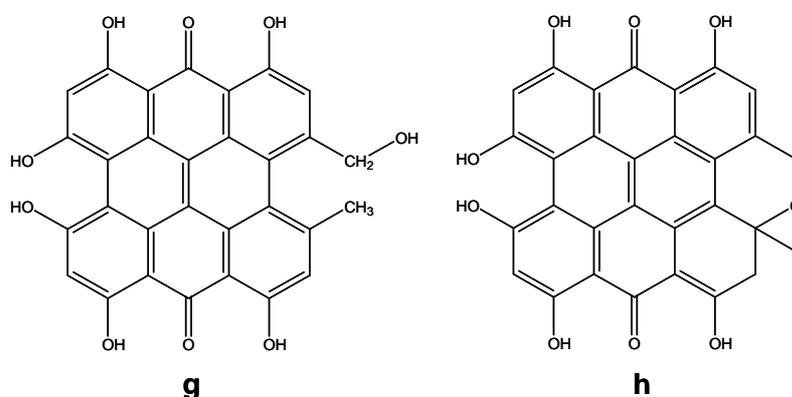


Figure V. 30 : Structures de la pseudohypéricine (**g**) et de l'isopseudohypéricine (**h**)

L'empreinte spectrale obtenue en MS² pour la pseudohypéricine, présentée sur la Figure V. 31, est sensiblement différente de celle obtenue pour l'hypéricine. Si l'ion correspondant à la perte de CO₂ semble également y être majoritaire, l'examen minutieux du spectre révèle la présence d'ions isobares à m/z 475, l'un, majoritaire correspondant à [M-CH₄-CO-H]-, l'autre, minoritaire, correspondant à [M-CO₂-H]- (agrandissement présenté sur la Figure V. 32).

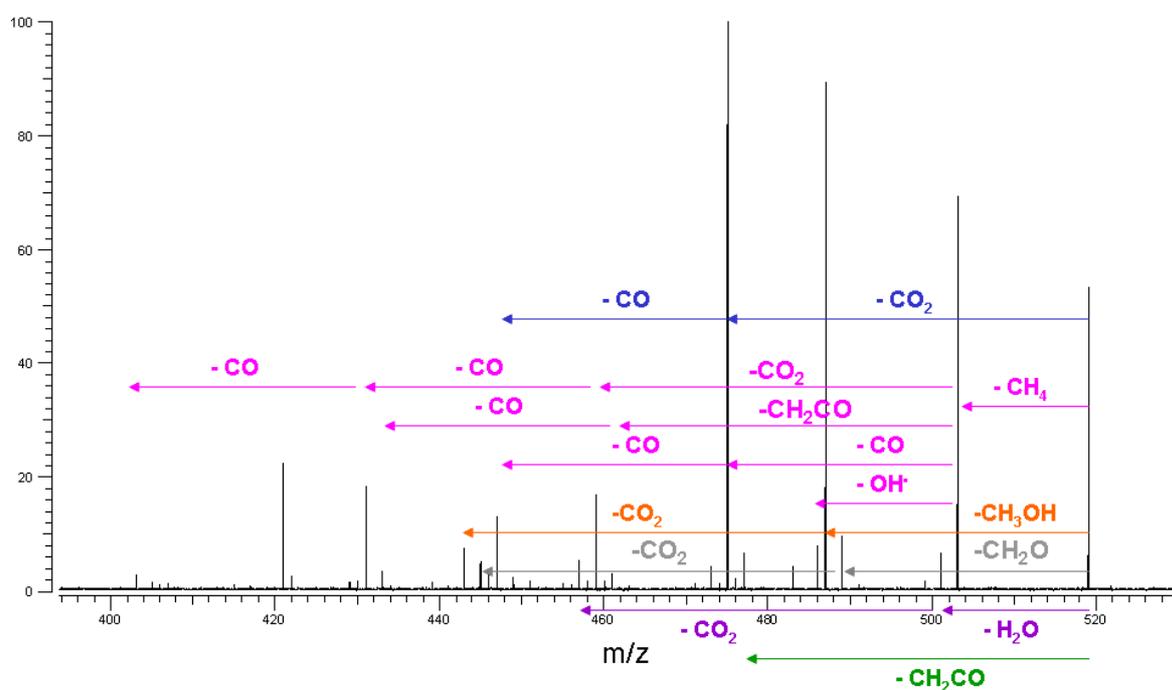


Figure V. 31 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'ion à m/z 519 (analyse d'une solution méthanolique de pseudohypéricine à 10⁻⁶M) en mode de détection **négatif**

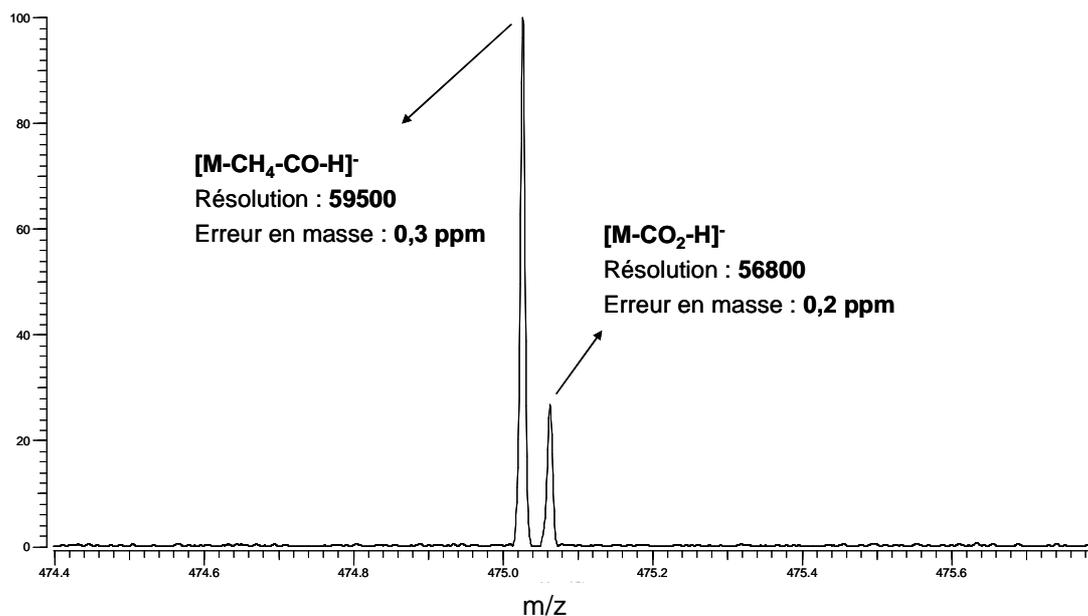


Figure V. 32 : Fragments isobares présents à m/z 475 sur le spectre MS² de la pseudohypéricine

On constate également que la perte de méthane semble favorisée sur cette molécule. Apparaissent comme attendu les pertes de CH₃OH et CH₂O, en raison de la présence d'un substituant -CH₂OH sur la molécule de pseudohypéricine. Des hypothèses de mécanisme pour ces fragmentations sont proposées sur la Figure V. 33 ; il est à noter que la déprotonation de la pseudohypéricine n'intervient pas sur le même hydroxyle que l'hypéricine, comme cela a été démontré par Falk et al¹⁶.

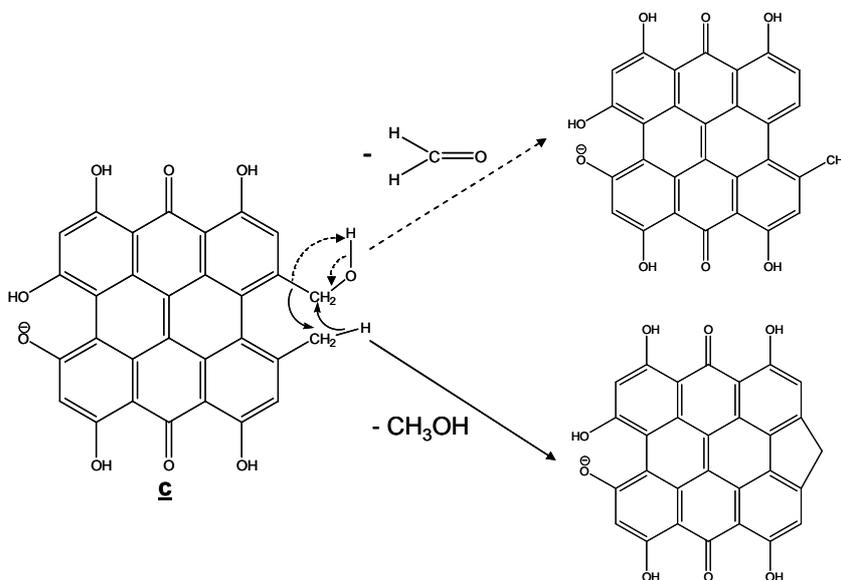


Figure V. 33 : Propositions de structures pour les ions résultant des pertes de CH₃OH et CH₂O

¹⁶ Falk, H., et al., *Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly*, 1992, **123**, 3, p 277

La perte de méthane pourrait être plus marquée dans le cas de la pseudohypéricine car elle ne serait alors plus seulement favorisée par la stabilité du neutre éjecté, mais également par l'acidité du proton de la fonction hydroxyle et la stabilisation du fragment obtenu **j** par la formation d'un cycle à 6 chaînons contenant l'atome d'oxygène (Figure V. 34). Cependant il est apparu que consécutivement à la perte de CH₄, la molécule de pseudohypéricine subissait majoritairement une perte de CO. Or, cette perte de CO n'a été obtenue ni dans le cas de l'hypéricine (que ce soit sur le spectre de MS² ou le spectre de MS³ de l'ion [M-CH₄-H]⁺), ni dans le cas de la pseudohypéricine après la perte de CH₃OH. Ces éléments laisseraient à penser que l'oxygène du substituant -CH₂OH de la pseudohypéricine serait engagé dans cette perte de CO, puisque lorsqu'il est absent (molécule d'hypéricine), ou lorsqu'il a disparu (molécule de pseudohypéricine ayant perdu un CH₃OH), la perte de CO n'est pas observée. Finalement la perte de CH₄ sur la molécule de pseudohypéricine pourrait engager, non pas le proton acide de l'hydroxyle, mais le proton le plus proche du substituant CH₃, conduisant à la structure **j**, qui permettrait par la suite l'expulsion de CO. La présence sur le spectre MS³ de l'ion à 503 ([M-CH₄-H]⁺) du fragment à m/z 486 semble indiquer qu'une perte d'OH[•] est possible après la perte de CH₄. Or, la perte d'un radical hydroxyle d'un phénol est peu probable puisqu'elle conduirait à un excès de charge négative sur le carbone correspondant ; en revanche, ceci appuie l'existence de la structure **j**, qui pourrait permettre la formation d'un radical stabilisé par mésomérie suite à la perte de OH[•].

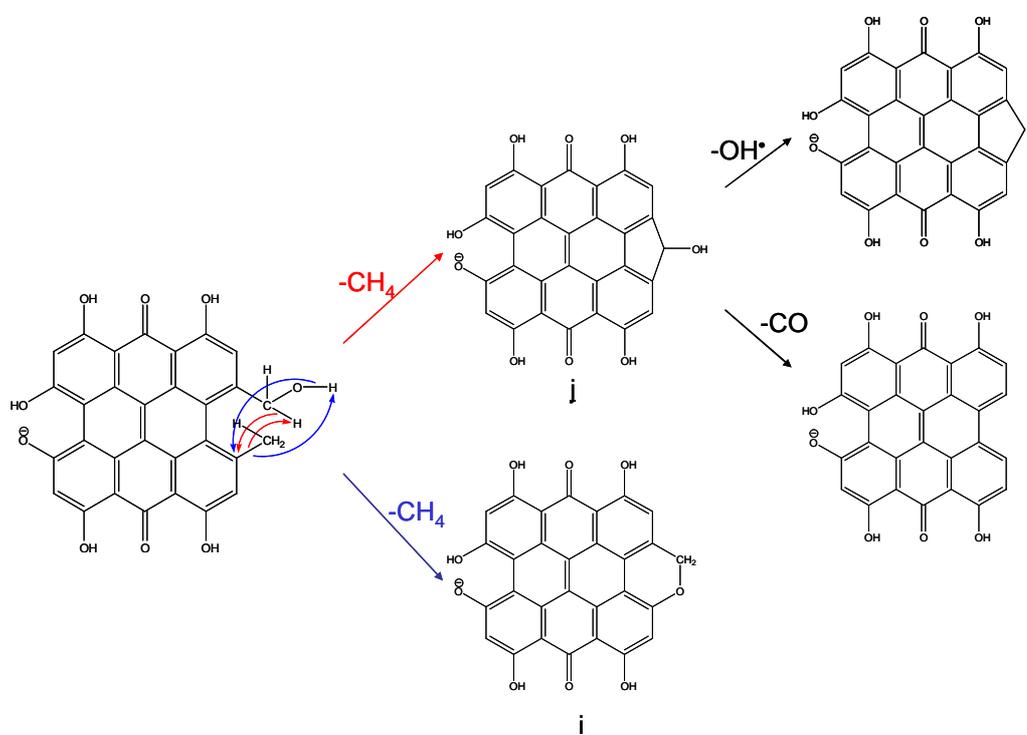


Figure V. 34 : Proposition de structure pour l'ion résultant de la perte de CH₄ par la pseudohypéricine

II. D. 3. L'isopseudohypéricine

La fragmentation de l'hypéricine et de la pseudohypéricine a d'ores et déjà permis de mettre en évidence des différences marquées entre ces deux composés de structures pourtant proches. Ces données permettront par la suite de détecter d'éventuelles modifications de ces composés au cours du traitement photodynamique. Nous avons souhaité ici mettre à profit la technique IRMPD pour la différenciation de la pseudohypéricine et de l'isopseudohypéricine, composés présentant non seulement des structures assez proches, mais également des formules brutes similaires. L'isopseudohypéricine a été obtenue par traitement alcalin d'une solution de pseudohypéricine ; une solution méthanolique à 10^{-5} M a été utilisée afin d'observer le changement de couleur (passage du violet au vert) généré par l'addition de quelques gouttes d'ammoniaque à 38%. Dans le but d'obtenir une réaction totale, nous avons encore ajouté deux gouttes d'ammoniaque après le changement de couleur. Le spectre de fragmentation observé pour ce composé, dans les mêmes conditions que pour les composés précédent, est présenté sur la Figure V. 35. On n'observe alors plus l'ion parent, qui d'après nos expériences disparaît dès 4 secondes d'irradiation laser (les pertes de neutres indiquées en pointillés correspondent à des pertes subies depuis l'ion parent). Le spectre obtenu pour 2 secondes d'irradiation, présenté sur la Figure V. 36, indiquerait que l'ion parent de l'isopseudohypéricine subit massivement et spontanément une perte de méthane conduisant rapidement à sa disparition totale.

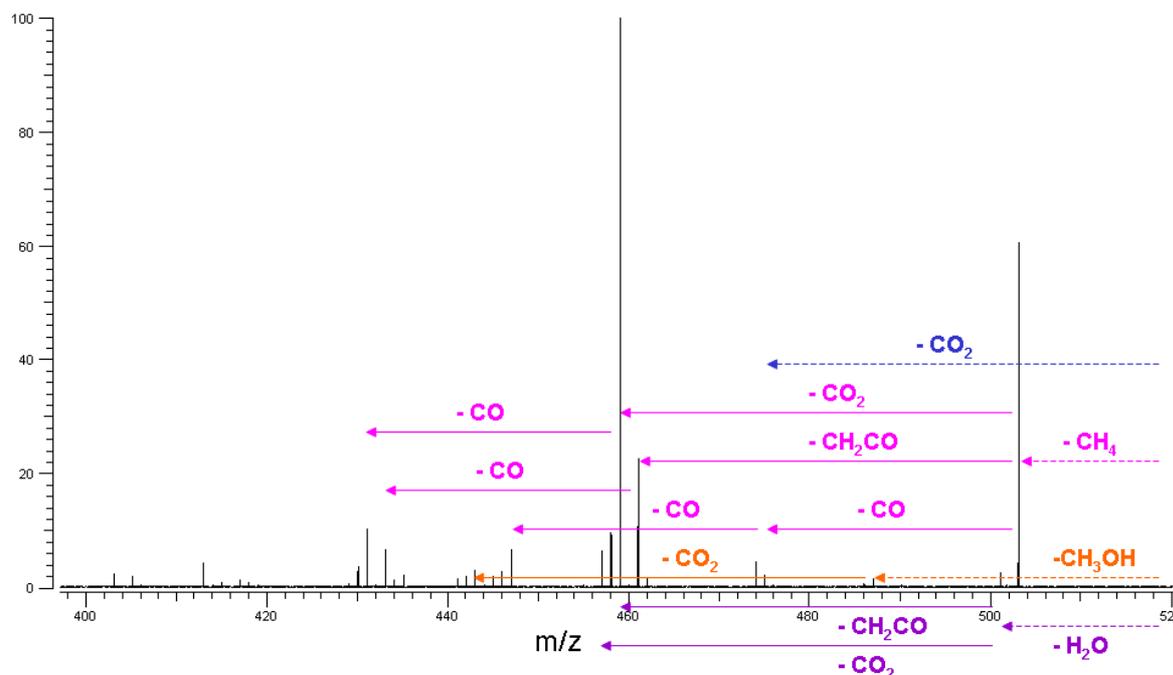


Figure V. 35 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'ion à m/z 519 correspondant à l'isopseudohypéricine (analyse d'une solution méthanolique de pseudohypéricine à 10^{-6} M basifiée par l'ammoniaque) en mode détection **négatif**

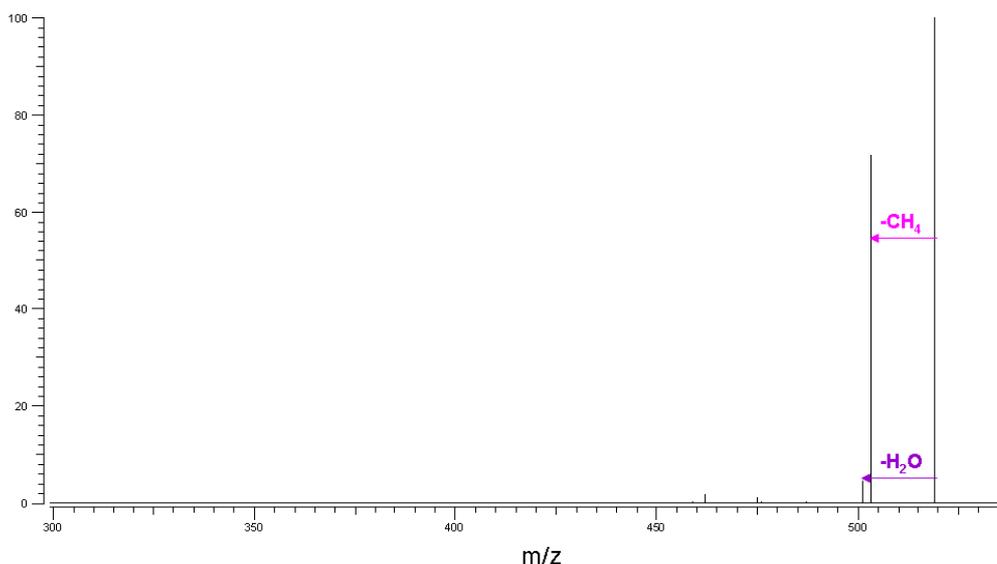


Figure V. 36 : Spectre de fragmentation IRMPD obtenu pour l'ion à m/z 519 (laser : 2 secondes à 100%) en mode détection **néгатif**

Le mécanisme présenté sur la Figure V. 37 met en évidence le fait que la perte de méthane permet à la molécule de retrouver son aromaticité et justifie de la stabilité de l'ion ainsi formé. Parallèlement à la perte de méthane, l'isopseudohypéricine subit de façon moins marquée la perte de molécules de méthanol et d'eau ; ces pertes s'expliquent difficilement pour cette molécule et sont probablement dues à la présence résiduelle d'une petite quantité de pseudohypéricine dans la solution, ou éventuellement à la réouverture du cycle oxygéné par interaction avec le laser. La perte directe de CO_2 par l'ion pseudomoléculaire est également faiblement observée. Une fois la molécule de méthane perdue, le spectre de fragmentation de l'isopseudohypéricine ressemble fortement à celui de l'hypéricine, avec une perte de CO_2 très majoritaire, et des combinaisons de pertes de neutres assez ressemblantes.

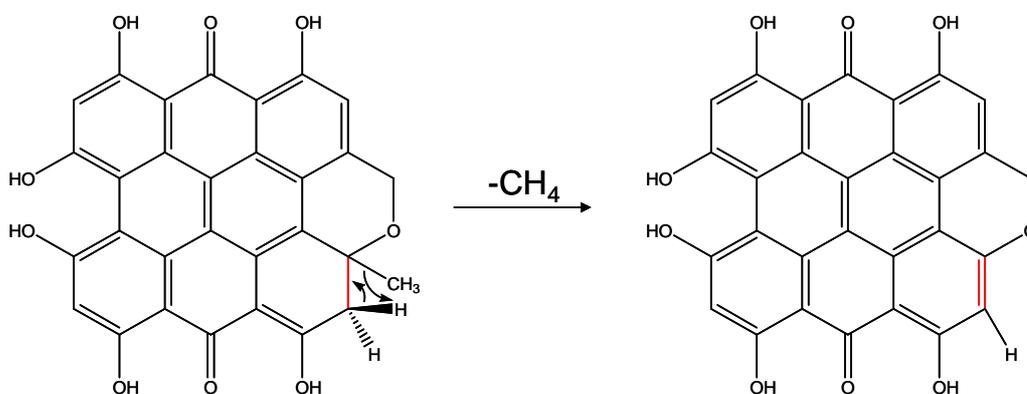


Figure V. 37 : Mécanisme de perte de méthane pour l'isopseudohypéricine

II. D. 4. La protohypéricine et la protopseudohypéricine

Afin d'être complets nous avons également réalisés les spectres de fragmentation de la protohypéricine (Figure V. 38) et de la protopseudohypéricine (Figure V. 39) selon la même procédure. L'analyse de ces pigments photosensibles a nécessité d'entourer la seringue d'injection de papier aluminium ; en revanche, la lumière parvenant dans la source électrospray n'a pas posé de problèmes de stabilité de ces molécules. La protopseudohypéricine n'étant pas disponible commercialement, son étude a nécessité la préparation d'un extrait contenant majoritairement des protopigments à partir de bourgeons de Millepertuis ; des précisions sur la composition de ces extraits seront données dans le Chapitre VI. L'extrait riche en protopigments a été normalisé à $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ en hypéricines (mesure faite en spectroscopie d'absorption UV-Visible après exposition à la lumière comme précisé dans le Chapitre III).

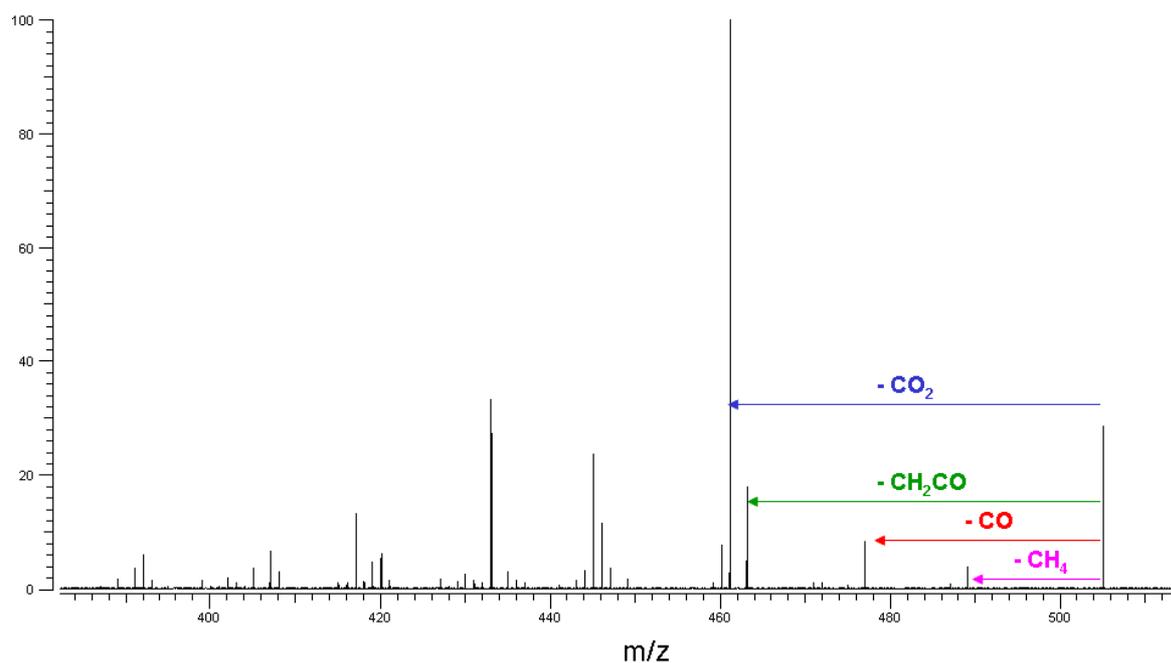


Figure V. 38 : Spectre de fragmentation IRMPD l'ion à m/z 505 (analyse d'une solution de protohypéricine à 10^{-6}M) en mode de détection **négatif**

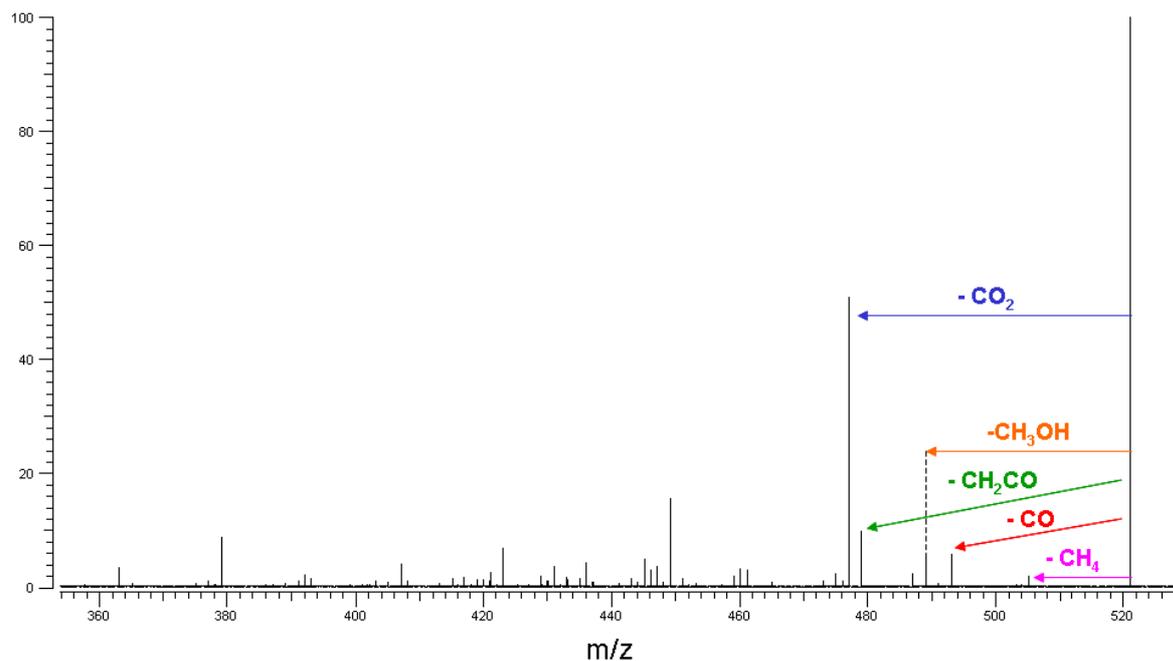


Figure V. 39 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'ion à m/z 521 (analyse d'un extrait de bourgeons normalisé à $5 \cdot 10^{-6} M$ en hypéricines totales) en mode détection **négatif**

L'empreinte spectrale obtenue pour ces deux composés est quasi similaire à celle de l'hypéricine, avec la perte de CO_2 majoritaire et diverses combinaisons de pertes de CO , CO_2 et $CH_2=C=O$. Si dans le cas de la protohypéricine, ces similitudes avec l'hypéricine s'expliquent aisément, on pourrait s'attendre à ce que le spectre de fragmentation de la protopseudohypéricine se rapproche plus de celui de la pseudohypéricine, notamment en ce qui concerne les pertes de méthane et de méthanol, assez importantes dans le cas de la pseudohypéricine ; cependant il est à noter que ces pertes conduiraient dans le cas de la protopseudohypéricine à la formation de cycle peu stables à 9 chaînons.

II. D. 5. Conclusion

Bien que les dérivés de l'hypéricine présents dans les extraits de Millepertuis présentent des structures très proches, les expériences menées en ESI-FTICRMSⁿ ont permis de mettre en avant des caractéristiques spécifiques pour chacun des composés. Ainsi, le spectre de fragmentation de l'hypéricine est largement dominé par l'ion correspondant à la perte de CO_2 , et la perte de CO majoritairement constatée à sa suite. L'ion pseudomoléculaire de la pseudohypéricine est peu sujet à la perte de CO_2 , ion que la très haute résolution en masse permet de différencier de son isobare correspondant à $[M-CH_4-CO]^+$ et qui est lui majoritaire sur le spectre de fragmentation. La prédominance de cet ion, ainsi que la présence d'un ion

correspondant à $[M-CH_4-OH]^+$, a permis de proposer un mécanisme de perte de CH_4 pour la pseudohypéricine. L'isopseudohypéricine, obtenue par traitement alcalin de la pseudohypéricine, est caractérisée une perte massive de CH_4 , préalable à toutes les autres fragmentations ; elle prédomine car elle permet à la molécule de retrouver son aromaticité, donc de se stabiliser. Une fois le groupement méthane perdu, les fragmentations observées sont comparables à celles constatées sur l'hypéricine, avec notamment la perte de CO_2 majoritaire. La spectrométrie de masse très haute résolution permet donc sans avoir recours à la chromatographie de différencier la pseudohypéricine de son produit de dégradation l'isopseudohypéricine. Quant aux protopigments, leurs spectres de fragmentation sont quasi similaires à celui de l'hypéricine, que ce soit comme attendu pour la protohypéricine ou de façon plus étonnante pour le protopseudohypéricine ; la liaison manquante génère en effet des cycles à 9 chaînons lorsque cet ion pseudomoléculaire perd les neutres CH_4 , CH_2O et CH_3OH , ce qui rend ces fragmentations moins favorisées que sur la pseudohypéricine. Ces données, sauf celles obtenues sur la protopseudohypéricine qui n'ont pu l'être sur un composé pur, ont permis de confirmer les attributions faites sur les extraits de Millepertuis concernant les trois autres naphotodianthrones, par comparaison entre les spectres de fragmentation obtenus sur les extraits et sur les composés purs.

Conclusions du Chapitre :

Ce Chapitre a été consacré à l'utilisation de l'ionisation par électronébulisation couplée à la FTICRMS, dans le but d'en déterminer les potentialités par rapport aux techniques plus conventionnellement utilisées pour l'analyse d'extraits végétaux, et notamment l'HPLC-MS. Dans un premier temps, l'influence des paramètres analytiques essentiels, tels que les potentiels appliqués à la pointe électrospray et sur le cône d'échantillonnage, la durée d'accumulation dans la cellule de collision, et le potentiel appliqué pour pousser les ions vers la cellule FTICR, a été évaluée. Les conditions ainsi optimisées ont été utilisées pour effectuer l'analyse en mode négatif de l'extrait méthanolique de Millepertuis dilué par cent par rapport aux analyses menées dans le Chapitre précédent. Ces conditions ont permis de détecter simultanément les polyphénols, les hypéricines et les hyperforines. Sont également apparus des composés de type procyanidine et acide hydroxycinnamique, indécélables avec les techniques de désorption laser. Les hypéricines et les hyperforines ont par cette technique été détectées avec un excellent rapport signal/bruit.

Le mode de détection positif permet essentiellement de caractériser les espèces de la famille des hyperforines, que ce soit avec ou sans ajout d'acide formique.

Si la plupart des signaux observés en ESI-FTICRMS ont pu être identifiés grâce à l'étude bibliographique de la composition des extraits de Millepertuis, certains ont nécessité la mise en place d'expériences complémentaires, notamment d'analyse de standards et de fragmentation. L'analyse de composés standard de la famille des flavonoïdes a permis de mettre en évidence l'apparition d'espèces dimériques non covalentes et covalentes, et ainsi d'attribuer certains pics observés sur les extraits en hautes masses. La MS/MS a également permis de confirmer la présence des procyanidines et des acides hydroxycinnamiques par comparaison avec les données bibliographiques disponibles sur ces composés.

Les hypéricines et les hyperforines ont fait l'objet d'études plus poussées, pour les premières en raison de modifications chimiques qu'elles peuvent subir sans changement de leur formule brute, notamment dans le cas de la pseudohypéricine, et pour les secondes parce qu'elles sont très instables mais qu'elles n'ont été caractérisées par spectrométrie de masse qu'en mode de détection positif.

La fragmentation des hypéricines en IRMPD se produit essentiellement sous la forme de perte de neutres, comme cela avait été précédemment décrit. Les expériences menées au cours de ce travail en spectrométrie de masse très haute résolution ont permis de lever certaines indéterminations quant à la nature des fragments obtenus, et certains mécanismes ont pu être précisés. Les spectres de fragmentation obtenus pour chacun des dérivés sont

très différents, tout particulièrement en ce qui concerne la pseudohypéricine et son dérivé l'isopseudohypéricine, qui ont la même formule brute.

L'étude de la fragmentation de l'hyperforine par SORI-CID a permis de caractériser certains pics observés sur les extraits de Millepertuis en mode négatif. La technique IRMPD génère pour sa part un plus grand nombre de fragments, dont certains ont été détectés pour la première fois et pour lesquels nous avons proposé des voies de fragmentation qui conduisent à la perte de CO₂ à partir de l'hyperforine ionisée.

Les données présentées dans ce Chapitre ont permis de mettre en avant les potentialités de l'ESI-FTICRMS pour l'analyse globale des extraits de fleurs de Millepertuis, qui vont maintenant faire l'objet d'une étude de leurs propriétés photochimiques.

Chapitre VI

Production d'oxygène moléculaire singulet
par l'extrait de Millepertuis

INTRODUCTION :	175
I. ETUDE DES DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES CONCERNANT LA PHOTOCHEMIE DE L'HYPERICINE, DE LA PSEUDOHYPERICINE ET DE LA PROTOHYPERICINE	176
II. MISE AU POINT DU PROTOCOLE D'EVALUATION DE LA QUANTITE D'OXYGENE MOLECULAIRE SINGULET..	177
<i>II. A. Données bibliographiques concernant les méthodes de détection de l'oxygène moléculaire singulet</i>	177
<i>II. B. Technique de détection choisie pour l'étude</i>	178
<i>II. C. Influence potentielle des antioxydants du Millepertuis sur la détection de l'oxygène moléculaire singulet</i>	179
<i>II. D. Choix des paramètres expérimentaux</i>	180
<i>II. E. Validation et mise en évidence des limites du protocole</i>	181
III. EVALUATION DE LA PRODUCTION D'OXYGENE MOLECULAIRE SINGULET PAR LES HYPERICINES, PURES EN SOLUTION ETHANOLIQUE ET PAR UN EXTRAIT DE MILLEPERTUIS	185
<i>III. A. Préparation de l'extrait de Millepertuis</i>	185
<i>III. B. Préparation de la protohypéricine</i>	185
III. B. 1. Intérêt : Ratio protopigments/pigments des extraits de Millepertuis	185
III. B. 2. Synthèse de la protohypéricine.....	187
<i>III. C. Résultats</i>	188
CONCLUSIONS DU CHAPITRE :	192

Introduction :

Si les études sur les propriétés photochimiques de l'hypéricine foisonnent, il n'en est pas de même en ce qui concerne ses dérivés. De plus, bien que les propriétés photothérapeutiques de l'extrait de Millepertuis soient utilisées dans diverses applications, la production d'espèces oxygénées réactives par l'hypéricine contenue dans les formulations employées n'avait fait jusqu'alors l'objet d'aucune investigation. Pourtant, la compréhension du comportement photochimique de l'hypéricine dans un milieu aussi complexe que l'extrait de Millepertuis est de toute première importance dès que l'on envisage d'utiliser cet extrait végétal comme une formulation d'hypéricine. Il devient alors nécessaire de mettre en parallèle le comportement de l'hypéricine pure et dans ce type de milieu, afin de détecter d'éventuels effets synergiques ou antagonistes, et le cas échéant d'effectuer les corrections qui s'imposent en terme de dosage de la molécule photoactive.

Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre, la photosensibilisation par l'hypéricine est considérée comme étant essentiellement due à un mécanisme de type II, c'est-à-dire à la production d'oxygène moléculaire singulet. Dans l'optique de préciser le comportement photochimique de l'hypéricine lorsqu'elle est présente au sein d'extraits de Millepertuis, nous avons souhaité dans un premier temps mettre au point un protocole de quantification de l'oxygène moléculaire singulet produit sous illumination laser d'un de ces extraits.

I. Etude des données bibliographiques concernant la photochimie de l'hypéricine, de la pseudohypéricine et de la protohypéricine

Les rares données disponibles concernant la capacité de la pseudohypéricine à générer de l'oxygène moléculaire singulet sont répertoriées dans le Tableau VI. 1. Il est à noter que les références 1 et 2 proviennent de la même équipe. Ces deux premières études attribuent à la pseudohypéricine un rendement quantique en oxygène singulet supérieur à celui de l'hypéricine. Cependant, il convient de noter que les coefficients d'extinction molaire trouvés pour l'hypéricine et la pseudohypéricine sont significativement différents. Celui de l'hypéricine est compatible avec la majorité des données trouvées dans la littérature et la mesure que nous avons réalisée sur notre composé de référence (cf Chapitre III). En revanche la valeur qu'ils ont obtenue pour la pseudohypéricine est très faible et conduit à penser que l'échantillon utilisé n'était pas très pur ; pour cette raison ces résultats nous ont semblé peu exploitables. En ce qui concerne la référence 3, les coefficients d'extinction molaire calculés pour les composés n'y sont pas précisés ; le résultat obtenu montre que l'hypéricine a causé une dégradation de 5% de la quantité initiale de luminol, tandis qu'aucune dégradation quantifiable n'est observée pour la pseudohypéricine. Dans le cas de cette étude deux choses nous ont semblé à prendre en compte : la première concerne le pH légèrement basique du milieu étudié, qui a pu causer une dégradation partielle de la pseudohypéricine, la seconde concerne la limite de quantification de la forme oxydée du luminol, qui n'est pas précisée et pourrait être assez élevée compte tenu des temps de rétention proches du luminol et sa forme oxydée (l'acide aminophtalique) dans les conditions de séparation chromatographique employées.

Composé	Milieu	Protocole	Φ^1O_2	Remarques	Référence
Hypéricine	DMSO	Calcul de Φ^1O_2 via la mesure de la luminescence à 1270 nm (référence Rose Bengal) – Photosensibilisateur illuminé à 527 nm	0,34	$\epsilon_{599}=44000$	1
Pseudohypéricine	DMSO		0,44	$\epsilon_{599}=9000$	
Hypéricine	DMSO		0,19		2
Pseudohypéricine	DMSO		0,30		
Hypéricine	Tampon pH=8	Mesure du % de luminol oxydé après 60 minutes d'illumination sous lumière blanche	5% (90% pour le Rose Bengal)	ϵ non précisé	3
Pseudohypéricine	Tampon pH=8		- (90% pour le Rose Bengal)	ϵ non précisé	

Tableau VI. 1 : Récapitulatif des données bibliographiques concernant la comparaison entre la production d'oxygène moléculaire singulet de la pseudohypéricine et celle de l'hypéricine

¹ Wills, N. J., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2001, **74**, 2, p 216

² Wen, J., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2002, **76**, 2, p 153

³ Wierrani, F., *et al.*, *Naturwissenschaften*, 2002, **89**, 10, p 466

En ce qui concerne la protohypéricine, comme nous l'avons déjà précisé dans le Chapitre II, il n'existe aucune donnée concernant sa production d'oxygène moléculaire singulet sous irradiation lumineuse. Si sa phototoxicité propre semble être limitée en milieu cellulaire, elle pourrait être due à une instabilité dans les conditions physiologiques, et il nous est apparu judicieux d'en étudier les propriétés en milieu organique. Ce composé, et son analogue la protopseudohypéricine, bien qu'absents des préparations commerciales d'*Hypericum Perforatum*, sont présents en quantités non négligeables dans le végétal, le rapport entre protopigments et pigments fluctuant selon l'organe à partir duquel est réalisé l'extrait⁴.

II. Mise au point du protocole d'évaluation de la quantité d'oxygène moléculaire singulet

II. A. Données bibliographiques concernant les méthodes de détection de l'oxygène moléculaire singulet

La détection résolue dans le temps de la luminescence de l'oxygène moléculaire singulet (située à 1270 nm) est une technique d'identification directe de celui-ci via chimiluminescence, établie en 1979⁵. Par cette méthode, l'oxygène moléculaire singulet peut être détecté dans des solvants organiques.⁶ Cependant, en milieu biologique *in vitro* et *in vivo*, la présence de biomolécules autour du lieu de formation de l'oxygène moléculaire singulet réduit drastiquement la durée de vie de celui-ci, qui passe d'approximativement 3 μ s à environ 100 ns.^{7,8} Il est dès lors nécessaire d'utiliser des détecteurs IR de plus grande sensibilité.⁹

En parallèle, des tests indirects existent pour caractériser l'oxygène moléculaire singulet. Ceux-ci reposent sur l'emploi de sondes organiques spécifiques ou « quenchers » d'oxygène singulet qui réagissent avec l'oxygène singulet pour produire des espèces oxydées. Parmi ces sondes, nous pouvons citer le 1,4-diazabicyclo-[2,2,2] octane (DABCO), le 2,5 Diméthylfurane (2,5 DMF), le 1,3-cyclohexadiène-1,4-diéthanoate (CHDDE)¹⁰ et l'histidine, mais aussi la molécule de 1,3-diphénylisobenzofurane DPBF qui réagit avec l'oxygène moléculaire singulet pour produire de l'orthodibenzoylbenzène o-BB (Figure VI. 1).

⁴ Poutaraud, A., *et al.*, *Planta Medica*, 2001, **67**, 3, p 254

⁵ Khan, A. U., Kasha, M., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1979, **76**, 12, p 6047

⁶ Weldon, D., Ogilby, P. R., *Journal of American Chemical Society*, 1998, **120**, p 12978

⁷ Moan, J., Berg, K., *Photochemistry and Photobiology*, 1991, **53**, p 549

⁸ Schweitzer, C., Schmidt, R., *Chemical Review*, 2003, **103**, 5, p 1685

⁹ Niedre, M., *et al.*, *Photochemistry and Photobiology*, 2002b, **75**, 4, p 382

¹⁰ Nardello, V., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1997, **39**, 2, p 146

II. B. Technique de détection choisie pour l'étude

Nous avons porté notre attention sur la molécule de 1,3-diphénylisobenzofurane (DPBF). Par réaction avec l'oxygène singlet via une cycloaddition [4+2] (Figure VI. 1), la DPBF produit un endopéroxyde peu stable qui se transforme rapidement en orthodibenzoylbenzène (oBB).

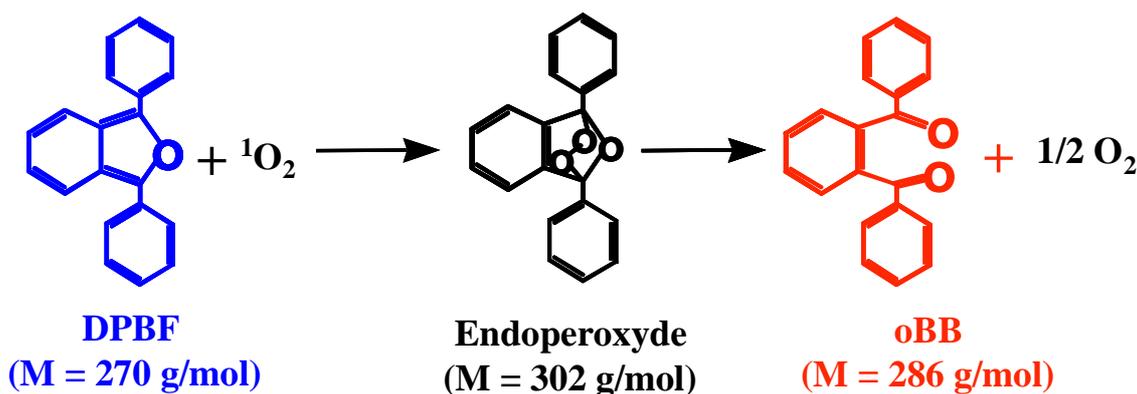


Figure VI. 1 : Oxydation du DPBF par l'oxygène moléculaire singlet

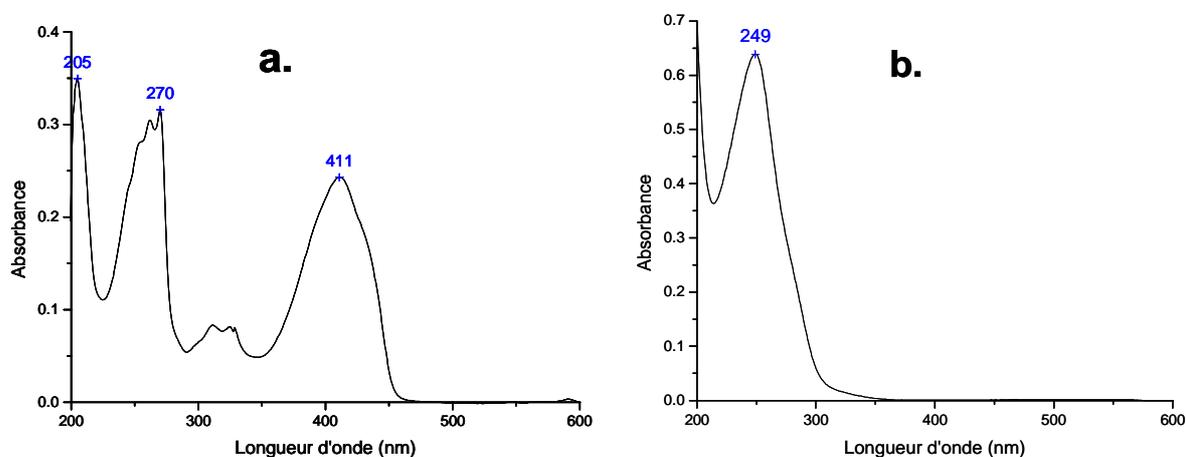


Figure VI. 2 : Spectres d'absorption UV-Vis du DPBF (a.) et de l'oBB (b.) à 10^{-5}M dans l'éthanol

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

- la molécule de DPBF réagit rapidement selon un processus d'addition [4+2] avec l'oxygène singlet $^1\text{O}_2$,
- la molécule de DPBF ne réagit pas avec l'état fondamental de l'oxygène moléculaire,

Chapitre VI : Production d'oxygène moléculaire singulet par l'extrait de Millepertuis

- la seule réaction de la molécule de DPBF avec l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ est la réaction suivante : $\text{DPBF} + ^1\text{O}_2 \rightarrow \text{o-BB}$. Par contre, le DPBF ne réagit pas avec $^1\text{O}_2$ (singulet) pour donner l'oxygène moléculaire $^3\text{O}_2$ (triplet).

Les spectres d'absorption UV-Visible du DPBF et de l'o-BB, présentés sur la Figure VI. 2, montrent qu'il est possible de suivre la dégradation du DPBF par le biais de la diminution de sa bande d'absorption à 411 nm. Ce type de suivi, notamment réalisé au cours de leurs travaux par Reddi et al.¹¹ parallèlement à des mesures de luminescence, a permis de montrer que le temps de vie de l'oxygène moléculaire singulet en solution dans l'éthanol saturé en oxygène est réduit par addition de DPBF. La vitesse de cycloaddition $\text{DPBF} + ^1\text{O}_2$ est égale à $10^9 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$.

II. C. Influence potentielle des antioxydants du Millepertuis sur la détection de l'oxygène moléculaire singulet

Il est important de noter qu'au cours de cette étude le DPBF a été utilisé afin de quantifier l'oxygène singulet produit par les hypéricines au sein d'extraits de Millepertuis, lorsque ceux-ci subissaient une illumination laser. Les extraits de plantes, et notamment les extraits de Millepertuis peuvent contenir de grandes quantités de composés possédant des propriétés antioxydantes (caroténoïdes, flavonoïdes, ...), dont on peut craindre qu'ils faussent les résultats obtenus avec le DPBF. Il est donc important de remarquer que les extraits étudiés contenaient des quantités infimes de caroténoïdes, puisque ces composés sont très peu extraits par les solvants polaires, tels que le méthanol ou le DMSO ; les analyses que nous avons réalisées n'ont pas révélé la présence de ces composés dans l'extrait au méthanol, bien que leur détection par MALDI-TOF¹² et ESI-MS¹³ soit abondamment décrite dans la littérature. En effet, bien que Britton et al.¹⁴ aient postulé en 1985 que l'utilisation de solvants polaires, miscibles à l'eau était intéressante pour l'extraction des caroténoïdes, Delgado-Vargas et al.¹⁵ ont par la suite précisé les avantages et les inconvénients que présentaient différents solvants pour l'extraction des caroténoïdes, et déduit que si les milieux polaires étaient adaptés à l'extraction des xanthophylles, ils ne permettaient pas une extraction satisfaisante des carotènes. Finalement, d'après les travaux de Sachindra et al.¹⁶, dont les résultats sont compatibles avec ceux de De Ritter et al. publiés en 1981¹⁷, il semble que

¹¹ Reddi, E., et al., *Photochemistry and Photobiology*, 1991, **54**, 4, p 633

¹² Kaufmann, R., et al., *Analytical Biochemistry*, 1996, **238**, 2, p 117

¹³ Guaratini, T., et al., *Journal of Mass Spectrometry*, 2005, **40**, 7, p 963

¹⁴ Britton, G., *Methods in Enzymology*, 1985, **111**, p 113

¹⁵ Delgado-Vargas, F., et al., *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2000, **40**, p 173

¹⁶ Sachindra, N. M., et al., *Waste Management*, 2006, **26**, p 1092

¹⁷ De Ritter, E., Purcell, A. E., *Carotenoids as colorants and vitamin A precursors*, 1981, p 815

Chapitre VI : Production d'oxygène moléculaire singulet par l'extrait de Millepertuis

l'extraction des caroténoïdes soit optimisée par l'utilisation d'un mélange contenant de façon majoritaire un solvant apolaire, et une plus faible proportion d'un solvant polaire. Compte tenu de nos conditions d'extraction et des analyses réalisées dans le Chapitre IV, il semble plausible que cette famille de composés, dont les constantes de piégeage de l'oxygène moléculaire singulet sont de l'ordre de $10^{10}\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$,¹⁸ donc supérieure à celle du DPBF, n'a pas pu influencer sur les résultats obtenus avec les extraits de plantes. D'autre part les flavonoïdes, qui sont eux présents dans les extraits réalisés avec des solvants polaires, présentent des constantes de piégeage de l'ordre de $10^8\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$, donc inférieures à celle du DPBF¹⁹. Il en est de même pour les acides hydroxycinnamiques, également potentiellement présents dans les extraits de Millepertuis²⁰. Au final nous pouvons considérer que l'oxygène moléculaire singulet produit par l'hypéricine au sein d'extraits de Millepertuis sera essentiellement piégé par la sonde DPBF.

II. D. Choix des paramètres expérimentaux

Afin d'estimer la production d'oxygène singulet par les différentes solutions étudiées, soient l'hypéricine pure, la pseudohypéricine pure, la protohypéricine et un extrait de fleurs de Millepertuis, il a été nécessaire de choisir des concentrations d'hypéricines et de sonde à oxygène moléculaire singulet qui permettent de suivre les modifications subies pour toutes ces molécules. De même, un protocole d'illumination permettant de déceler de manière significative la transformation du DPBF en oBB a été mis en œuvre.

La source de lumière utilisée pour illuminer les solutions est un laser à colorants TDL50 (Quantel, Les Ulis, France), dont le pompage optique est effectué par la seconde harmonique d'un laser Nd-YAG ($\lambda=532\text{nm}$). Le mélange de colorants organiques est constitué de Rhodamine 610 et Rhodamine 640 (Exciton, distribué par Opticas, France), permettant d'obtenir des longueurs d'onde allant de 580 à 620 nm. Ce laser a été utilisé pour réaliser des expériences d'illumination à 590 et 532 nm.

La longueur d'onde 590 nm a été choisie car elle correspond à la bande d'absorption de plus haute longueur d'onde pour l'hypéricine ($\epsilon = 45000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ dans le méthanol).

Nous avons souhaité effectuer également des expériences à 532 nm, longueur d'onde plus facilement accessible, et donc également souvent utilisée pour l'irradiation de l'hypéricine.

¹⁸ Di Mascio, P., *et al.*, *Biochem Society Transactions*, 1990, **18**, 6, p 1054

¹⁹ Nagai, S., *et al.*, *Journal of Physical Chemistry*, 2005, **109**, p 4234

²⁰ Foley, S., *et al.*, *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, **26**, 9-10, p 1202

Chapitre VI : Production d'oxygène moléculaire singulet par l'extrait de Millepertuis

De plus, cette longueur d'onde présente l'intérêt de correspondre à l'absorption maximum par les protopigments ($\epsilon = 20000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ pour la protohypéricine), dont nous souhaitons voir l'influence sur la production d'oxygène moléculaire singulet par les extraits de Millepertuis. Enfin, certaines études ont montré que l'utilisation de longueurs d'onde dans le vert pouvait permettre une efficacité thérapeutique similaire aux lumières rouges en causant moins de dégâts sur les tissus sains environnants, notamment dans le cas d'organes pouvant se perforer (poumons) ²¹ et avec moins de douleur aux patients²².

Les différents tests préliminaires effectués via un suivi par spectrophotométrie UV-Visible de l'absorbance à 411 nm ont montré que l'illumination d'une solution éthanolique contenant 10^{-5}M d'hypéricines et 10^{-4}M de DPBF avec une fréquence de tirs laser de 2Hz et une puissance de 25 mW permettait d'observer la cinétique de dégradation du DPBF en réalisant des étapes de quelques dizaines de secondes, sur lesquelles l'erreur était relativement faible, et qui permettaient d'éviter un échauffement de la solution. L'idée de départ avait été d'utiliser la fréquence de tir la plus élevée, afin de se rapprocher des conditions d'illuminations utilisées en thérapie, c'est-à-dire le laser continu ; toutefois pour obtenir le même résultat à 10 Hz il était nécessaire de baisser la puissance jusqu'à 5 mW, valeur à laquelle la puissance du laser était moins stable dans le temps.

Si les premiers tests avaient été effectués par spectrophotométrie UV-Visible, l'analyse des extraits de Millepertuis par cette technique conduit à une absorbance non nulle à 411 nm et elle est susceptible d'être modifiée au cours de l'illumination laser notamment au cours de la phototransformation des protopigments en pigments ou en raison de photomodifications induites sur certains composants du Millepertuis. De ce fait, le suivi par spectrophotométrie UV-Visible de la dégradation du DPBF est peu adapté au cas des extraits de Millepertuis. Nous avons donc utilisé le protocole GC-MS qui a été décrit dans le Chapitre III.

II. E. Validation et mise en évidence des limites du protocole

Afin de s'assurer de la validité de nos résultats, plusieurs vérifications ont été effectuées. D'une part, nous avons effectué l'irradiation laser d'une solution ne contenant que du DPBF, afin de confirmer que la molécule n'était pas dégradée par le rayonnement laser en l'absence de source d'oxygène moléculaire singulet.

²¹ Foster, T. H., *et al.*, *British Journal of Cancer*, 1996, **73**, 8, p 933

²² Fritsch, C., *et al.*, *Photodermatology Photoimmunology Photomedicine*, 1997, **13**, 5-6, p 181

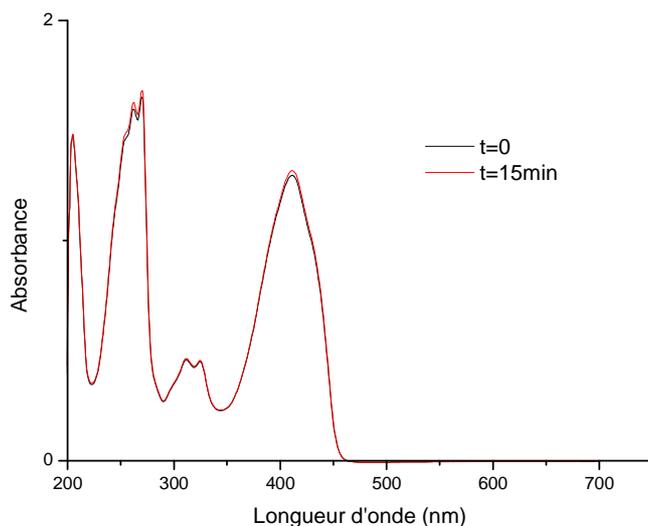


Figure VI. 3 : Stabilité du DPBF dans nos conditions d'irradiation

D'autre part, nous avons fait le choix de réaliser chaque courbe avec une seule solution, dont nous avons analysé la composition à chaque étape de l'illumination. Nous avons estimé le temps nécessaire à chaque étape de l'illumination laser pour réaliser l'analyse GCMS de la solution, le spectre d'absorption UV-Visible, ainsi que le dépôt sur la plaque MALDI (1 μ L). Il a ensuite été vérifié qu'au cours de ce temps, il n'y avait pas de modification de la composition de la solution.

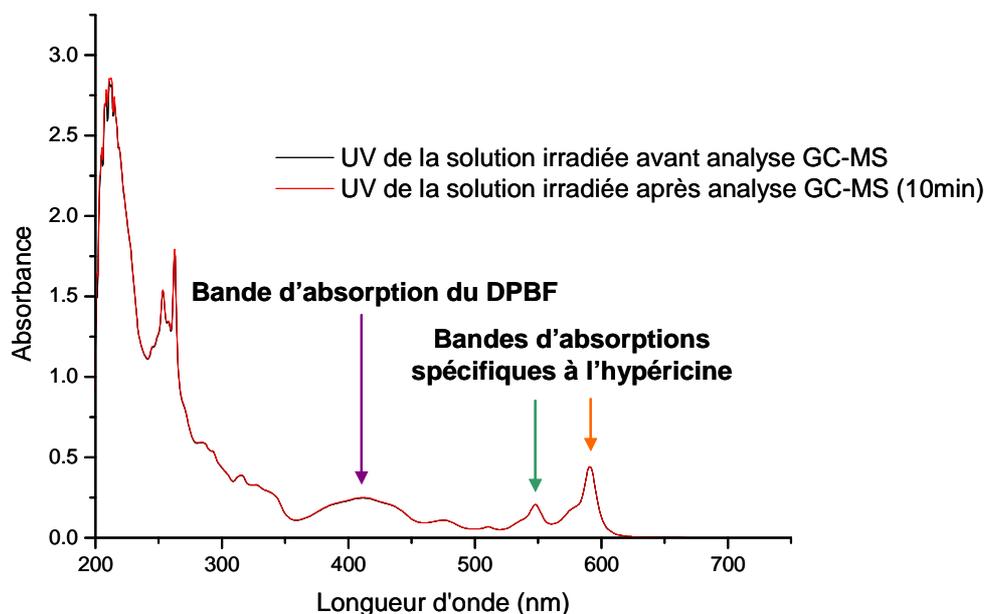


Figure VI. 4 : Evolution du spectre d'absorption UV-Visible d'une solution contenant hypéricine, DPBF et o-BB, pendant le temps nécessaire à son analyse par GC-MS

Chapitre VI : Production d'oxygène moléculaire singulet par l'extrait de Millepertuis

De plus, afin d'assurer une agitation constante et régulière de la solution au cours de l'illumination, un agitateur magnétique a été mis en place au fond de la cuve en quartz. L'influence de l'agitation a été évaluée sur la production d'oxygène moléculaire singulet par l'hypéricine ; ces résultats sont présentés sur la Figure VI. 5, et montrent que l'intensité de l'agitation peut modifier légèrement la quantité de DPBF oxydée à un instant donné (les expériences « modérée 1 » et « modérée 2 » correspondent à deux répétitions de l'expérience sous agitation modérée). Il est à noter que pour des raisons d'encombrement au niveau du laser, la cuve en quartz n'a pu être placée de façon équivalente sur le support d'agitation dans le cas des irradiations à 532 et à 590 nm, et que donc l'intensité de l'agitation était légèrement différente. Pour cette raison nous ne ferons pas de comparaison entre les résultats obtenus pour ces deux longueurs d'onde et focaliserons notre attention sur la comparaison des productions d'oxygène moléculaire singulet par l'hypéricine et par l'extrait de Millepertuis pour une longueur d'onde donnée.

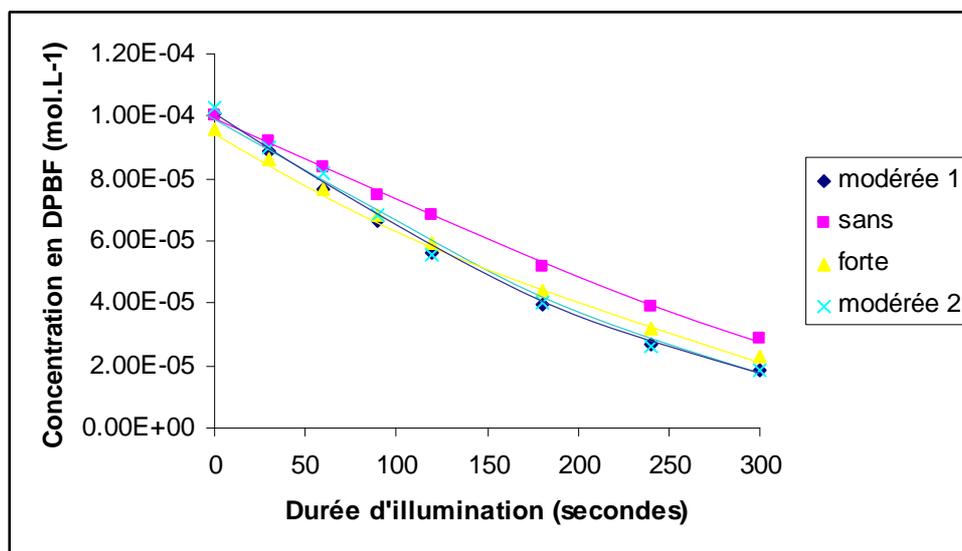


Figure VI. 5 : Influence de l'agitation sur la vitesse de dégradation du DPBF en présence d'hypéricine au cours d'une illumination laser à 591 nm

Un autre point susceptible d'affecter la répétabilité de nos expériences concerne le taux d'oxygénation du solvant utilisé. Une étude de la dégradation du DPBF au cours de l'illumination de l'hypéricine a été réalisée dans des solutions contenant différentes proportions de dioxygène dissous, obtenues en effectuant des barbotages à l'argon et au dioxygène pendant des durées variables. Ces résultats présentés sur la Figure VI. 6, indiquent que les barbotages à l'argon permettent effectivement de réduire la quantité de DPBF transformée, confirmant ainsi la participation de l'oxygène moléculaire dissous dans la solution à ce processus ; d'autre part, on constate que les barbotages au dioxygène ont une influence très limitée sur la quantité de DPBF transformée, ce qui indique que notre solvant est probablement déjà saturé en dioxygène.

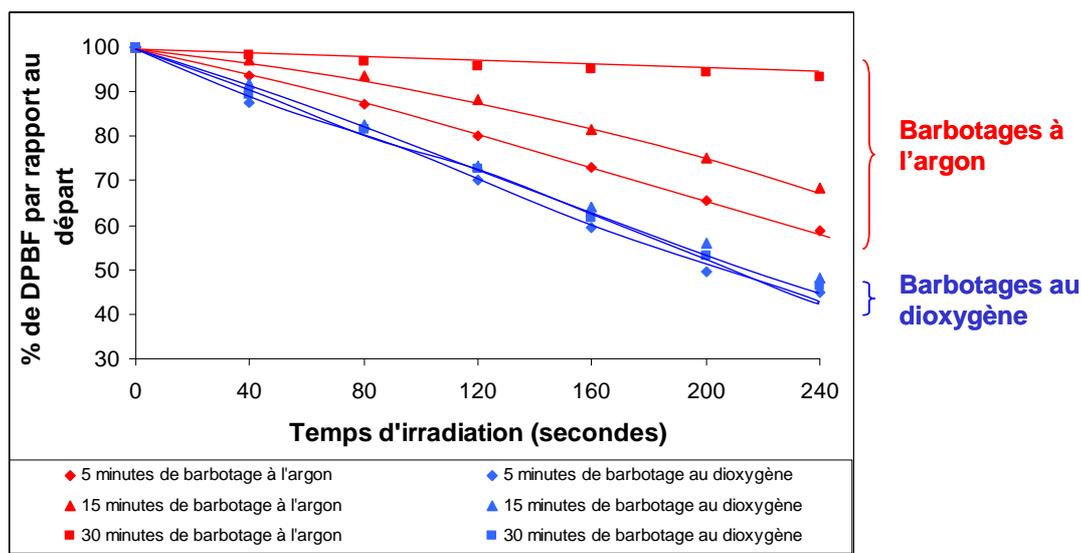


Figure VI. 6 : Influence de l'oxygénation du mélange hypéricine/DPBF sur la cinétique de disparition du DPBF au cours de l'illumination laser à 591 nm

La puissance du laser a été mesurée à la fin de chaque manipulation afin de vérifier qu'elle était identique à celle imposée au début de l'expérience.

Enfin, nous avons vérifié par GC-MS que la disparition observée pour le DPBF au cours de l'illumination de la solution d'hypéricine correspondait bien à l'apparition d'oBB dans la solution (Figure VI. 7).

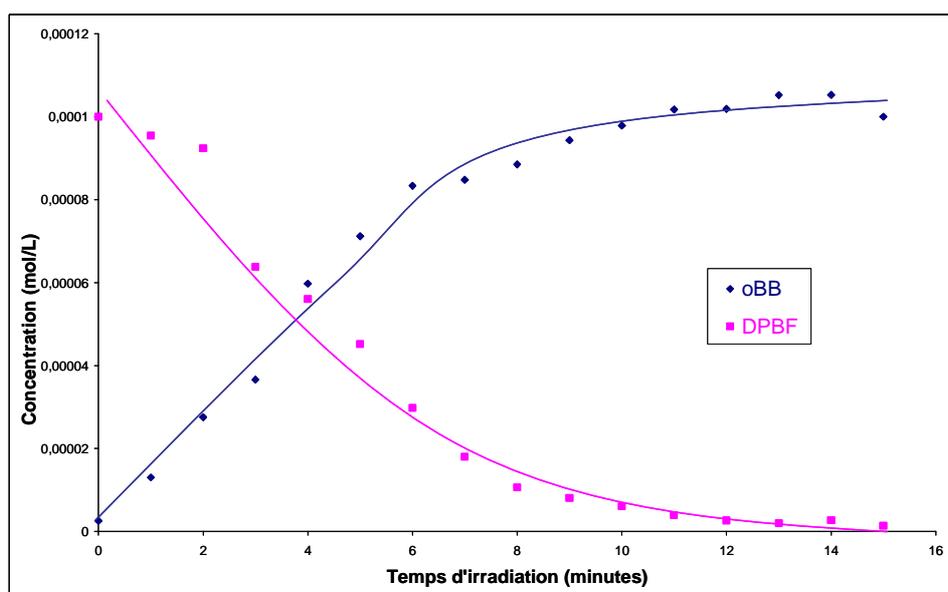


Figure VI. 7 : Evolution des concentrations de DPBF et d'oBB mesurées au cours de l'illumination laser d'une solution contenant de l'hypéricine et du DPBF

III. Evaluation de la production d'oxygène moléculaire singulet par les hypericines, pures en solution éthanolique et par un extrait de Millepertuis

III. A. Préparation de l'extrait de Millepertuis

Les études précédemment menées au Laboratoire avec la sonde DPBF l'ont été en milieu éthanolique ; pour cette raison nous avons choisi d'étudier nos photosensibilisants dans ce même milieu. L'extrait de Millepertuis a été préparé par extraction de fleurs ; l'absorbance à 591 nm a été mesurée à plusieurs étapes de l'extraction jusqu'à obtenir une absorbance de 0,45 après dilution au tiers de l'extrait.

III. B. Préparation de la protohypericine

III. B. 1. Intérêt : Ratio protopigments/pigments des extraits de Millepertuis

Afin de déterminer s'il était judicieux de s'intéresser aux protopigments dans le cadre de notre étude portant sur les extraits de Millepertuis, nous avons souhaité évaluer le rapport protopigments/pigments (protopigments = protohypericine pHP + protopseudohypericine pPHP, pigments = hypericine HP + pseudohypericine PHP) qu'il était possible d'atteindre dans les extraits. Les résultats obtenus sont présentés dans le Tableau VI. 2 ; ils correspondent à des extractions réalisées dans l'obscurité totale et les spectres LDI-TOFMS correspondant sont présentés sur la Figure VI. 8. Seul le matériel végétal du spectre a est broyé, les autres échantillons, fleurs et bourgeons, ont été extraits tels quels aux ultrasons pendant 30 minutes.

	pHP/HP	pPHP/PHP
Extrait de fleurs broyées	1	3
Extrait de fleurs entières	1.5	3
Extraits de bourgeons	2.5	8
Extraction de fleurs protégées de la lumière par du papier depuis le stade de bourgeons	5	12

Tableau VI. 2 : Rapports protopigments/pigments d'après les données LDI-TOFMS (Figure VI. 8)

Les données présentées dans le Tableau VI. 2 indiquent que les rapports protopigments/pigments les plus faibles sont obtenus pour l'extrait de fleurs broyées. Les fleurs entières permettent d'obtenir un rapport pHP/HP légèrement plus élevé tandis que

Chapitre VI : Production d'oxygène moléculaire singulet par l'extrait de Millepertuis

l'extraction des bourgeons montre que les protopigments y sont clairement majoritaires. Afin de voir s'il était possible d'obtenir des extraits ne contenant quasiment que des protopigments, du Millepertuis a été cultivé en protégeant les fleurs par du papier opaque depuis le stade bourgeonnaire ; ceci a permis d'obtenir un rapport pHP/HP de 5 et un rapport pPHP/PHP de 12. Il est à noter ici que nous avons systématiquement observé des rapports pPHP/PHP plus élevés que les valeurs calculées pour pHP/HP ce qui pourrait indiquer une transformation plus rapide de la protohypéricine en hypéricine que pour la transformation de la protopseudohypéricine en pseudohypéricine.

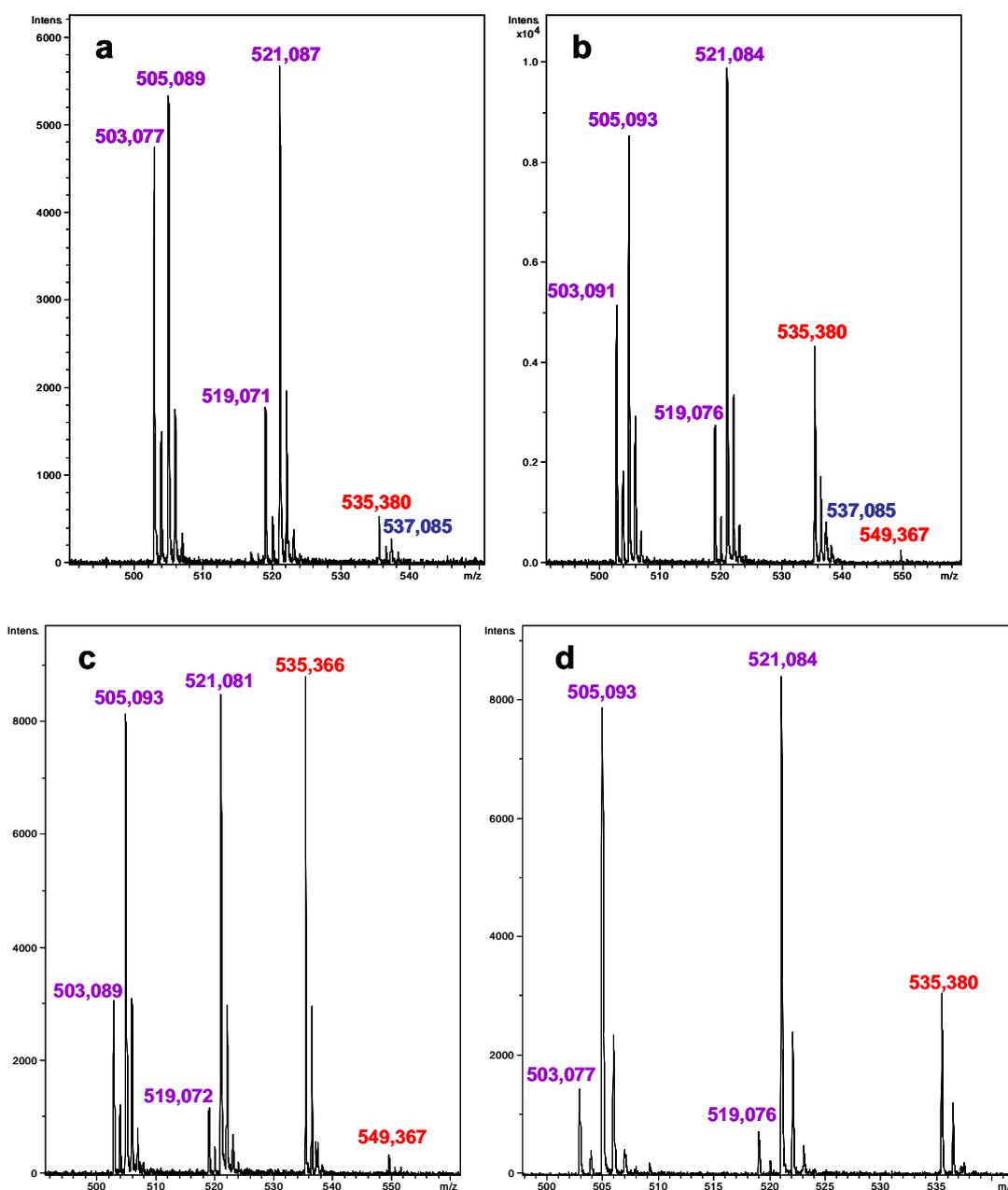


Figure VI. 8 : Spectres LDI-TOF en mode de détection négatif obtenus pour des extraits réalisés à l'obscurité de a : un broyat de fleurs, b : des fleurs entières, c : des bourgeons, d : des fleurs protégées de la lumière par du papier depuis le stade du bourgeonnement

Les résultats que nous avons obtenus ont montré qu'il était possible d'obtenir des extraits de Millepertuis ne contenant quasiment que des protopigments ; compte-tenu de ce résultat, nous avons décidé de comparer la production d'oxygène moléculaire singulet de la protohypéricine à celle du composé de référence hypéricine.

III. B. 2. Synthèse de la protohypéricine

La protohypéricine se transformant très rapidement en hypéricine sous l'action de la lumière, ce composé n'est pas disponible dans le commerce. Afin de vérifier si ce dérivé de l'hypéricine était lui aussi générateur d'oxygène moléculaire singulet, il était donc nécessaire d'en effectuer la synthèse. Celle-ci a été gracieusement réalisée par l'équipe du Professeur Heinz Falk, de l'Université de Linz (Autriche), d'après un protocole de semi-synthèse publié par le Professeur Falk en 1993.

Afin d'obtenir le précurseur biosynthétique de l'hypéricine, un extrait de l'écorce de *Cortex Frangulae*, qui contient de l'émodine, a été réalisé dans le méthanol. Le résidu obtenu après évaporation a été hydrolysé par une $\text{HCl}_{\text{conc}}/\text{H}_2\text{O} - 1/1$, puis rincé jusqu'à obtenir un pH neutre, évaporé puis extrait par du dichlorométhane. La solution obtenue a été évaporée et chromatographiée sur silice. La deuxième bande orange, correspondant à l'émodine, a été collectée pour servir de base à la synthèse de l'hypéricine. La réduction de l'émodine en émodinanthrone a été obtenue en milieu acétique et sous reflux à 120°C grâce à l'action de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dissous dans HCl_{conc} pendant 5 heures. Après refroidissement à la température ambiante, l'émodinanthrone est filtrée ; sa pureté est suffisante pour poursuivre la synthèse sans purification particulière. La protohypéricine a été préparée par dimérisation oxydative de l'émodinanthrone : environ 2 grammes ont été dissous dans 44 mL d'un mélange pyridine/pipéridine (10/1) avec 4 mg de pyridine-1-oxyde et 100 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, le mélange a été chauffé pendant une heure à 100°C sous atmosphère d'azote et à l'abri de toute source de lumière. La protohypéricine a ensuite été précipitée dans l'hexane et purifiée dans un premier temps sur une colonne de silice avec pour phase mobile un mélange acétate d'éthyle/eau-50/50 contenant une proportion croissante d'acétone. Le produit ainsi récupéré a ensuite été repurifié sur une colonne Sephadex LH-20. La protohypéricine a ainsi pu être obtenue à une pureté de 90%, déterminée ESI-MS par l'équipe du Pr Falk. Lorsque nous avons réceptionné l'échantillon, nous en avons remesuré la pureté par HPLC (par comparaison entre une mesure effectuée avant illumination de l'échantillon et après phototransformation de la protohypéricine en hypéricine) et obtenu une pureté de 85 %.

III. C. Résultats

Les résultats présentés sur la Figure VI. 9 et la Figure VI. 12 correspondent à la quantité de DPBF transformée au bout de 4 minutes d'illumination laser, d'une part à 591 nm (Figure VI. 9), et d'autre part à 532 nm (Figure VI. 12). Dans chaque cas, des mesures ont été effectuées toutes les 40 secondes afin de s'assurer que la disparition du DPBF est linéaire et qu'il n'y a pas de défaut d'oxygène dans la solution. Les valeurs données ci-dessous correspondent à celles obtenues à 4 minutes d'illumination après avoir effectué une régression linéaire sur l'ensemble des points. Les résultats sont normalisés par rapport à la quantité de DPBF transformé à 4 minutes dans le cas de l'hypéricine, qui correspond au 100% sur le graphique.

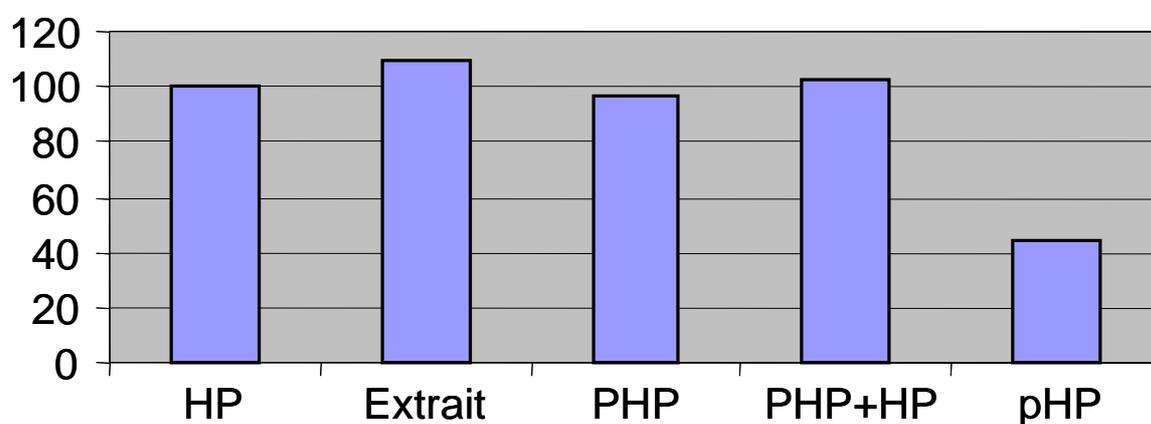


Figure VI. 9 : Pourcentage de DPBF transformé en 4 minutes d'illumination à 591 nm par les solutions d'extrait de Millepertuis, de pseudohypéricine (PHP), d'hypéricine+pseudohypéricine (PHP+HP) et de protohypéricine (pHP) par rapport à une solution d'hypéricine (HP) dans les mêmes conditions

Lors des illuminations menées à 591 nm, nous avons mesuré une production d'oxygène moléculaire singulet équivalente pour la pseudohypéricine et le composé de référence hypéricine. Le mélange équimolaire des deux composés (concentration totale $10^{-5}M$) conduit également à une production d'oxygène moléculaire singulet comparable, indiquant qu'il n'y a ni effet de synergie, ni effet antagoniste (de type quenching par exemple) entre ces deux composés.

L'extrait de Millepertuis produit quant à lui une quantité d'oxygène moléculaire singulet légèrement supérieure. Cet extrait, réalisé sans prendre de précautions expérimentales particulières concernant la lumière, contient une petite quantité de protopigments. Les mesures effectuées en LDI-TOFMS indiquent qu'à 4 minutes d'illumination, ces derniers ne

Chapitre VI : Production d'oxygène moléculaire singlet par l'extrait de Millepertuis

sont pas transformés en pigments et qu'une durée d'illumination de 8 minutes est nécessaire à leur transformation (Figure VI. 10). En effet, sur les spectres LDI-TOFMS présentés Figure VI. 10, il semble que les rapports isotopiques mesurés ne correspondent pas aux rapports théoriques pour l'hypéricine, soit des contributions en M+1 et M+2 correspondant à respectivement 33% et 7% de l'intensité du pic monoisotopique. Deux hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer ce phénomène, le premier étant une saturation des pics monoisotopiques du $[M-H]^-$, et la seconde la présence simultanée d'ions $[M-H]^-$ et M^* . Quelle que soit l'hypothèse retenue, la contribution de l'ion pseudomoléculaire de la protohypéricine sur l'intensité mesurée en M+2 est évaluée à environ 500 à $t = 0$, 750 à $t = 4$ minutes et quasiment nulle à $t = 8$ minutes d'illumination laser.

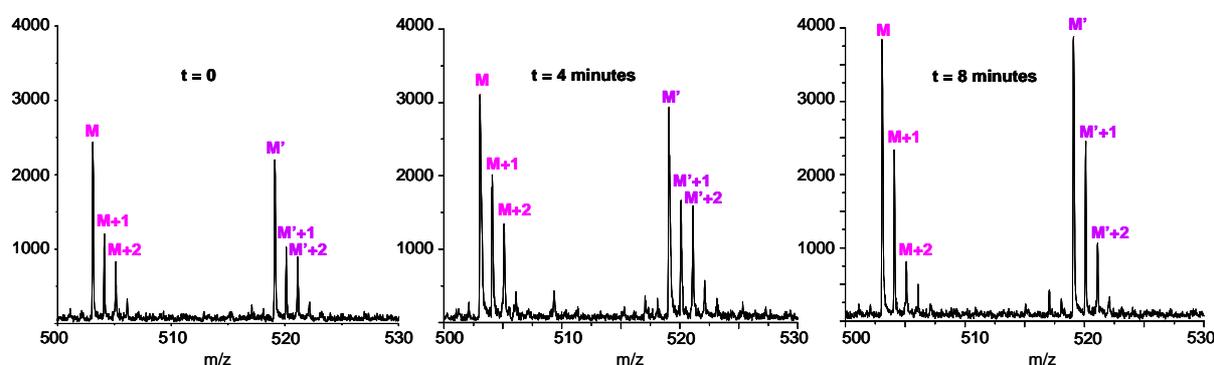


Figure VI. 10 : Spectres LDI-TOFMS de la solution d'extrait de millepertuis à $t = 0$, 4 et 8 minutes d'irradiation laser à 591 nm (M correspond à m/z 503 et M' à m/z 519, soient les pics pseudomoléculaires de l'hypéricine et de la pseudohypéricine ; les signaux correspondant aux protopigments contribuent à l'intensité des signaux en M+2 et $M'+2$)

La production d'oxygène moléculaire singlet supérieure mesurée dans le cas de l'extrait pourrait donc être due à l'intervention des protopigments sous leur forme native, ou éventuellement à la chlorophylle présente dans l'extrait, qui possède également des propriétés photosensibilisatrices²³ ; cependant, le spectre d'absorption que nous avons présenté pour la chlorophylle dans le Chapitre III indique qu'elle absorbe peu à 591 nm.

Quant à la solution de protohypéricine, elle produit une quantité d'oxygène moléculaire singlet environ deux fois moins importante que la solution d'hypéricine. L'analyse de la solution illuminée à $t=0$ et à $t=4$ minutes indique une transformation partielle de la protohypéricine en hypéricine (Figure VI. 11) ; l'essentiel de la production d'oxygène moléculaire singlet est donc due à l'intervention de l'hypéricine, et les propriétés phototoxiques de la protohypéricine sont donc très réduites par rapport à notre composé de référence.

²³ Whang, K., Peng, I. C., *Journal of Food Science*, 1988, **53**, 6, p 1918

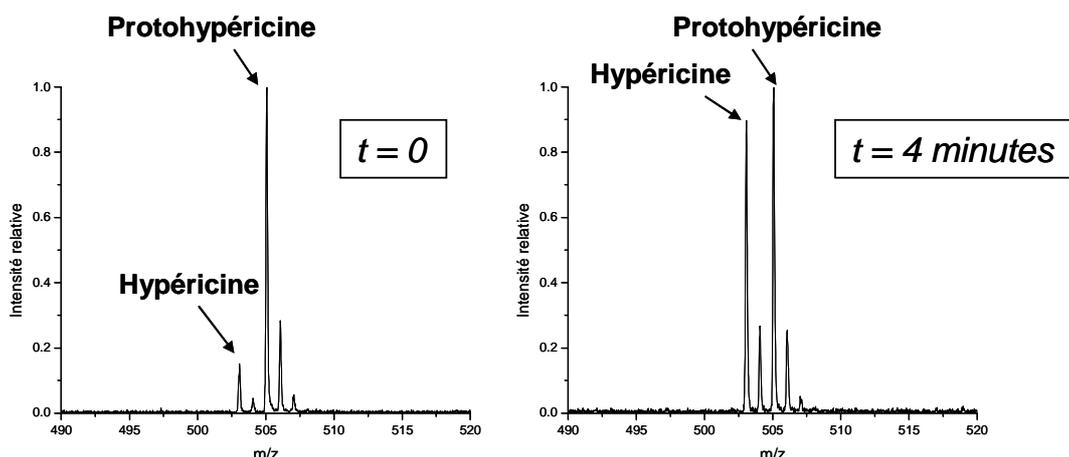


Figure VI. 11 : Spectres LDI-TOFMS de la solution de protohypéricine irradiée à $t = 0$ et $t = 4$ minutes d'illumination laser à 591 nm

Les mesures effectuées à 532 nm confirment les résultats précédemment obtenus, avec une production d'oxygène moléculaire singulet encore plus élevée qu'à 590 nm. Dans ces conditions, on constate également la faible photoactivité de la protohypéricine.

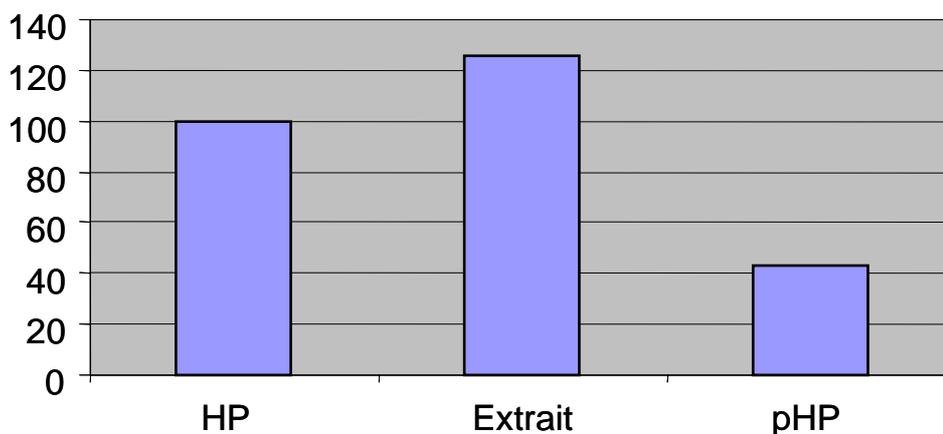


Figure VI. 12 : Pourcentage de DPBF transformé en 4 minutes d'illumination à 532 nm par les solutions d'extrait et de protohypéricine (pHP) par rapport à une solution d'hypéricine dans les mêmes conditions

Nous avons utilisé la LDI-TOFMS afin d'évaluer la vitesse de transformation de la protohypéricine en hypéricine dans nos conditions d'illumination. Il est à noter que nous avons préalablement vérifié la cohérence entre les mesures réalisées en LDI-TOFMS et les valeurs obtenues concernant le rapport protohypéricine/hypéricine en HPLC-UV. Les résultats, présentés sur la Figure VI. 13, indiquent que durant les premières dizaines de secondes d'illumination, la phototransformation de la protohypéricine est plus rapide lorsqu'elle est illuminée à 532 nm ; ce résultat confirme ceux précédemment obtenus par

Poutaraud et al.²⁴, qui indiquaient que les longueurs d'onde les plus proches de 515 nm étaient les plus favorables à la phototransformation des protopigments. Il est à noter que pour les temps d'illumination plus long, la vitesse de transformation de la protohypéricine est similaire pour les deux longueurs d'onde. Nos résultats mettent en avant qu'au bout de 4 minutes d'illumination, lorsque nous avons évalué la quantité d'oxygène moléculaire produite, le rapport protohypéricine/hypéricine dans la solution était d'environ un pour les deux longueurs d'onde ; ce résultat permet de déterminer que la production d'oxygène moléculaire singulet par la protohypéricine n'est pas nulle mais est très réduite par rapport à celle de l'hypéricine.

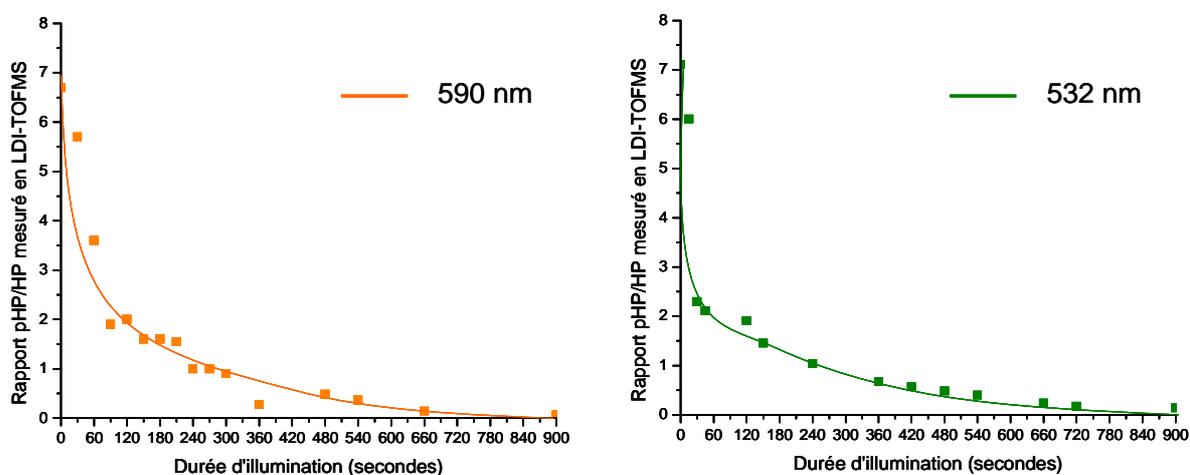


Figure VI. 13 : Cinétique de transformation de la protohypéricine en hypéricine sous illumination laser à 590 nm (orange) et 532 nm (vert)

²⁴ Poutaraud, A., et al., *Planta Medica*, 2001, **67**, 3, p 254

Conclusions du Chapitre :

Le protocole mis au point dans ce chapitre a permis, par l'utilisation de la sonde moléculaire diphénylisobenzofurane et sa quantification par GC-MS, d'évaluer la quantité d'oxygène moléculaire singulet produite par diverses solutions illuminées par laser pulsé (laser Nd-YAG muni d'un système à colorants).

Nous avons dans un premier temps montré que la pseudohypéricine, dont les valeurs de rendement quantique en oxygène singulet référencées dans la bibliographie différaient selon les études, produisait autant d'oxygène moléculaire singulet que l'hypéricine lorsqu'elles sont illuminées dans les mêmes conditions à 591 nm dans l'éthanol. L'étude d'un mélange équimolaire de ces composés n'a mis en évidence ni effet de synergie ni effet antagoniste entre les deux molécules.

Les analyses en LDI-TOFMS que nous avons menées sur les extraits issus de différentes formes de matériel végétal, fleurs broyées, sommitées fleurées, bourgeons et fleurs issues de pieds dont les bourgeons ont été protégés de la lumière du soleil, ont permis de mettre en avant qu'il était possible d'obtenir des extraits de Millepertuis contenant de façon très majoritaire des protopigments, protohypéricine et protopseudohypéricine (par rapport aux pigments hypéricine et pseudohypéricine). Pour cette raison nous avons également évalué la production d'oxygène moléculaire singulet de la protohypéricine, dont la synthèse a été réalisée à partir de son précurseur biosynthétique, l'émodine, extractible de l'écorce d'un autre végétal, *Cortex Frangulae*. Les résultats obtenus indiquent que la production d'oxygène moléculaire singulet par la protohypéricine est très faible par rapport à celle de l'hypéricine, et que sa transformation intervient de façon rapide durant les premières dizaines de secondes de l'illumination, que ce soit à 591 ou 532 nm.

Enfin, l'extrait de fleurs de Millepertuis a produit sous illumination laser une quantité d'oxygène moléculaire singulet supérieure à une solution d'hypéricine possédant la même absorbance à 591 nm ; le même phénomène a été constaté sous illumination à 591 et 532 nm. La participation des protopigments à ce phénomène est peu probable, en revanche une participation des molécules de la famille des chlorophylles est envisageable.

Chapitre VII

Millepertuis et milieu cellulaire

INTRODUCTION :	193
I. CULTURES CELLULAIRES	194
I. A. <i>Choix de la lignée cellulaire étudiée</i>	194
I. B. <i>Mode de culture</i>	195
II. STABILITE ET ETAT D'AGREGATION DU PHOTOSENSIBILISANT DANS LES DIFFERENTS MILIEUX D'INCUBATION POSSIBLES	195
II. A. <i>Etat d'agrégation des composés de référence dans un milieu d'incubation ne contenant pas de protéines</i>	195
II. B. <i>Influence de l'état d'agrégation de l'hypéricine sur son internalisation par les cellules</i>	196
III. CYTOTOXICITE DES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS	197
III. A. <i>Choix de la concentration en hypéricines pour les incubations</i>	197
III. B. <i>Préparation d'extraits dépourvus d'hyperforine</i>	198
III. C. <i>Choix du protocole</i>	201
III. C. 1. <i>Type de test de cytotoxicité</i>	201
III. C. 2. <i>Limitations concernant les extraits végétaux</i>	202
III. C. 3. <i>Durée d'incubation</i>	202
III. C. 4. <i>Extraits de Millepertuis testés</i>	203
III. D. <i>Résultats et discussion</i>	203
IV. ABSORPTION DES COMPOSES PHOTOACTIFS PAR LES CELLULES CANCEREUSES	206
IV. A. <i>Microscopie de fluorescence</i>	206
IV. B. <i>Protocole d'extraction des hypéricines et analyse des lysats par spectroscopie UV-Vis</i>	207
IV. B. 1. <i>Cinétiques d'absorption de l'hypéricine et d'un extrait de Millepertuis réalisé directement dans le DMSO</i>	207
IV. B. 2. <i>Comparaison des cinétiques d'internalisation de l'hypéricine et de la pseudohypéricine</i>	209
IV. B. 3. <i>Internalisation de la pseudohypéricine sur les lignées cellulaires MCF7, HT29 et A549</i>	211
IV. B. 4. <i>Influence de l'hypéroside et de la procyanidine B2 sur l'internalisation de l'hypéricine</i>	213
IV. B. 5. <i>Influence de l'hyperforine</i>	215
IV. B. 6. <i>Influence du solvant d'extraction du Millepertuis sur l'internalisation des composés photoactifs</i>	215
IV. B. 7. <i>Conclusions</i>	216
V. CARACTERISATION PAR SPECTROMETRIE DE MASSE DES COMPOSES INTERNALISES PAR LES CELLULES AY-27 MISES EN CONTACT AVEC LES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS	218
VI. EFFICACITE PHOTODYNAMIQUE IN VITRO DES EXTRAITS DE MILLEPERTUIS	225
VI. A. <i>Protocole d'évaluation</i>	225
VI. B. <i>Comparaison de la phototoxicité de l'hypéricine et de la pseudohypéricine</i>	227
VI. C. <i>Phototoxicité des extraits de Millepertuis</i>	230
VI. D. <i>Conclusions</i>	231
CONCLUSIONS :	233

Introduction :

Les résultats présentés dans le chapitre précédent ont montré qu'à concentration voisine en hypéricines, une solution d'hypéricine pure et un extrait de fleurs de Millepertuis produisent une quantité d'oxygène moléculaire singulet quasi équivalente pour des conditions d'illumination laser semblables à 591 nm. Dans le même temps, Skalkos et al. ont comparé la fluorescence des extraits de Millepertuis (extrait total ET et fraction polaire FP) avec celle de l'hypéricine¹, dans des conditions excluant une fluorescence des chlorophylles (excitation à 514 nm). Si le coefficient d'extinction molaire qu'ils ont trouvé pour l'hypéricine pure à 590 nm, $\epsilon=26250 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$, semble indiquer que la pureté de l'échantillon est inférieure à celle indiquée, leurs résultats mettent clairement en avant une fluorescence significative de l'extrait de Millepertuis, et une influence du pH sur cette fluorescence similaire à celle observée pour l'hypéricine. Ces résultats semblent prometteurs en vue d'une potentielle utilisation des extraits de Millepertuis pour le diagnostic et le traitement photodynamiques de lésions cancéreuses. C'est pourquoi il nous a semblé nécessaire de poursuivre nos recherches en milieu cellulaire, suite aux études menées dans le chapitre précédent en milieu éthanolique. Ce milieu de solvation nous a permis de nous affranchir des effets d'agrégation des photosensibilisants, en travaillant avec les hypéricines sous une forme monomérique. Ce milieu nous a également permis d'évaluer les productions d'oxygène moléculaire singulet des hypéricines dans un milieu où elles sont stables, ce qui n'est pas le cas des milieux physiologiques, notamment en ce qui concerne la pseudohypéricine. Enfin, le milieu éthanolique nous a permis d'utiliser la GC-MS pour le suivi de la décomposition de la sonde moléculaire DPBF ; une telle étude en milieu aqueux aurait nécessité la mise en place, soit d'un protocole d'extraction par un solvant organique de la sonde et de sa forme oxydée, soit d'une méthode de quantification par HPLC-UV.

Si plusieurs arguments étayent l'utilisation du milieu éthanolique pour la comparaison des productions d'oxygène moléculaire singulet des hypéricines et de l'extrait de Millepertuis, il s'avérait nécessaire à cette étape des recherches d'étudier le comportement des molécules d'intérêt dans des milieux plus proches des conditions physiologiques.

Nous avons donc étudié le degré de stabilité et l'état d'agrégation des photosensibilisants dans les milieux d'incubation typiquement utilisés pour les études *in vitro*, leur capacité à traverser la membrane cellulaire, ainsi que leur toxicité à l'obscurité et dans des conditions simulant un traitement photodynamique à 597 nm (λ_{max} pour l'hypéricine en milieu aqueux). Les résultats obtenus, ainsi que les données bibliographiques ayant contribué au choix des différents protocoles et matériels utilisés vont être précisés dans ce dernier chapitre.

¹ Skalkos, D., et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, **82**, 2, p 146

I. Cultures cellulaires

I. A. Choix de la lignée cellulaire étudiée

Les cellules AY-27 proviennent d'une lignée de cellules d'un cancer de la vessie à cellules de transition. Cette lignée est issue d'un cancer de la vessie induit chez une femelle de rat Fisher par le N-(4-[5-nitro-2-furyl]-2-thiazolyl)formamide.

Dans le cadre de l'étude que nous avons réalisée, notre choix s'est porté sur ces cellules pour plusieurs raisons. En effet, nous avons d'une part constaté lors de nos recherches bibliographiques que c'est pour les lésions de cet organe que nous avons trouvé le plus grand nombre d'informations concernant l'efficacité de l'hypéricine avec ses mécanismes de photodiagnostic et de thérapie photodynamique, notamment grâce aux nombreux travaux de l'équipe de Peter A. M. De Witte².

De plus, l'instillation, souvent utilisée dans le cas de lésions de la vessie car plus efficace que l'injection en intraveineuse³, nous a semblé intéressante pour deux raisons :

- ce mode d'administration est proche du modèle que l'on réalise en mettant simplement en contact une monocouche cellulaire avec le médicament,
- dans le cas de notre étude qui porte sur l'extrait de Millepertuis, nous n'avons pas eu à nous préoccuper de la biodisponibilité des composés de nos extraits. En effet un extrait de Millepertuis n'est pas représentatif des concentrations trouvées dans le sang après une injection en intraveineuse, non seulement en valeur absolue mais également en ce qui concerne les rapports de concentration entre les divers composés. Par exemple dans le cas de deux molécules de structure proche, l'hypéricine et de la pseudohypéricine, Kerb et al. ont trouvé une biodisponibilité sensiblement différente⁴.

Enfin, l'existence d'un modèle de greffe associé aux cellules AY27⁵, réalisable par instillation d'une suspension cellulaire concentrée après conditionnement de l'épithélium par une solution d'acide chlorhydrique (HCl 0,1N) puis neutralisation par une solution de potasse (KOH 0,1N), permettait d'entrevoir une mise en œuvre rapide d'essais *in vivo* dans le cadre de perspectives de ce travail.

² Agostinis, P., *et al.*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2002, **34**, 3, p 221

³ Gronlund-Pakkanen, S., *et al.*, *British Journal of Urology International*, 2003, **92**, 1, p 125

⁴ Kerb, R., *et al.*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1996, **40**, 9, p 2087

⁵ Xiao, Z., *et al.*, *British Journal of Cancer*, 1999, **81**, p 638

I. B. Mode de culture

Les cellules AY-27 ont été remises en culture une fois par semaine, une fois la confluence quasi-atteinte ; elles ont été décollées par trypsination, comptées etensemencées à une concentration de 10^4 cellules/mL. Les lignées de cellules cancéreuses immortalisées ne sont pas stables dans le temps, et après un certain nombre de remises en culture, en général une quinzaine, la confluence des cultures à 10^4 cellules/mL est atteinte en moins d'une semaine. A ce stade nous avons échangé nos cellules pour du matériel fraîchement décongelé. Le milieu de culture était du RPMI 1640 additionné de 9% de Sérum de Veau Fœtal inactivé (SVF) et de 9% de complément (contenant pyruvate de sodium, acides aminés essentiels, acides aminés non essentiels, vitamines, L-glutamine, L-sérine, L-asparagine, pénicilline, streptomycine).

II. Stabilité et état d'agrégation du photosensibilisant dans les différents milieux d'incubation possibles

Il nous est apparu indispensable d'étudier dans un premier temps le comportement des agents photosensibles utilisés dans des milieux typiquement utilisés pour les incubations dans les études in vitro. Nous avons porté notre choix sur le milieu de culture RPMI 1640.

II. A. Etat d'agrégation des composés de référence dans un milieu d'incubation ne contenant pas de protéines

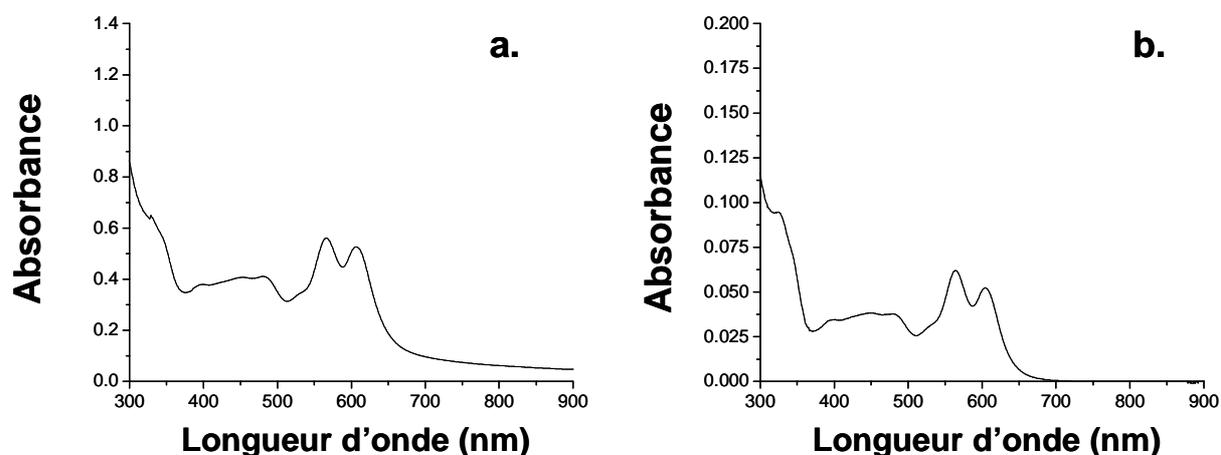


Figure VII. 1 : Spectres UV-Visible de l'hypéricine à 10^{-4} M (a.) et 10^{-5} M (b.) dans du milieu RPMI 1640

Les spectres présentés sur la Figure VII. 1 correspondent à des solutions d'hypéricine à 10^{-5} (b.) et 10^{-4} M (a.) préparées dans du milieu de culture RPMI 1640 avec une proportion de solvant organique (DMSO) de 1% en volume ; ils indiquent, compte-tenu du rapport d'intensité entre les deux bandes d'absorption de plus faible énergie, qu'à ces concentrations le photosensibilisant se trouve vraisemblablement sous une forme oligomérique. Le spectre d'absorption mesuré à 10^{-4} M présente aux hautes longueurs d'onde (>700 nm) une absorbance non nulle qui pourrait témoigner de la présence d'agrégats de taille importante, qui toutefois ne sont pas visibles à l'œil nu.

II. B. Influence de l'état d'agrégation de l'hypéricine sur son internalisation par les cellules

Nous avons évalué les concentrations intracellulaires mesurées pour différents états d'agrégation de l'hypéricine dans le milieu d'incubation. Ces résultats sont présentés sur la Figure VII. 2.

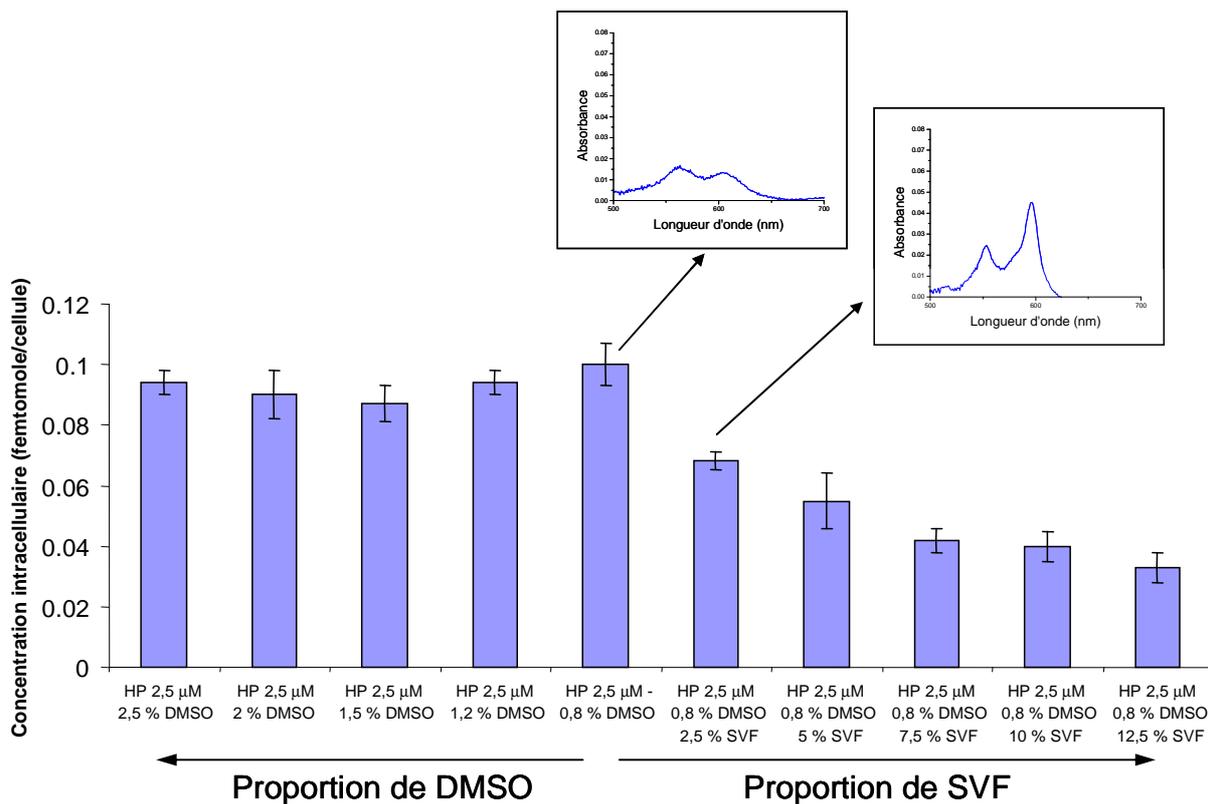


Figure VII. 2 : Influence de la proportion en DMSO et en SVF dans le milieu d'incubation sur le degré d'internalisation de l'hypéricine (incubation de quatre heures)

Ils indiquent que l'internalisation de l'hypéricine est peu sensible à la proportion de DMSO mais qu'en revanche l'ajout de protéines dans le milieu réduit de façon significative la

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

quantité d'hypéricine absorbée par les cellules, avec une diminution de plus de la moitié pour 10 % de SVF dans le milieu. Les spectres d'absorption UV-Visible obtenus pour les différentes solutions d'incubation, également présentés sur la Figure VII. 2, indiquent que 2,5% de SVF permettent de monomériser l'hypéricine (rapport d'intensité de 2 entre les bandes d'absorption à 597 et 550 nm).

III. Cytotoxicité des extraits de Millepertuis

III. A. Choix de la concentration en hypéricines pour les incubations

Les conditions d'incubation que nous avons utilisées ont été dictées par diverses considérations :

- les durées d'incubation ne devaient pas excéder 4 heures pour correspondre aux conditions utilisées en clinique avec l'hypéricine ;
- compte-tenu de l'influence de la présence de protéines dans le milieu d'incubation, nous avons jugé utile d'effectuer des expériences avec et sans protéines dans le milieu ;
- la concentration d'incubation devait conduire à une détection par spectrométrie de masse et une quantification par spectrophotométrie UV-Vis des hypéricines internalisées par les cellules, à la fois en l'absence et en présence de protéines, tout en restant compatible avec la gamme de concentrations utilisée en clinique ;
- les concentrations intracellulaires obtenues devaient permettre de détruire les cellules cancéreuses AY-27 par traitement photodynamique sans observer l'induction de dommages cellulaires dûs uniquement à l'irradiation lumineuse (laser pulsé) ;
- les concentrations en hypéricines dans les milieux d'incubation devaient être compatibles avec l'obtention d'extraits de Millepertuis assez concentrés pour qu'une dilution de la solution mère d'extrait au centième soit suffisante afin que la proportion de solvant organique dans le milieu d'incubation n'excède jamais 1% ; en effet la présence d'autres molécules majoritaires dans les extraits de Millepertuis ne permet pas d'atteindre les mêmes solubilités que pour l'hypéricine pure ;

Afin de conjuguer ces différents objectifs, nous avons choisi une concentration d'incubation de 2,5 μ M. D'après les données présentées en 2001 par Kamuhabwa et al.⁶, l'incubation des

⁶ Kamuhabwa, A. R., et al., *Photochemistry and Photobiology*, 2001, **74**, 2, p 126

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

cellules pendant deux heures permet alors d'obtenir une prolifération cellulaire quasi nulle pour des doses de lumières allant de 0.9 J/cm² à 3,6 J/cm² ($\lambda=595$ nm). Un test de faisabilité a montré qu'il était possible d'obtenir des extraits de Millepertuis à 5.10⁻⁴M en hyperforine dans le DMSO, et donc de préparer un milieu d'incubation contenant seulement 1% de DMSO.

III. B. Préparation d'extraits dépourvus d'hyperforine

Les recherches bibliographiques que nous avons réalisées ont montré que parmi les composés présents dans la fleur de Millepertuis, certains, tels que l'hyperforine, présentent des propriétés cytotoxiques⁷. Afin d'évaluer l'influence de ce composé notamment, il a été nécessaire d'obtenir des extraits de fleurs n'en contenant pas. Nous avons donc envisagé de réaliser une préextraction du matériel végétal avec le chloroforme, un solvant permettant d'extraire l'hyperforine et pas les naphthodianthrones. Les extraits obtenus par ce protocole (trois préextractions au chloroforme) ont ensuite été analysés par spectrométrie de masse. Toutefois, ils semblaient encore contenir de l'hyperforine, le protocole a donc été modifié, et au final, deux préextractions au chloroforme suivies de deux préextractions à l'hexane ont permis d'obtenir des extraits dépourvus d'hyperforine.

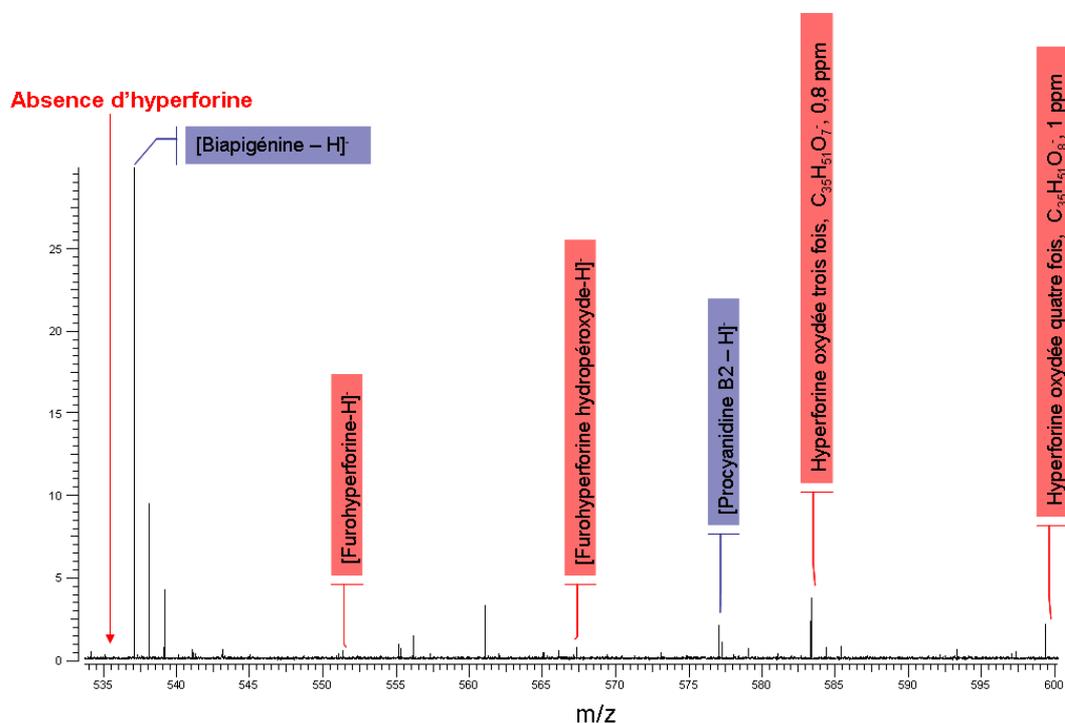


Figure VII. 3 : Spectre ESIFTICRMS en mode de détection **négatif** de l'extrait obtenu après préextraction du matériel végétal avec les solvants apolaires chloroforme et hexane

⁷ Donà, M., et al., *Cancer Research*, 2004, **64**, p 6225

La Figure VII. 3 présente le spectre obtenu en ESI-FTICRMS (mode de détection négatif) pour un tel extrait. Le spectre présenté est un agrandissement de la zone correspondant aux hyperforines ; il est à noter que le reste du spectre est identique à celui obtenu pour l'extrait total TE, avec la détection de l'hypéricine (m/z 503) et de la pseudohypéricine (m/z 519). Hormis l'absence d'hyperforine (m/z 535), on note la quasi absence de ses dérivés mono et di-oxydés, la furohyperforine (m/z 551) et la furohyperforine hydropéroxyde (m/z 568). En revanche, l'ion correspondant à la molécule d'hyperforine oxydée trois fois, est bien détecté ; le rapport entre son intensité et celle de l'ion à m/z 539 ([Biapigénine – H]⁺) est quasi identique à celui calculé sur le spectre de l'extrait méthanolique simple, présenté dans le Chapitre V. Sa présence s'explique par sa polarité, supérieure à celle de l'hyperforine, qui le rend moins sensible à l'extraction par les solvants apolaires. Ce protocole d'extraction permet également de faire apparaître une forme de l'hyperforine oxydée quatre fois, à m/z 599 ; compte tenu de sa faible intensité, on ne peut pas statuer sur une réelle apparition de ce composé avec la modification du protocole d'extraction. Le spectre obtenu en mode détection positif, présenté sur la Figure VII. 4, ainsi que l'agrandissement de la zone du spectre de masse correspondant aux hyperforines présenté sur la Figure VII. 5, confirme l'absence d'hyperforine, mais la sensibilité meilleure de ce mode de détection pour ses dérivés permet de mettre en évidence la présence résiduelle de furohyperforine et furohyperforine hydropéroxyde.

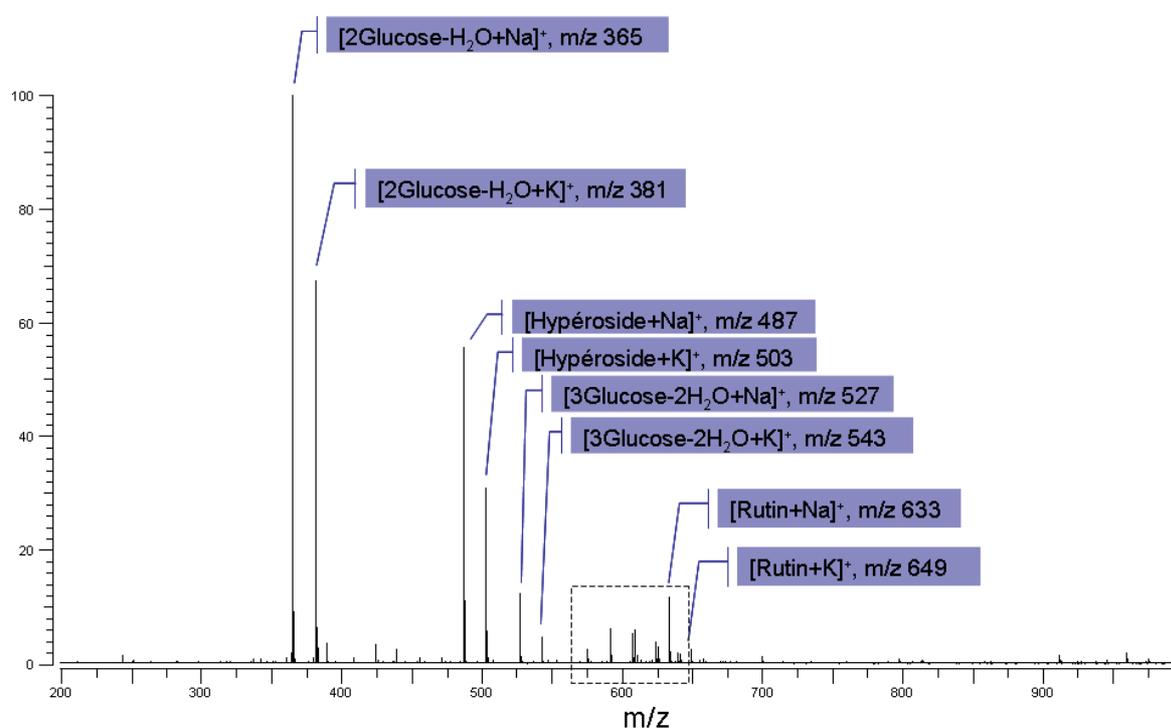


Figure VII. 4 : Spectre ESIFTICRMS en mode de détection **positif** de l'extrait obtenu après préextraction du matériel végétal avec les solvants apolaires

Par ailleurs, ce mode de détection permet de confirmer la présence des molécules d'hyperforine oxydée trois et quatre fois ; de tels taux d'oxydation n'ont encore jamais été observés sur la molécule d'hyperforine. Il est à noter que dans leur étude, Fuzzati et al.⁸ ont constaté que les mécanismes d'oxydation de l'hyperforine dans l'hexane et dans le méthanol étaient différents, comme présenté sur la Figure VII. 6.

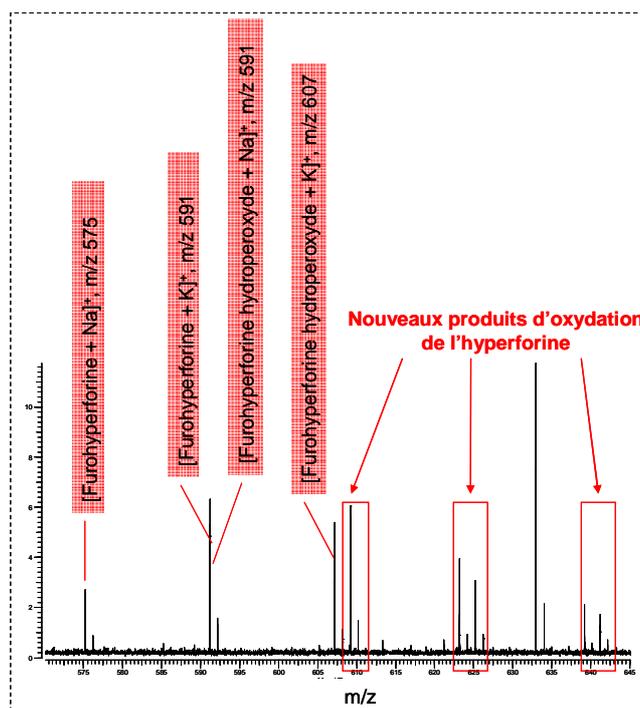


Figure VII. 5 : Agrandissement de la zone en pointillés du spectre ESI-FTICRMS présenté sur la Figure VII. 4

Dans notre cas, l'extraction successive du matériel végétal avec de l'hexane puis avec du méthanol pourrait conduire à deux réactions d'oxydation ; en effet la Figure VII. 6 met en avant la possibilité d'effectuer sur la même molécule d'hyperforine les deux oxydations de gauche, ou les deux oxydations de droite, conduisant, si ces oxydations vont jusqu'à la forme hydroperoxyde, à de l'hyperforine oxydée quatre fois. Le fait que l'on ait également retrouvé de l'hyperforine oxydée trois fois dans l'extrait méthanolique n'est pas en contradiction avec cette théorie, car sur les chromatogrammes obtenus par Fuzzati et al. dans le cadre de la dégradation de l'hyperforine en milieu méthanolique on trouve également un pic de faible intensité au temps de rétention (20 minutes) correspondant à l'un des produits de dégradation observé en milieu hexane ; le mécanisme d'oxydation observé en milieu hexane pourrait donc s'observer de façon minoritaire dans le méthanol.

⁸ Fuzzati, N., et al., *Journal of Chromatography A*, 2001, **926**, 1, p 187

Les propriétés de ces dérivés oxydés de l'hyperforine sont relativement mal connues, et nous ne pouvons pas préjuger de leur éventuelle cytotoxicité. Cependant, compte tenu de leur faible intensité, et de leur caractère plus polaire que l'hyperforine (qui restreint leur effet en milieu cellulaire), nous n'avons pas souhaité nous en affranchir afin de ne pas allonger encore le procédé d'extraction.

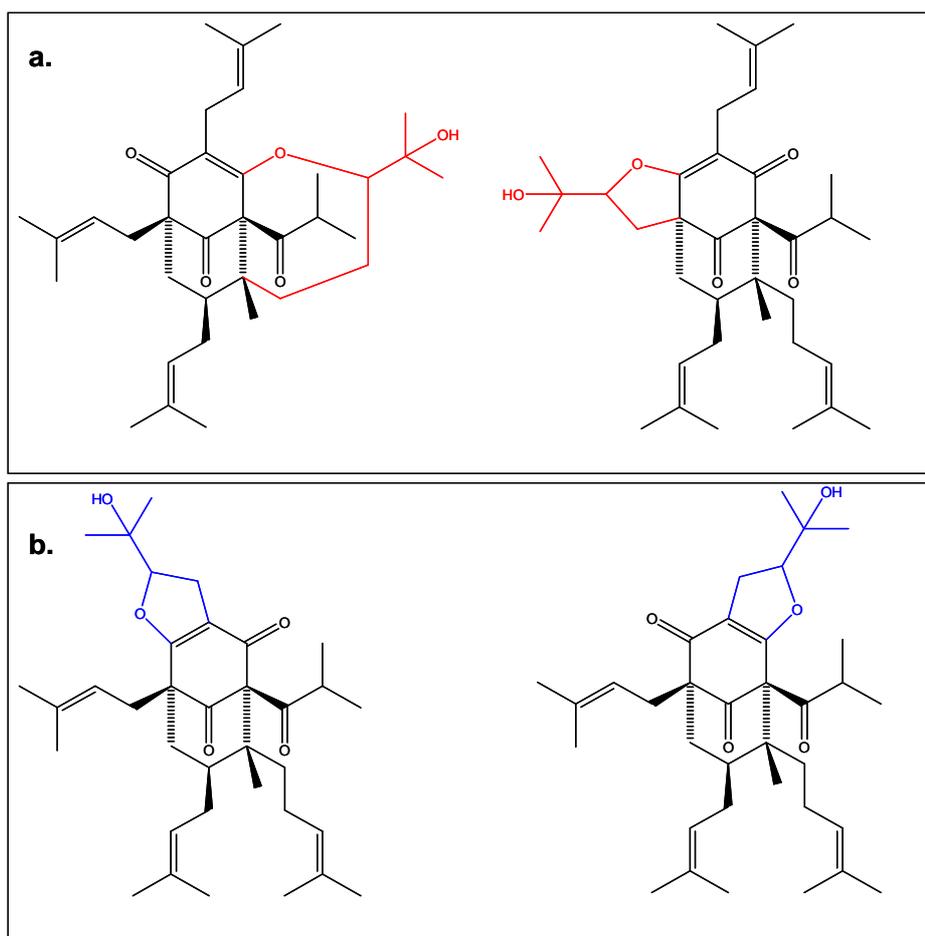


Figure VII. 6 : Voies de mono-oxydation de l'hyperforine proposées par Fuzzati et al. d'après une étude par LC-MS dans a. le méthanol (en présence d'air), b. le *n*-hexane (MW = 552 g.mol⁻¹ pour tous les composés)

III. C. Choix du protocole

III. C. 1. Type de test de cytotoxicité

La cytotoxicité de substances peut être évaluée de deux manières différentes : par ce que l'on appelle des tests MTT, qui donnent un résultat proportionnel au nombre de cellules vivantes dans l'échantillon et à leur activité métabolique (le principe général en a été

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

présenté dans le chapitre III), et par des essais clonogéniques qui tiennent compte de la capacité des cellules traitées à former des colonies.

Les tests MTT sont en général complétés par les essais clonogéniques. Ces tests consistent à traiter les cellules avec le médicament et à les remettre ensuite en culture pour deux semaines. Chaque cellule viable va donc se diviser et conduire à une colonie, et le comptage des colonies permet de déterminer la quantité de cellules viables sur le long terme. Cependant il a été montré que la première fonction altérée par un traitement photodynamique avec l'hypéricine est la fonction mitochondriale⁹ ; le test MTT, qui résulte de la transformation d'un sel de tétrazolium exogène par les mitochondries des cellules viables, est donc tout indiqué pour évaluer le taux de mortalité induit par l'hypéricine et les extraits de Millepertuis.

III. C. 2. Limitations concernant les extraits végétaux

Il est à noter que les tests MTT réalisés avec des extraits végétaux, et notamment le Millepertuis, doivent faire l'objet d'une attention toute particulière car il a été démontré que certains composés présents dans ces extraits sont capables de transformer le MTT en formazan^{10 11}. Il est donc nécessaire de rincer plusieurs fois les cellules incubées avec du milieu frais avant de les mettre en contact avec le MTT.

III. C. 3. Durée d'incubation

Les tests de cytotoxicité que nous avons réalisés ont concerné des incubations d'une durée maximum de 4 heures, correspondant à la durée d'incubation maximum utilisée pour l'hypéricine. Les tests de toxicité généralement réalisés sur de nouvelles substances correspondent généralement à des temps d'incubation de 24h, cependant dans le cas de l'instillation intravésicale, les xénobiotiques ne sont en contact avec l'organisme que le temps de l'instillation, et leur diffusion dans le corps est très limitée, voire inexistante. Par exemple dans le cas de l'ALA (acide aminolévulinique), on constate que seulement 1% du photosensibilisant atteint le circuit sanguin, le reste étant rapidement éliminé avec l'urine¹². De ce point de vue l'hypéricine présente un avantage certain sur d'autres

⁹ Theodossiou, T. A., *et al.*, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, **38**, 11, p 1946

¹⁰ Shoemaker, M., *et al.*, *Journal of Ethnopharmacology*, 2004, **93**, 2-3, p 381

¹¹ Bruggisser, R., *et al.*, *Planta Medica*, 2002, 5, p 445

¹² Dalton, J. T., *et al.*, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2002, **301**, 2, p 507

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

photosensibilisateurs puisqu'on n'en retrouve pas dans le plasma ¹³ même après des instillations de 4 heures à 30 µM (limite de détection 10⁻⁹M).

Une durée de demi-vie de 4 heures a été trouvée pour l'hypéricine (après 4 heures d'incubation à 30 µM) dans les cellules de la vessie in vivo par Kamuhabwa et al. ¹⁴. Quant aux autres composés présents dans les extraits de Millepertuis et susceptibles de traverser la membrane des cellules de la vessie, notamment les polyphénols, ils présentent un métabolisme rapide en milieu cellulaire et un effet de ces composés sur la viabilité des cellules au-delà de 24 heures est peu probable.

III. C. 4. Extraits de Millepertuis testés

Les extraits testés ici pour leur cytotoxicité correspondent à :

- un extrait des fleurs réalisé directement dans le DMSO, appelé extrait total ET
- un extrait réalisé dans le DMSO avec des fleurs préextraites avec solvants apolaires, correspondant la fraction polaire du Millepertuis, notée FP
- la fraction apolaire du Millepertuis, notée FA, évaporée puis reprise dans le DMSO.

III. D. Résultats et discussion

Les résultats obtenus, présentés sur la Figure VII. 7, montrent que ni l'hypéricine, ni aucun des trois extraits de Millepertuis testés ne présente de toxicité marquée (% de prolifération < 80%) sur les cellules AY27 en l'absence de lumière après une incubation de quatre heures. Nos résultats diffèrent de ceux présentés dans le même temps par Roscetti et al., en 2004 ¹⁵, et Schmitt et al., en 2006 ¹⁶, qui ont trouvé une cytotoxicité importante de ces extraits à l'obscurité, dans les conditions qu'ils ont étudiées. Cependant, certains éléments sont à prendre en compte afin de pouvoir comparer les résultats.

¹³ Kamuhabwa, A. A. R., *et al.*, *International Journal of Cancer*, 2001, **97**, 2, p 253

¹⁴ Kamuhabwa, A. A. R., *et al.*, *International Journal of Cancer*, 2001, **97**, 2, p 253

¹⁵ Roscetti, G., *et al.*, *Phytotherapy Research*, 2004, **18**, 1, p 66

¹⁶ Schmitt, L. A., *et al.*, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 2006, **54**, 8, p 2881

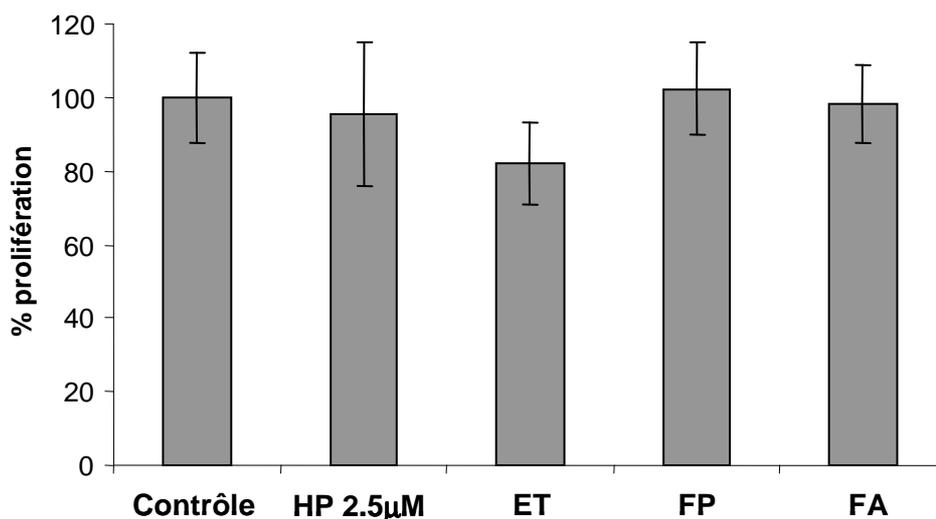


Figure VII. 7 : Tests de cytotoxicité réalisés avec l'hypéricine pure, l'extrait total (ET) de Millepertuis, ses fractions polaire (FP) et apolaire (FA), concentration en hypéricines des solutions d'incubation : 2,5 µM)

En effet, l'étude de Roscetti et al. concerne des cellules qui ont été incubées avec les extraits de Millepertuis pendant **24 heures ou 48 heures**, soient des temps d'incubation beaucoup plus longs que les nôtres. De plus ce sont des cellules en suspension qui ont été utilisées, et non des monocouches cellulaires, ce qui induit une meilleure pénétration des composés dans la cellule, qu'ils soient toxiques ou non, puisque la totalité de la surface membranaire est au contact du milieu d'incubation. Enfin, si les concentrations d'incubation utilisées sont raisonnables (de $10^{-6}M$ à $10^{-5}M$ en hypéricines), le protocole d'extraction et d'évaluation de la concentration en hypéricines ne fait pas état de la présence potentielle de protopigments dans l'extrait. Les auteurs mentionnent que les fleurs sont conservées à l'abri de la lumière et que la concentration totale en hypéricine est calculée sur la base d'un coefficient d'extinction molaire de $46.000 M^{-1}.cm^{-1}$ à 590 nm, cette concentration est donc peut être sous-estimée si l'extrait contient des protopigments.

Quant aux résultats obtenus par Schmitt et al., ils sont eux aussi le fruit d'incubations de plus longue durée (**24 heures**). L'objectif n'en était pas de déterminer si les extraits de Millepertuis étaient des agents photosensibles potentiels, mais d'étudier des extraits préparés de façon plus originale que les extraits méthanoliques ou éthanoliques. Ils ont étudié sur trois lignées cellulaires différentes la toxicité à l'obscurité et à la lumière (lumière ambiante) de divers extraits de Millepertuis : extraits réalisés dans des solvants polaires (EtOH pur, EtOH 70%), apolaires (hexane ou chloroforme), ou extraits réalisés avec un solvant polaire après préextraction du matériel végétal avec un solvant apolaire. Les résultats obtenus sont peu encourageants avec une cytotoxicité à l'obscurité marquée pour

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

tous les extraits et une photocytotoxicité très limitée. Toutefois leurs résultats indiquent que la préextraction du matériel végétal au chloroforme ou à l'hexane permet de restreindre cette cytotoxicité. Il est à noter que pour les trois lignées cellulaires qu'ils ont étudiées (fibroblastes de souris NIH3T3, cellules de cancer du colon humain SW480 et kératinocytes humains HaCaT), une concentration importante d'hypericine, 20 μM , doit être utilisée pour assurer une destruction significative des cellules dans les conditions d'irradiation utilisées (5,2 J/cm² pendant 30 minutes). Pour certains types de cellules (NIH3T3 et HaCaT), la cytotoxicité mesurée à l'obscurité est non négligeable. Ces lignées cellulaires ne sont donc pas des modèles idéaux pour étudier l'activité photodynamique des extraits de Millepertuis, et les résultats obtenus sont difficilement interprétables puisque la dose d'hypericines délivrée par les extraits, par exemple 8,8 μM dans le cas de l'extrait 100% éthanol, est inférieure à la dose d'hypericine nécessaire pour obtenir une phototoxicité marquée.

Nous avons pu également constater une légère baisse de la prolifération cellulaire dans le cas de l'extrait total. Au vu des recherches bibliographique que nous avons effectuées, il semble plausible que cette légère cytotoxicité observée pour l'extrait total est en partie due à l'hyperforine. D'après l'étude publiée en 2005 par Skalkos et al., et qui ont montré que la concentration d'hyperforine dans la fraction apolaire (0,94 $\mu\text{g/mL}$) du Millepertuis (obtenue par extraction du matériel végétal avec de l'éther de pétrole) était inférieure à la dose nécessaire pour observer sa cytotoxicité (1,8 $\mu\text{g/mL}$)¹⁷, d'autres composés de la fraction apolaire exerceraient une action cytotoxique. L'hyperforine est un composé très instable et ses produits de dégradation, qui jusqu'alors n'ont jamais fait l'objet d'études de cytotoxicité, pourraient être également cytotoxiques.

Il est intéressant de noter que nous n'avons retrouvé cet effet ni sur la fraction polaire FP, ni sur la fraction apolaire FA, bien qu'il soit impossible, compte tenu du protocole d'extraction utilisé, que l'extrait total contienne un composé qui ne se retrouve ni dans la fraction polaire, ni dans la fraction apolaire. Cet effet résulte sans doute de la synergie observée par Hostanska et al.¹⁸ (cf Chapitre II) entre l'hypericine et l'hyperforine concernant la cytotoxicité de cette dernière.

Les tests de cytotoxicité que nous avons réalisés ont donné des résultats encourageants concernant une possible utilisation des extraits de Millepertuis en PDT et PDD, avec une préférence pour la fraction polaire ne contenant pas d'hyperforine. L'orientation de notre étude vers les lésions de la vessie semble être un choix judicieux car les traitements par instillations permettent de limiter la durée du contact entre l'agent photosensible et l'organe

¹⁷ Skalkos, D., et al., *Planta Medica*, 2005, 11, p 1030

¹⁸ Hostanska, K., et al., *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2003, 56, 1, p 121

traité. Ainsi, les extraits de Millepertuis qui se sont dans d'autres études avérés cytotoxiques dans le cas d'incubations de 24 ou 48 heures ne le sont pas pour des temps d'incubation plus courts de 4 heures qui correspondent à ceux utilisés en clinique pour la vessie.

IV. Absorption des composés photoactifs par les cellules cancéreuses

Si la détermination de la cytotoxicité à l'obscurité est une étape-clé de l'étude in vitro des propriétés d'une formulation de photosensibilisateur(s), il est également important de caractériser la cinétique d'incorporation des molécules actives par les cellules ciblées. Les études in vitro ne permettent généralement pas de vérifier la spécificité de l'absorption des molécules actives par les cellules cancéreuses, sauf dans le cas de molécules vectorisées ; les extraits de Millepertuis n'échappent pas à cette règle, et Kapsokalyvas et al.¹⁹, qui ont en 2005 étudié la phototoxicité à 532 nm de l'extrait total et de la fraction polaire du Millepertuis sur des cellules leucémiques HL-60 et sur des cellules souches hématopoïétiques (cellules saines issues de sang ombilical et précurseur des lignées de cellules du sang), n'ont pas mis en évidence de spécificité envers les cellules cancéreuses. Cependant, leur étude a permis de déterminer que l'incubation des cellules avec la fraction polaire du Millepertuis générait une fluorescence (après excitation à 543 nm) au niveau des membranes de la cellule et du noyau, ainsi que dans le cytoplasme avec une fluorescence plus marquée sur certaines zones situées près du noyau, pouvant correspondre à l'appareil de Golgi et au réticulum endoplasmique. Cette localisation semble correspondre à celle observée pour l'hypéricine sur d'autres types de cellules, bien que les avis divergent à ce sujet. Toutefois, leur étude ne permet pas d'effectuer une comparaison directe. C'est ce que nous avons souhaité faire dans un premier temps sur nos cellules AY-27, avant de procéder à une analyse par spectrophotométrie UV-Visible des cellules incubées et à la détermination des cinétiques d'incorporation des composés d'intérêt.

IV. A. Microscopie de fluorescence

Les images prise en microscopie à épifluorescence présentées sur la Figure VII. 8 correspondent à des cellules incubées, à gauche, avec l'hypéricine à $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$, et à droite, avec la fraction polaire de l'extrait de fleurs de Millepertuis, normalisée à $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ en hypéricines (hypéricine+pseudohypéricine). Il est à noter qu'aucune autofluorescence des cellules non incubées n'a été constatée.

¹⁹ Kapsokalyvas, D., et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2005, **80**, 3, p 208

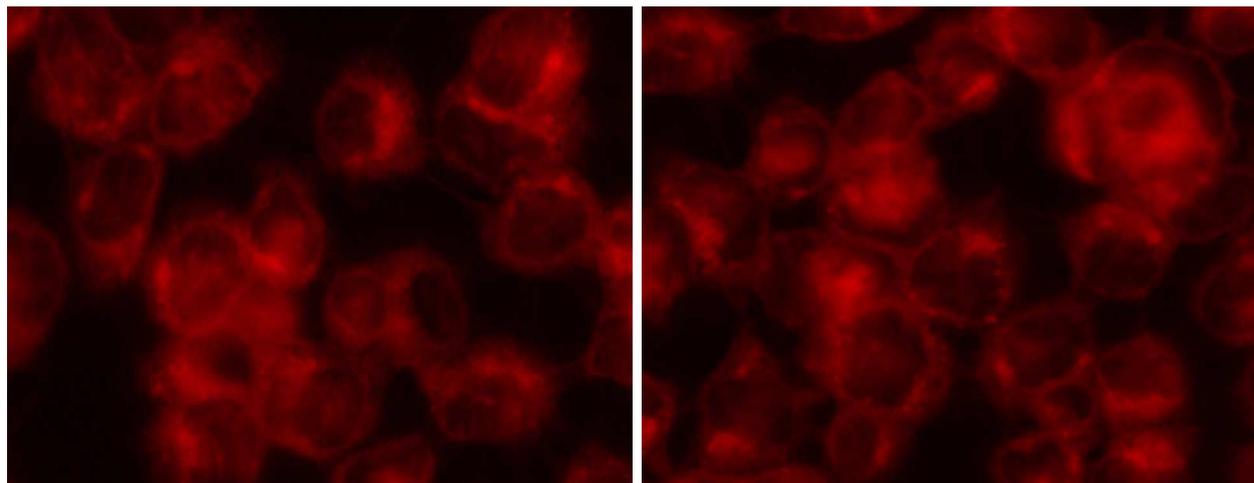


Figure VII. 8 : Images obtenues en microscopie à épifluorescence sur les cellules AY-27 incubées pendant 4 h avec l'hypericine à $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ (à gauche) et la fraction polaire du Millepertuis (extrait réalisé directement dans le DMSO normalisé à $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ en hypericines, à droite)

Ces images révèlent une distribution intracellulaire de photosensibilisant semblable pour l'hypericine utilisée seule, et pour la pseudohypericine et l'hypericine issues de l'extrait de Millepertuis.

IV. B. Protocole d'extraction des hypericines et analyse des lysats par spectroscopie UV-Vis

IV. B. 1. Cinétiques d'absorption de l'hypericine et d'un extrait de Millepertuis réalisé directement dans le DMSO

Si les extraits de Millepertuis ont fait l'objet de quelques études faisant état de leurs propriétés phototoxiques en milieu cellulaires, l'étape d'internalisation des agents photosensibles au sein des cellules cancéreuses n'a pas été étudiée. La Figure VII. 9 présente les concentrations intracellulaires mesurées (d'après le protocole d'incubation et de lyse des cellules présenté dans le Chapitre III) pour des incubations d'une durée maximum de quatre heures. Ces expériences ont été menées avec (Figure VII. 9, bas) et sans (Figure VII. 9, haut) protéines dans le milieu d'incubation. La proportion de SVF a été fixée à 10% compte-tenu des résultats obtenus dans la partie II. B, qui semblent indiquer que cette concentration permet de monomériser toute l'hypericine lorsqu'on travaille à $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$; d'autre part, cette proportion correspond à celle de notre milieu de culture cellulaire.

En l'absence de protéines, l'évolution de la concentration intracellulaire en hypericine est quasi linéaire pour les durées d'incubation étudiées ; en revanche dans le cas de l'extrait total de Millepertuis (ET), dès les premières étapes d'incubation les concentrations

intracellulaires en hypéricines sont supérieures à la valeur trouvée dans le cas de l'hypéricine pure. Pour les temps d'incubation plus longs, les concentrations mesurées ont tendance à se rapprocher jusqu'à être sensiblement égales pour $t = 4$ heures. Afin de confirmer la meilleure internalisation constatée pour les temps d'incubation courts, cette expérience a été réitérée avec la fraction polaire (FP) de l'extrait de Millepertuis ; en effet compte-tenu de la légère cytotoxicité observée pour l'extrait total, une perméabilisation des cellules pourrait être responsable de la meilleure internalisation des composés photosensibles. Les concentrations intracellulaires obtenues avec FP sont sensiblement identiques à celles obtenues avec ET, confirmant le résultat précédemment obtenu.

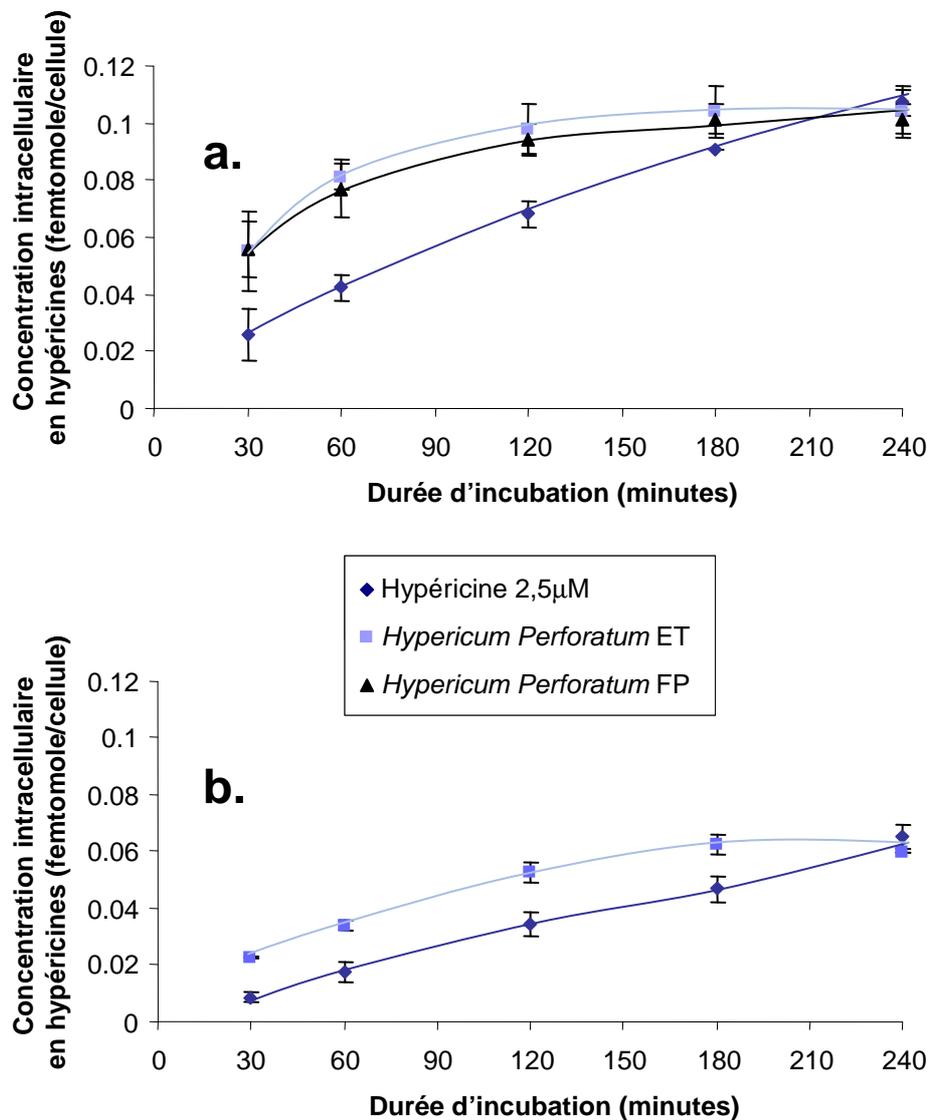


Figure VII. 9 : Cinétiques d'absorption des hypéricines par des cellules AY-27 incubées avec de l'hypéricine, de l'extrait total (ET) et de la fraction polaire (FP) du Millepertuis (solutions normalisées à 2,5µM d'hypéricines) ; a. : en l'absence de protéines dans le milieu d'incubation ; b. avec un milieu d'incubation contenant 10% de protéines (Sérum de Veau Foetal SVF)

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

Nous n'avons pas entrepris de réaliser des incubations plus longues, car des instillations de 4 heures ne sont souvent pas réalisables dans la pratique en raison de la difficulté de faire garder le liquide d'instillation au patient pendant une si longue durée. De ce point de vue nos résultats sont intéressants puisqu'ils montrent que l'utilisation des extraits de Millepertuis pour l'instillation intravésicale permet d'obtenir une concentration intracellulaire en hypéricines (hypéricine et pseudohypéricine) plus élevée en un temps plus court.

Les résultats obtenus en présence de protéines sont compatibles avec les données fournies dans la littérature en ce qui concerne l'internalisation de l'hypéricine ; en effet on constate que les concentrations intracellulaires sont inférieures à celles obtenues en l'absence de protéines, car les complexes hypéricine-protéine traversent moins facilement la barrière membranaire que les agrégats présents dans les solutions d'incubation sans protéines. Cependant il est intéressant de noter que tout comme dans le cas de milieu sans protéines, là encore, l'extrait de Millepertuis conduit à une meilleure internalisation des composés photoactifs hypéricine et pseudohypéricine, notamment pour les temps d'incubation les plus courts.

Afin de préciser l'origine de cette meilleure internalisation, diverses hypothèses ont été émises et les expériences que nous avons réalisées pour les confirmer ou les infirmer vont être présentées maintenant.

IV. B. 2. Comparaison des cinétiques d'internalisation de l'hypéricine et de la pseudohypéricine

Dans un premier temps nous avons évalué la cinétique d'incorporation de la pseudohypéricine par les cellules AY-27, à la même concentration que celle utilisée pour l'hypéricine. Les résultats, présentés sur la Figure VII. 11, indiquent que la concentration intracellulaire en pseudohypéricine est identique à celle mesurée pour l'hypéricine jusqu'à 1h30 d'incubation. Au-delà de cette durée, la concentration intracellulaire en pseudohypéricine n'évolue plus ; ce comportement de la pseudohypéricine permet d'expliquer l'allure observée précédemment pour les extraits de Millepertuis.

Si nous avons montré dans le début de ce chapitre que l'hypéricine et la pseudohypéricine se trouvent sous forme agrégée lorsqu'elles sont solubilisées dans le milieu RPMI dans cette gamme de concentration, nous n'avons pas d'information supplémentaire quant à la

structure de ces agrégats et à la façon dont ils sont susceptibles de s'organiser lorsque les deux photosensibilisants sont ensemble en solution. Les analyses ESI-FTICRMS que nous avons menées dans le Chapitre V ont montré que cette technique permettait d'observer la formation d'un dimère d'hypéricine (HP) à m/z 1007 lorsqu'une solution fraîchement préparée était analysée en mode détection négatif. Pour cette raison, nous avons entrepris l'analyse ESI-FTICRMS en mode de détection négatif d'une solution contenant $1,25 \mu\text{M}$ d'hypéricine (HP) et $1,25 \mu\text{M}$ de pseudohypéricine (PHP), présentée sur la Figure VII. 10 ; elle révèle la formation non seulement de dimères de type HP-HP à m/z 1007 et PHP-PHP à m/z 1039, mais également d'un dimère mixte HP-PHP à m/z 1023. Si ce résultat obtenu en phase gaz ne peut être transposé directement en phase liquide, la présence d'agrégats mixte en phase liquide est plus qu'envisageable.

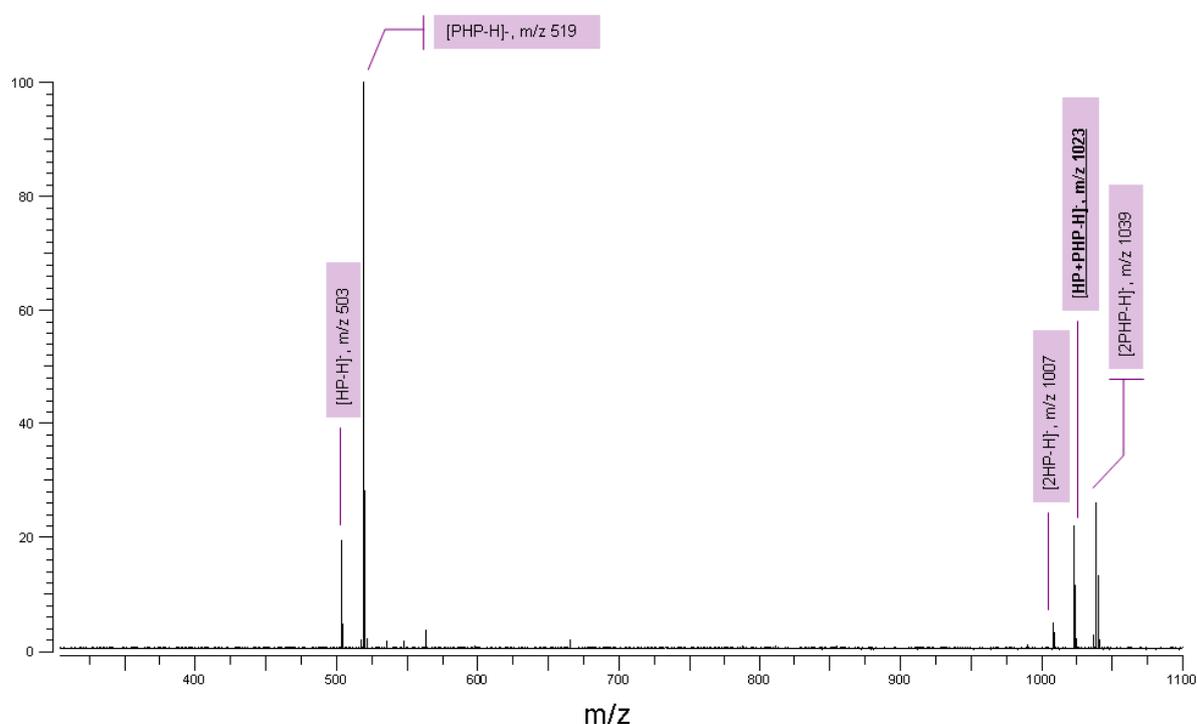


Figure VII. 10 : Spectre ESI-FTICRMS en mode de détection **négatif** pour une solution contenant hypéricine (HP) à $1,25 \mu\text{M}$ et pseudohypéricine (PHP) à $1,25 \mu\text{M}$

La Figure VII. 11 montre que l'internalisation simultanée des deux photosensibilisants, conduit, lorsqu'ils sont tous deux employés à $1,25 \mu\text{M}$, à des concentrations intracellulaires intermédiaires à celles observées lorsque les composés sont étudiés seuls, indiquant qu'ils ont une influence limitée l'un sur l'autre ; cependant on note que les concentrations intracellulaires mesurées sont plus proches de celles correspondant à la pseudohypéricine, quand bien même les composés sont en mélange équimolaire. Cette observation pourrait

effectivement indiquer la présence d'agrégats mixtes Hypéricine-Pseudohypéricine dont les propriétés seraient plus proches de celles de la pseudohypéricine.

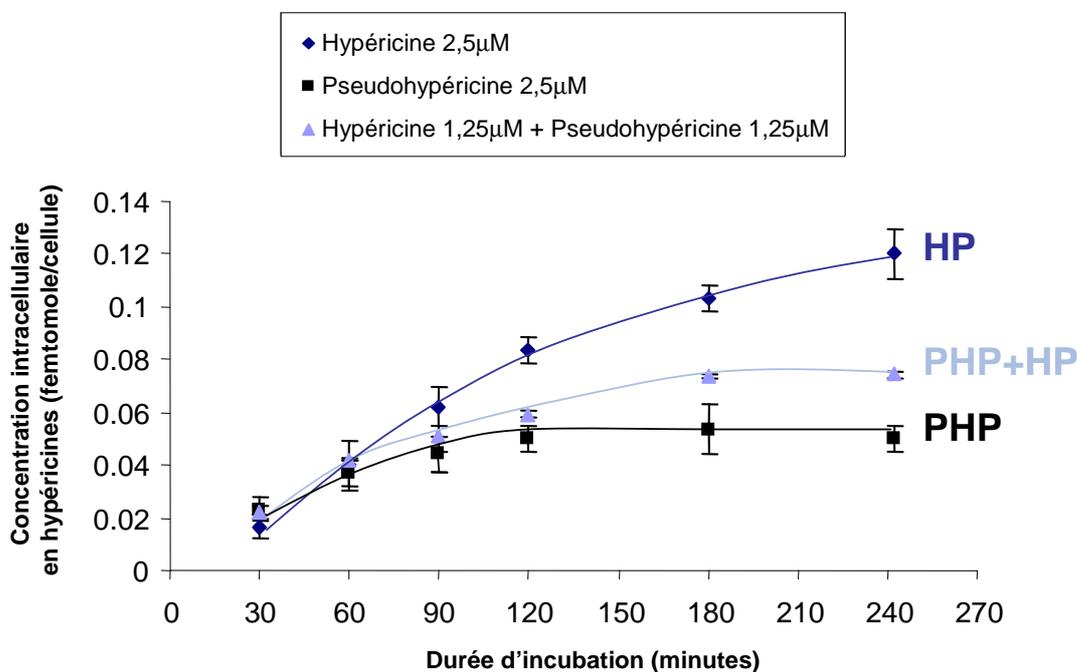


Figure VII. 11 : Cinétiques d'absorption des hypéricines par des cellules AY-27 incubées avec de l'hypéricine (2,5 µM), de la pseudohypéricine (2,5 µM) et un mélange équimolaire de deux composés (1,25 µM) dans un milieu d'incubation ne contenant pas de protéines

Dans le but de préciser le comportement de la pseudohypéricine, nous avons entrepris d'incuber d'autres lignées cellulaires avec ce composé.

IV. B. 3. Internalisation de la pseudohypéricine sur les lignées cellulaires MCF7, HT29 et A549

Afin d'expliquer la stagnation de la concentration intracellulaire en pseudohypéricine pour les temps d'incubation les plus longs, plusieurs hypothèses peuvent être envisagées :

- une interaction trop forte entre la pseudohypéricine et le milieu intracellulaire empêchant son extraction totale ; il a été en effet évoqué que la pseudohypéricine puisse se lier plus fortement que l'hypéricine aux protéines²⁰ (type SVF) ;

²⁰ Vandenberghe, A. L., et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1998, **45**, 2-3, p 87

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

- la dégradation ou le changement d'état d'agrégation du photosensibilisant au bout d'1h30 passée dans le milieu d'incubation, alors quel que soit le type de cellules étudiées, on devrait observer une stabilisation au même moment ;
- une toxicité plus importante de la pseudohypéricine qui conduirait à la mise en place plus rapide d'un processus de détoxification par les cellules traitées avec ce composé
- une influence de la polarité de la pseudohypéricine sur son internalisation par les cellules.

La Figure VII. 12 présente les cinétiques d'incorporation observées pour la pseudohypéricine sur les lignées cellulaires MCF 7, HT 29 et A549. La stabilisation de la concentration intracellulaire en pseudohypéricine intervient pour ces lignées au bout de durées d'incubation différentes, ce qui indique qu'elle n'est pas due à une dégradation du composé dans le milieu d'incubation qui serait uniquement fonction du temps. Il est à noter que la quantité de matière (nombre de moles de pseudohypéricine) disponible dans le milieu d'incubation est suffisante pour ne pas induire de défaut de photosensibilisateur.

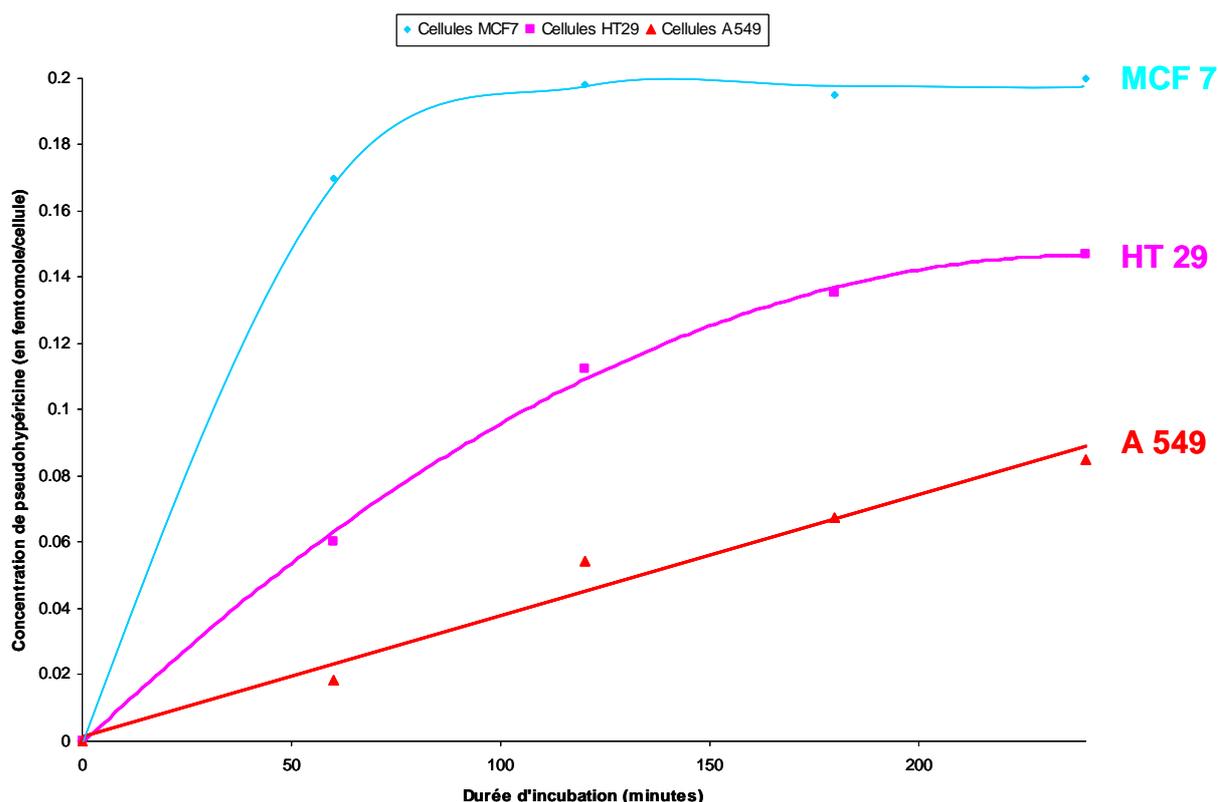


Figure VII. 12 : Cinétiques d'internalisation obtenues pour la pseudohypéricine sur les lignées cellulaires MCF-7, HT-29 et A549

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

Les résultats que nous avons obtenus mettent en avant que les quantités d'hypéricine et de pseudohypéricine incorporées par les cellules peuvent selon les conditions d'incubation (durée et type de cellules) s'avérer très différentes. Ces données contribuent à expliquer les différences de toxicité qui ont pu être observées précédemment entre ces deux composés, dans le cadre d'études au cours desquelles la quantité de photosensibilisateur internalisée n'a pas été contrôlée ²¹.

Ce résultat est important compte-tenu de la prédominance généralement constatée de la pseudohypéricine dans les extraits de Millepertuis par rapport au contenu en hypéricine ; L'impact de la méthode d'extraction sur le rapport pseudohypéricine/hypéricine dans les extraits, qui n'a pas fait partie des critères considérés pour le choix de notre méthode d'extraction est résumé dans le Tableau VII. 1, d'après les expériences réalisées par Smelcerovic et al. ²².

Méthode d'extraction	Rapport Pseudohypéricine/Hypéricine
Ultrasons méthode directe (60 W, 1 h)	2,6
Ultrasons méthode directe (40 W, 1 h)	2,2
Extraction au Soxhlet (24 h)	2,1
Extraction par Solvant Accélérée	1,9
Ultrasons méthode indirecte (1 h)	1,7
Macération (24 h)	1,5

Tableau VII. 1 : Influence de la méthode d'extraction sur le rapport pseudohypéricine/hypéricine d'après Smelcerovic et al.

La méthode d'extraction que nous avons choisie est parmi celles qui permettent d'avoir la plus grande concentration relative en hypéricine ; si la macération classique permet d'avoir un rapport pseudohypéricine/hypéricine encore plus faible, le gain est limité et peu intéressant rapporté à la durée d'extraction.

IV. B. 4. Influence de l'hypéroside et de la procyanidine B2 sur l'internalisation de l'hypéricine

Comme nous l'avons précisé dans le Chapitre II, l'hypéroside et la procyanidine B2 font partie des composés susceptibles de modifier les propriétés de l'hypéricine en milieu aqueux (modification du coefficient de partition eau/octanol) et physiologique (biodisponibilité). Parmi

²¹ Schempp, C. M., et al., *Planta Medica*, 2002, **68**, 2, p 171

²² Smelcerovic, A., et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 7, p 2750

les composés testés par Butterweck et al.²³ se trouvaient l'hypéroside, le rutin, la quercétine et la procyanidine B2. Leur propension à favoriser la dissolution de l'hypéricine dans l'eau suit la tendance suivante pour un rapport molaire 1/10 (1 pour l'hypéricine) :

Hypéroside > Rutin > Procyanidine B2 > Quercétine

D'autres travaux menés par cette équipe ont concerné les données pharmacocinétiques de l'hypéricine seule ou en présence, soit d'hypéroside, soit de procyanidine B2. Compte tenu du plus grand nombre d'informations disponibles sur ces deux composés, nous les avons choisis pour étudier leur éventuelle influence sur l'internalisation des hypéricines par les cellules AY-27. De plus, comme nous l'avons montré dans le chapitre V, ces deux composés étaient bien présents dans l'extrait de Millepertuis que nous avons utilisé.

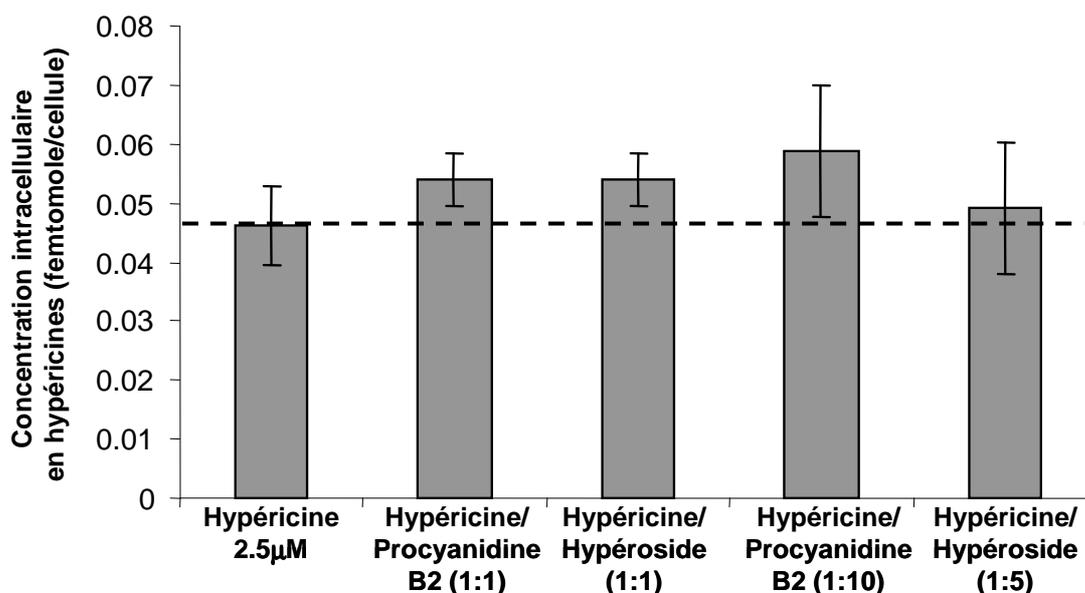


Figure VII. 13 : Influence de l'hypéroside et de la procyanidine B2 sur la concentration intracellulaire en hypéricine obtenue après une heure d'incubation des cellules (milieu d'incubation ne contenant pas de protéines)

Les cellules AY 27 ont donc été incubées avec des milieux contenant de l'hypéricine seule, ou accompagnée de ces polyphénols, soit dans un rapport équimolaire, soit dans le rapport ayant montré dans l'étude de Butterweck et al. la meilleure aptitude à augmenter la solubilité aqueuse de l'hypéricine (soit 1 :10 pour la procyanidine B2 et 1 : 5 pour l'hypéroside). La durée d'incubation choisie était d'une heure, car elle permettait d'obtenir une concentration

²³ Butterweck, V., Nahrstedt, A., *Pharmazie in unserer Zeit*, 2003, **32**, 3, p 212

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

intracellulaire en hypéricine assez importante et une différence marquée entre la concentration obtenue avec l'hypéricine pure et celle obtenue avec l'extrait de Millepertuis.

Les résultats obtenus, présentés sur la Figure VII. 13, montrent que la concentration intracellulaire de l'hypéricine est légèrement plus élevée dans le cas d'une incubation conjointe avec la procyanidine B2 ou l'hypéroside. Cependant cette différence est peu significative par rapport à celle observée dans le cas de l'extrait de Millepertuis, ces composés ne semblent donc pas être responsables de la meilleure internalisation des hypéricines observée dans le cas de l'incubation avec l'extrait de Millepertuis, du moins dans les conditions dans lesquelles nous les avons étudiés.

IV. B. 5. Influence de l'hyperforine

Si une influence de l'hyperforine sur l'internalisation de l'hypéricine a été évoquée dans la partie bibliographique traitant de l'effet de synergie observé avec ces deux composés sur la cytotoxicité de l'hyperforine (Chapitre II, VI. B), les données observées jusqu'alors vont à l'encontre d'un tel effet. Ainsi, nous avons constaté une cinétique d'internalisation similaire des hypéricines que ce soit avec l'extrait total de Millepertuis, qui contient de l'hyperforine, et la fraction polaire, qui n'en contient pas (IV. B. 1 dans ce même Chapitre). D'autre part, la légère cytotoxicité mesurée pour l'extrait total (III. D dans ce Chapitre), qui a été également mise en évidence par d'autres équipes, conduit à favoriser l'utilisation de la fraction apolaire.

IV. B. 6. Influence du solvant d'extraction du Millepertuis sur l'internalisation des composés photoactifs

Les expériences menées en milieu cellulaire l'ont jusqu'ici été avec des extraits préparés directement dans le DMSO ; si ces extraits nous ont paru stables dans le temps et adaptés à une étude *in vitro*, l'utilisation du DMSO est toutefois déconseillée *in vivo*²⁴. Pour cette raison, nous avons réalisé un extrait méthanolique, qui peut être évaporé sous vide, conservé sous forme sèche, et repris dans le solvant voulu, dans notre cas le DMSO ; d'autre part, nous avons réalisé dans un but plus prospectif un extrait de Millepertuis dans la N-méthylpyrrolidone, solvant présenté récemment comme biocompatible et permettant une bonne solubilisation de l'hypéricine par Saw et al.²⁵.

²⁴ Miller, D. R., et al., *Cell Proliferation*, 1991, **24**, 2, p 191

²⁵ Saw, C. L. L., et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2007, **86**, 3, p 207

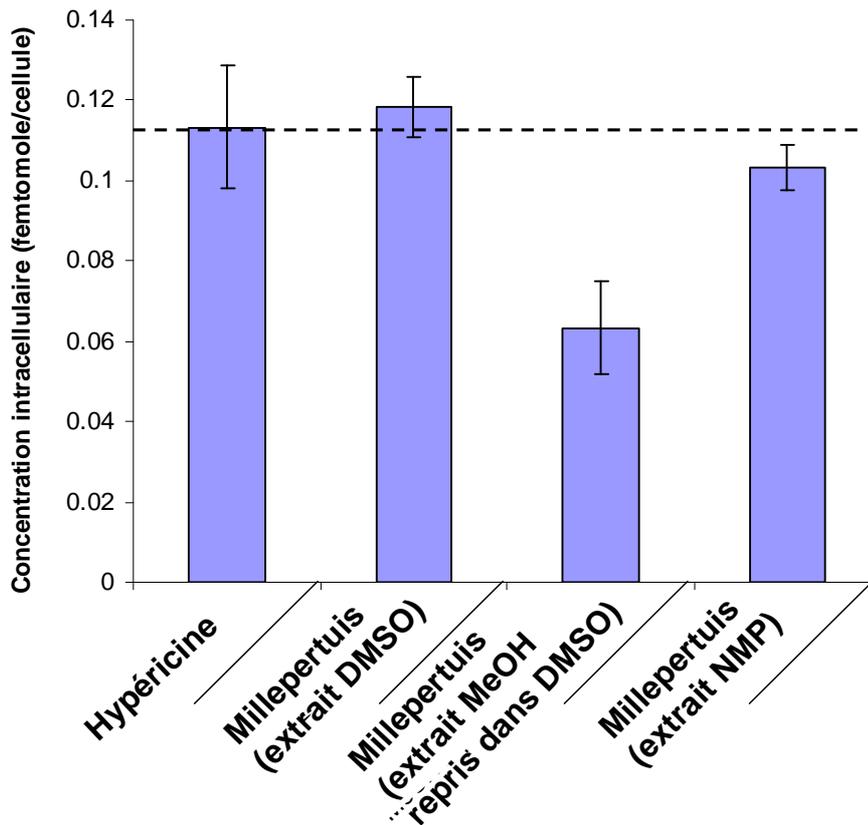


Figure VII. 14 : Influence du solvant d'extraction sur la concentration intracellulaire en hypéricines (incubations de 4 heures à 2,5 μ M)

Les résultats obtenus pour 4 heures d'incubation, présentés sur la Figure VII. 14, indiquent que la concentration intracellulaire en hypéricines est environ deux fois plus faible dans le cas de l'extrait MeOH-DMSO (fleurs de Millepertuis extraites dans le méthanol, évaporé puis repris dans le minimum de DMSO) que dans le cas de l'extrait au DMSO qui a été étudié jusqu'ici. Quant à l'extrait préparé dans le solvant N-méthylpyrrolidone, il conduit à une concentration intracellulaire quasi équivalente à celle mesurée pour l'extrait au DMSO. Ces données mettent en avant une influence importante du solvant d'extraction sur l'internalisation des hypéricines.

IV. B. 7. Conclusions

Les données que nous avons obtenues concernant l'internalisation des composés photoactifs que sont l'hypéricine et la pseudohypéricine par les cellules AY-27 permettent de dégager diverses conclusions :

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

- les cellules incubées avec les extraits réalisés directement dans le DMSO accumulent plus de photosensibilisants que celles mises en contact avec l'hypéricine dans la première partie des expériences d'incubation ; par la suite, la concentration intracellulaire en agents photosensibles se stabilise dans le cas des cellules incubées avec l'extrait, le même effet est observé avec l'extrait total ET et la fraction polaire FP ;
- les expériences menées sur la pseudohypéricine semblent indiquer que ce composé est au moins partiellement responsable de cette stagnation de la concentration intracellulaire en agents photoactifs pour le temps d'incubation les plus longs ;
- les causes les plus probables de ce comportement de la pseudohypéricine seraient une moins bonne tolérance de cellules vis-à-vis de ce composé qui induirait la mise en route de processus de détoxification de la cellule, ou une influence de la polarité du composé sur son internalisation ;
- dans le cas d'un mélange hypéricine/pseudohypéricine les concentrations intracellulaires mesurées sont plus proches de celles observées pour la pseudohypéricine seule et la formation d'agrégats mixte hypéricine/pseudohypéricine est envisageable ;
- les composés polyphénoliques capables de favoriser la solubilité aqueuse de l'hypéricine, hypéroside et procyanidine B2, ne semblent pas être responsables, dans les ratios que nous avons employés, de la meilleure internalisation des composés photoactifs observée dans le cas des incubations avec les extraits de Millepertuis réalisés dans le DMSO ;
- le solvant d'extraction utilisé pour les fleurs de Millepertuis semble avoir une influence sur la quantité de photosensibilisant internalisé par les cellules.

L'ensemble de ces données indique que les extraits de Millepertuis pourraient être des formulations intéressantes pour l'hypéricine mais l'origine de la meilleure internalisation constatée pour certains extraits et pour les durées d'incubation les plus courtes n'a pu être clairement expliquée. Parmi les hypothèses restant à explorer, celle d'une formulation par les lipides pourrait être envisagée. Certains de ceux que nous avons détectés dans nos extraits, les phospholipides, ne sont pas retirés du matériel végétal par la préextraction au chloroforme, comme le montre le spectre de masse présenté sur la Figure VII. 15. Ceci pourrait expliquer les constatations similaires faite avec l'extrait total ET et la fraction polaire FP.

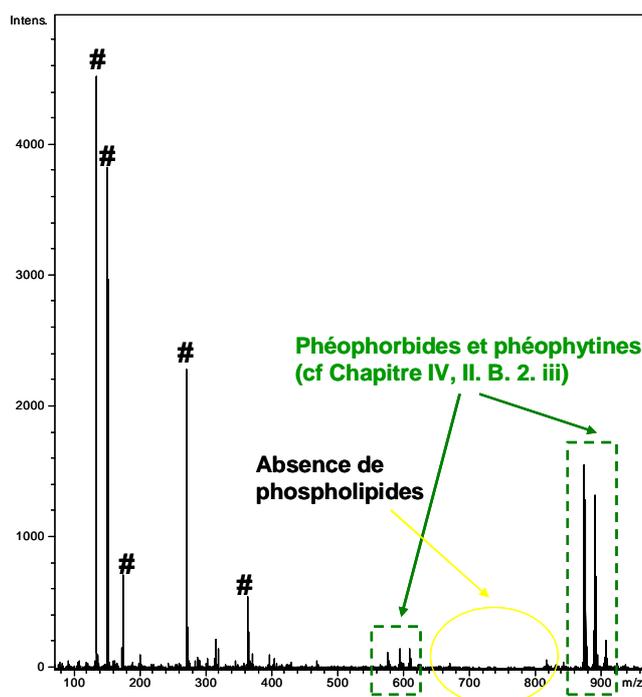


Figure VII. 15 : Spectre MALDI-TOF en mode détection **positif** de la phase apolaire du Millepertuis (matrice 2,5-DHB à 10^{-2} M, # : pics de matrice)

Une autre hypothèse envisageable concernerait une différence d'état physico-chimique, et notamment d'agrégation, entre l'hypéricine standard et les hypéricines du Millepertuis lorsqu'elles sont dissoutes dans le milieu de culture. Ceci pourrait faire l'objet d'une étude par fluorescence, cependant il semble que la fluorescence des hypéricines dans les extraits de Millepertuis ne soit pas proportionnelle à leur concentration²⁶ et que cela nécessite de plus amples investigations.

V. Caractérisation par Spectrométrie de Masse des composés internalisés par les cellules AY-27 mises en contact avec les extraits de Millepertuis

L'étude de l'absorption et du métabolisme des médicaments est une partie intégrante de leur développement ; dans le cas de l'utilisation de mélanges complexes tels que les extraits végétaux, il paraît d'autant plus judicieux de caractériser les produits qui contribuent à l'activité du mélange.

L'ionisation par Electronébulisation est une technique douce considérée comme permettant l'ionisation de 90 % des molécules typiquement étudiées dans l'industrie pharmaceutique. Pour cette raison elle est couramment employée pour la recherche et la caractérisation de métabolites.

²⁶ Skalkos, D., et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, **82**, 2, p 146

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

La recherche de médicaments dans les lysats cellulaires est compliquée du fait des faibles concentrations des molécules actives au sein des cellules, par rapport à la forte concentration en composés endogènes. Dans notre cas, les lysats cellulaires ont été réalisés dans le méthanol comme précisé dans le Chapitre III. Sur les spectres de masse qui vont être présentés maintenant, sont identifiés comme « lipides » les signaux observés sur le lysat de référence, c'est-à-dire le lysat de cellules AY-27 mises en contact avec le milieu de culture à 1% de DMSO pendant quatre heures et extraites de la même façon que les cellules incubées avec les agents photosensibles (extraits préparés directement dans le DMSO). Certains de ces signaux ont fait l'objet d'expériences de fragmentation via la technique d'activation IRMPD ayant permis de déterminer qu'ils étaient issus de la classe des phospholipides (Figure VII. 17 et Figure VII. 19), en accord avec les comportements référencés pour ces composés dans la littérature^{27,28}. Les signaux ainsi identifiés ont servi de calibrant interne pour la calibration en masse des spectres. Il est à noter que l'examen minutieux des zones des spectres de masse correspondant aux phospholipides n'a pas révélé la présence de composés pouvant être issus de l'extrait de Millepertuis.

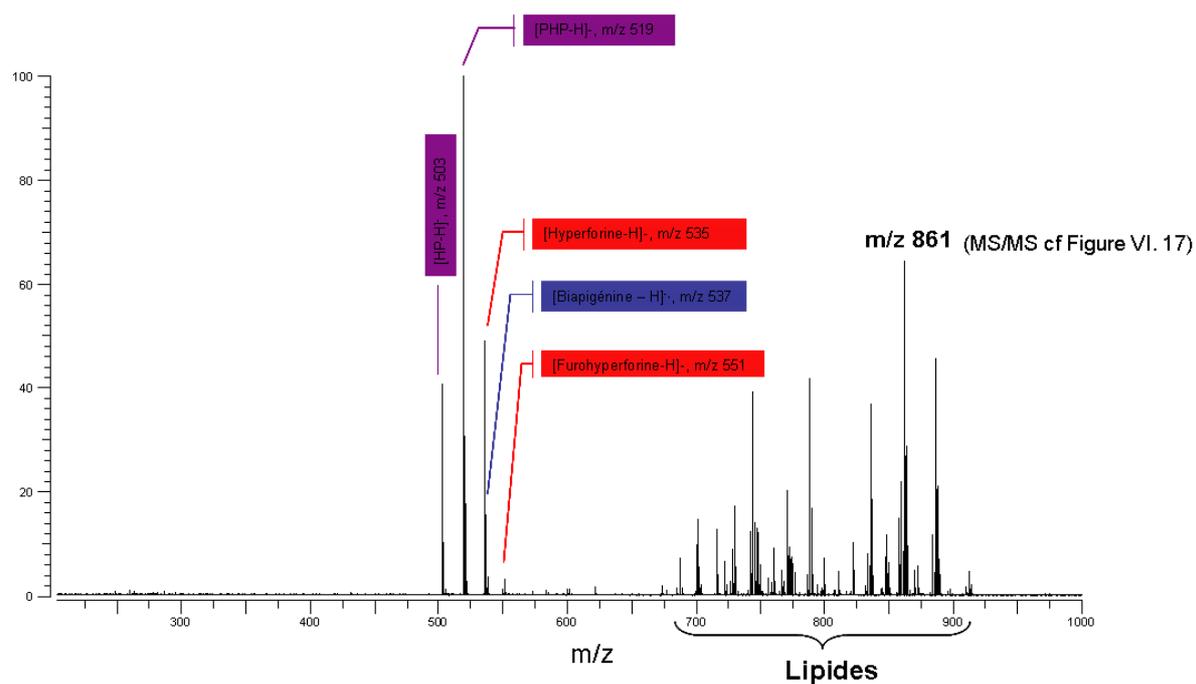


Figure VII. 16 : Spectres ESI-FTICRMS obtenu pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec l'extrait total (ET) en mode de détection **négatif**

La Figure VII. 16 présente l'analyse ESI-FTICRMS en mode de détection négatif d'un lysat de cellules AY-27 incubées avec un extrait de fleurs de Millepertuis (extrait total ET). Ce spectre révèle la présence d'hypericines et d'hyperforines. Outre ces familles, ce spectre

²⁷ Hsu, F. F., Turk, J., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2000, **11**, 11, p 986

²⁸ Domingues, P., *et al.*, *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2001, **15**, 10, p 799

révèle la présence de biapigénine, qui semble être le seul autre composé exogène présent dans les cellules.

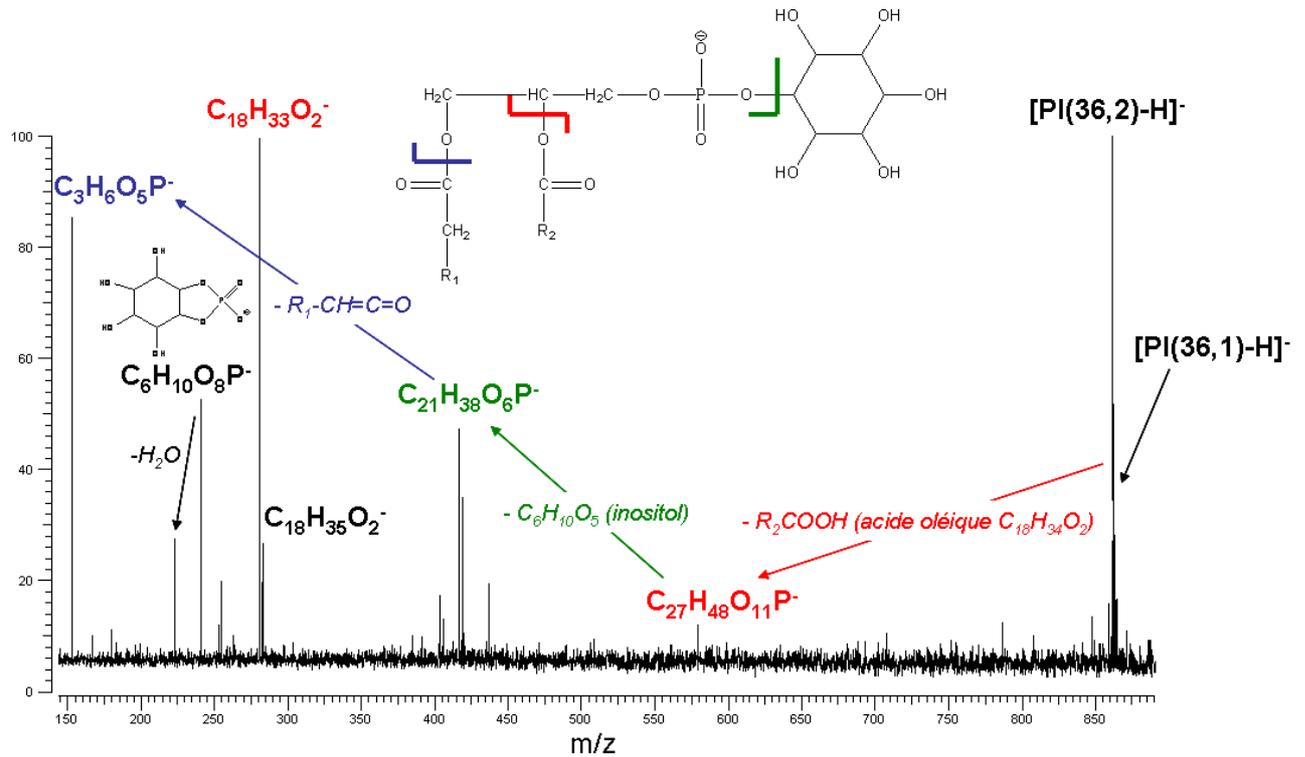


Figure VII. 17 : Spectre de fragmentation IRMPD (500 ms d'irradiation à 100% de puissance laser) du lipide présent à m/z 861 sur le spectre ESI-FTICRMS en mode de détection **néгатif** – Le massif isolé comprend également en plus faible abondance le dérivé monoinsaturé à m/z 863 – Pour R_1 et R_2 , voir la nomenclature des phospholipides précisée en Annexes

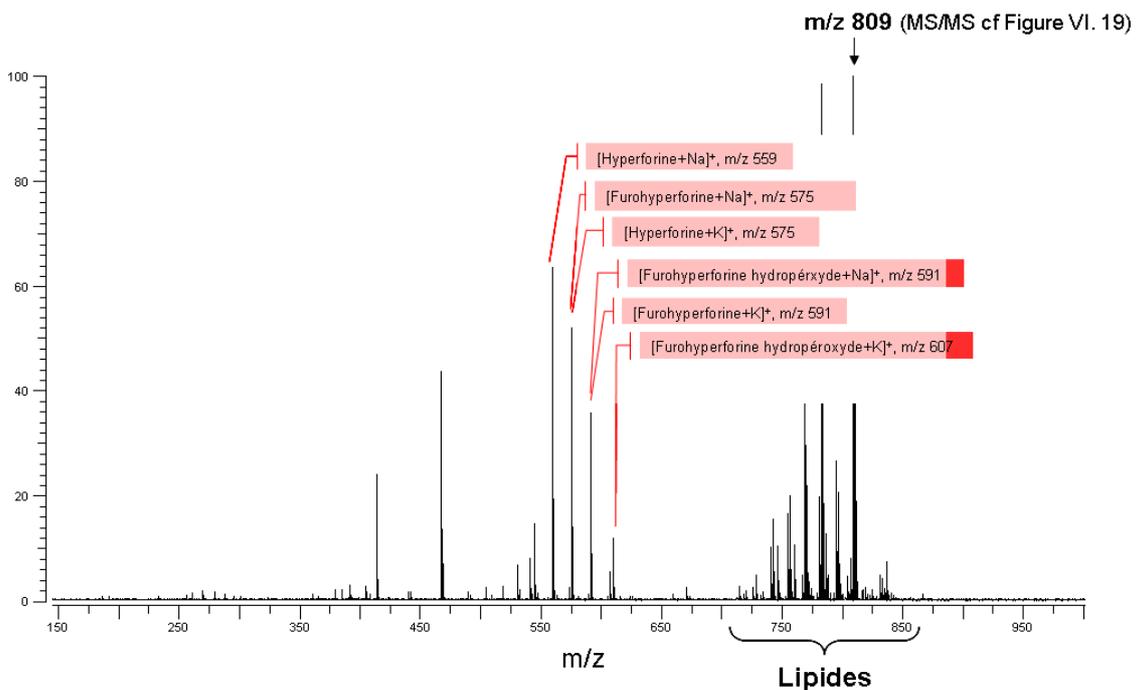


Figure VII. 18 : Spectres ESI-FTICRMS obtenu pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec l'extrait total (ET) en mode de détection **positif**

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

Les données obtenues en mode de détection positif, présentées sur la Figure VII. 18, confirment la présence d'hyperforine et de furohyperforine, et mettent également en avant la présence de furohyperforine hydropéroxyde.

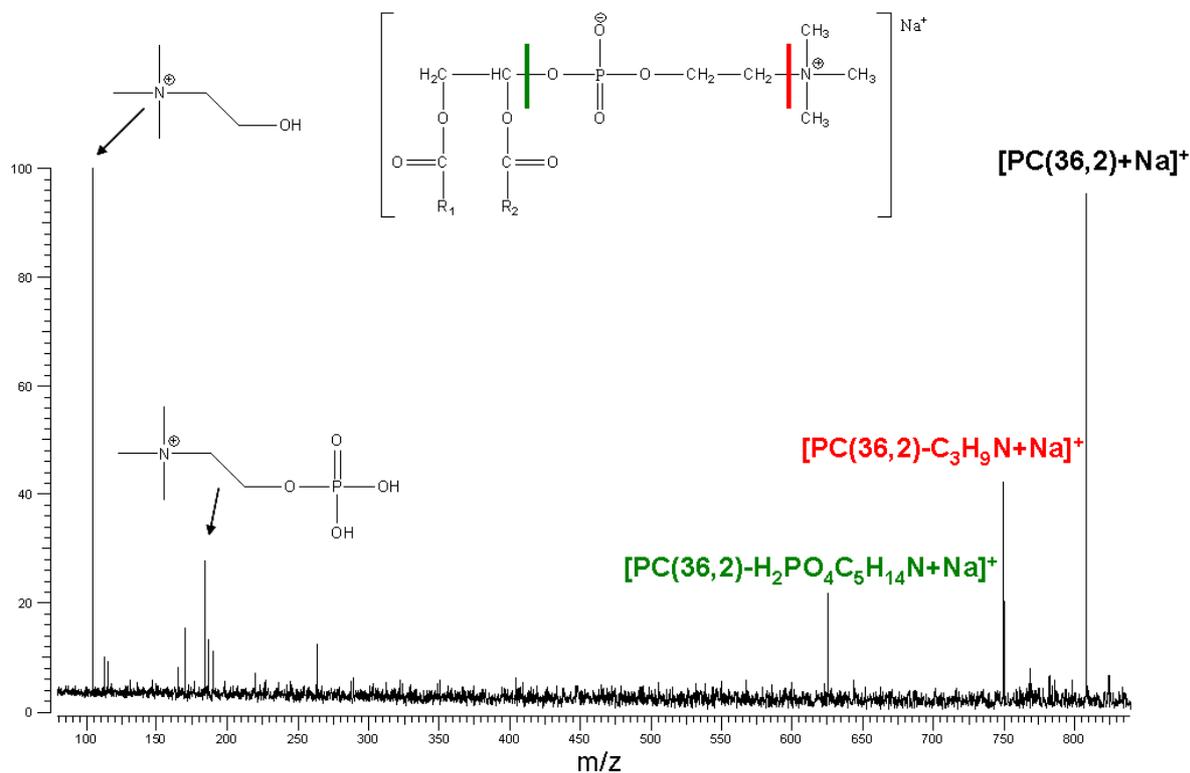


Figure VII. 19 : Spectre de fragmentation IRMPD (750 ms d'irradiation à 100% de puissance) du lipide présent à m/z 809 sur le spectre ESI-FTICRMS en mode de détection **positif** – Nomenclature présentée en annexe

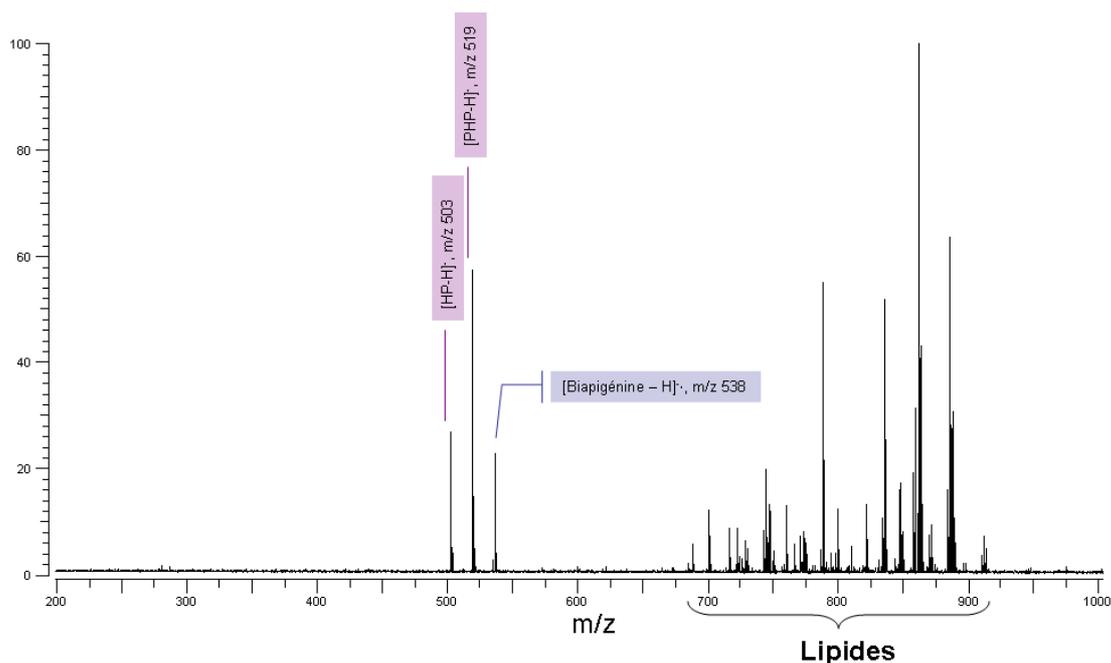


Figure VII. 20 : Spectres ESI-FTICRMS obtenu pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec la fraction polaire (FP) en mode de détection **négatif**

La Figure VII. 20 correspond à l'analyse en mode de détection négatif d'un lysat de cellules AY-27 incubées avec la fraction polaire de l'extrait de Millepertuis. Comme attendu, sur ce spectre, aucun dérivé de l'hyperforine n'est détecté. Les cellules contiennent, comme dans le cas de celles incubées avec l'extrait total ET, les hypéricines et la (les) biapigénines.

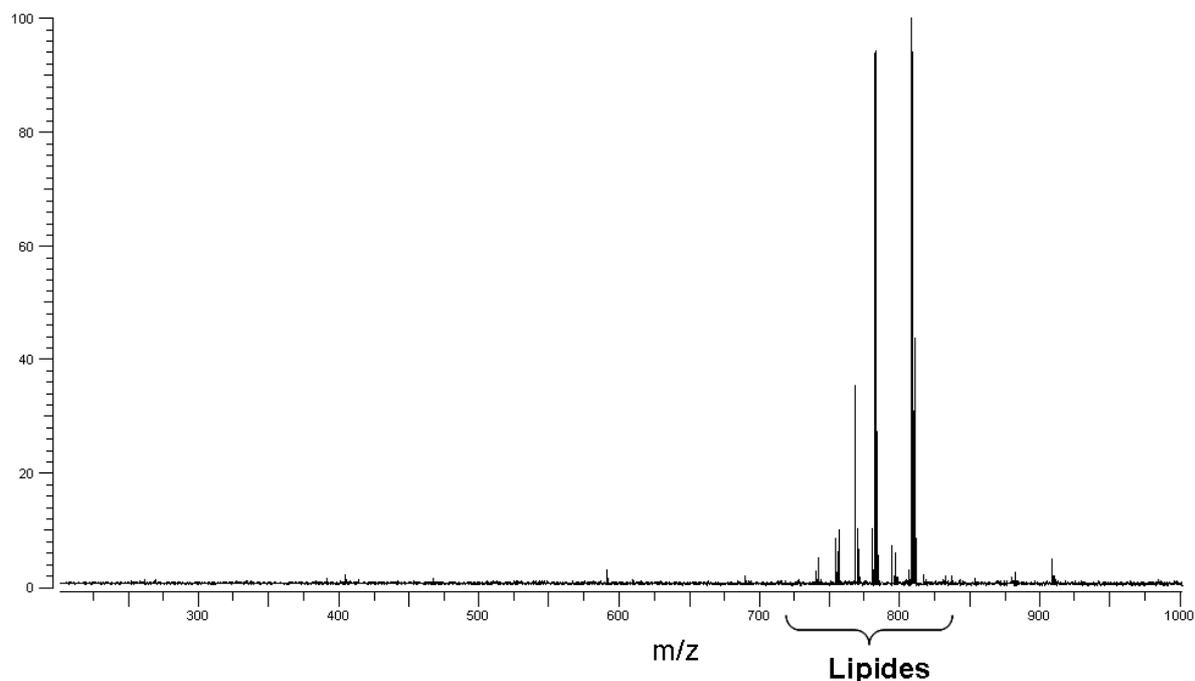


Figure VII. 21 : Spectres ESI-FTICRMS obtenu pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec la fraction polaire (FP) en mode de détection **positif**

Le spectre obtenu en mode de détection positif, présenté sur la Figure VII. 21, confirme l'absence d'hyperforines dans les cellules. Des résultats similaires ont été obtenus dans le cas des extraits méthanoliques évaporés puis repris dans le DMSO.

La Figure VII. 22 présente le spectre ESI-FTICRMS obtenu en mode de détection négatif pour un lysat de cellules incubées avec l'extrait de Millepertuis préparé dans la N-méthylpyrrolidone (NMP). Sur ce spectre le rapport d'intensité entre l'hypéricine et la pseudohypéricine est supérieur à ceux observés dans les autres cas. Compte-tenu du rapport typiquement mesuré pour une solution méthanolique équimolaire des deux composés, présenté sur la Figure VII. 23, et qui est clairement en faveur d'une meilleure ionisation de la pseudohypéricine, on peut avancer que les cellules incubées avec l'extrait réalisé dans la NMP contiennent majoritairement de l'hypéricine, sous réserve que l'ionisation des deux agents photosensibles se fasse de la même façon dans les lysats cellulaires.

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

L'analyse en mode de détection négatif de l'extrait de Millepertuis préparé dans la NMP, dilué 1000 fois dans le méthanol, et présentée sur la Figure VII. 24, révèle que sa composition est globalement identique à celle des extraits méthanoliques, mais que l'hypéricine semble effectivement y être clairement majoritaire. Compte-tenu de la moins bonne internalisation constatée pour la pour la pseudohypéricine, ces extraits pourraient s'avérer particulièrement intéressants pour le photodiagnostic et la photothérapie.

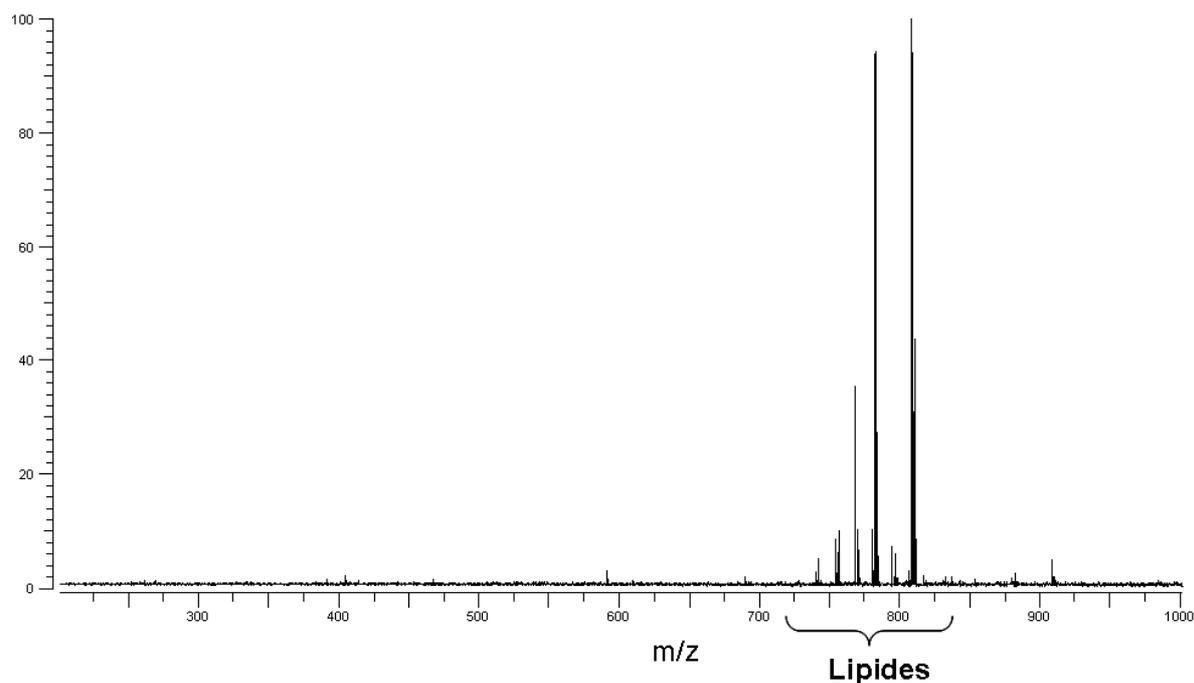


Figure VII. 22 : Spectre ESI-FTICRMS obtenu en mode de détection **négatif** pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec l'extrait au NMP (extrait total)

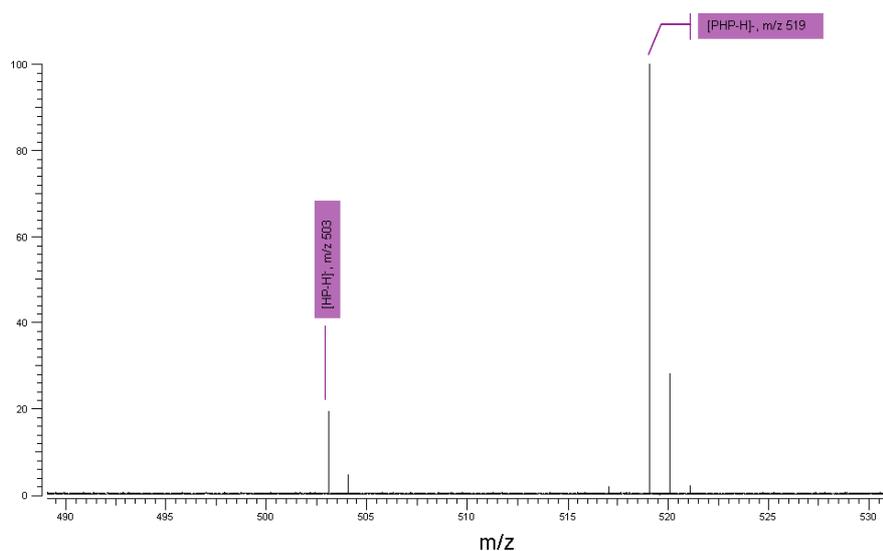


Figure VII. 23 : Spectre ESI-FTICRMS en mode de détection **négatif** d'un mélange équimolaire d'hypéricine et de pseudohypéricine

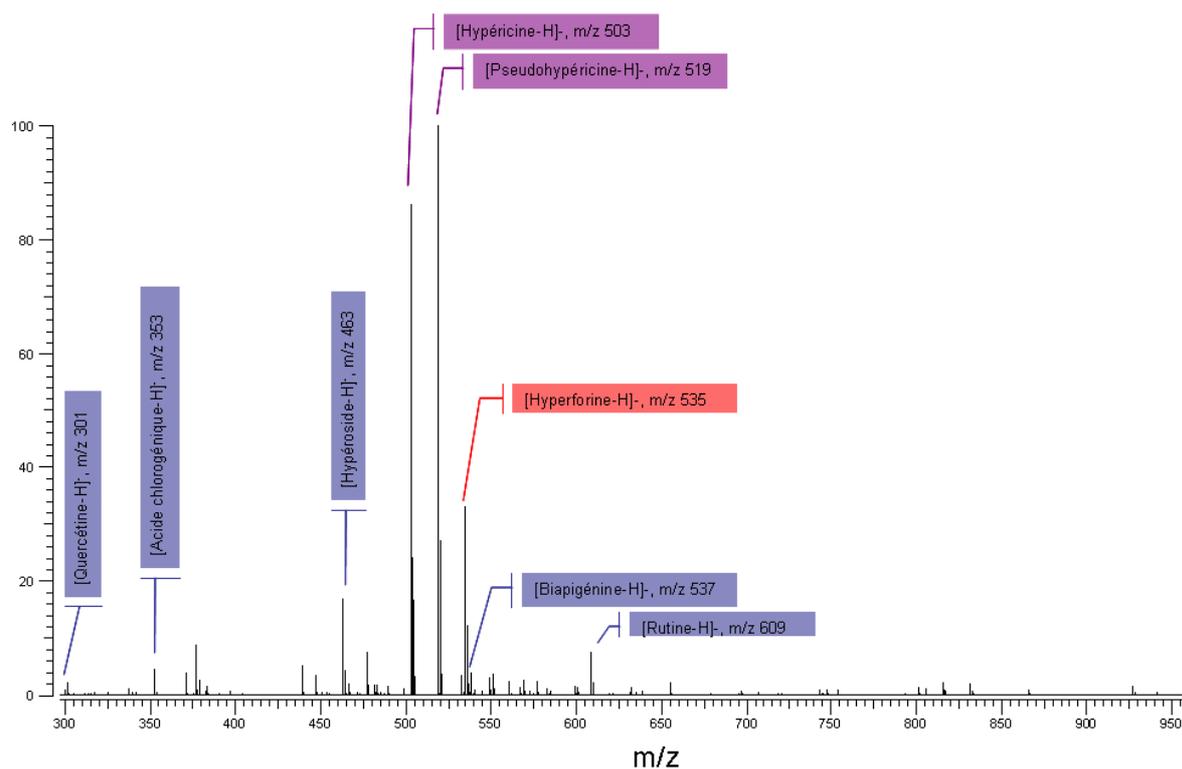


Figure VII. 24 : Spectre ESI-FTICRMS en mode de détection **négatif** d'un extrait de Millepertuis (extrait total) préparé dans la N-méthylpyrrolidone (dilué à 1/1000 dans le méthanol)

Les études que nous avons menées en Spectrométrie de Masse sur les lysats de cellules incubées avec les extraits de Millepertuis ont permis de mettre en évidence la présence des hypéricines ainsi que de l'hyperforine, mais seulement dans le cas de l'extrait total ET pour le cas de cette dernière. Dans le cas où la fraction polaire FP du Millepertuis est utilisée, l'hyperforine n'est pas détectée dans les lysats, et ses produits d'oxydation, plus polaires, ne semblent pas non plus avoir traversé la membrane cellulaire. Dans les conditions d'incubation que nous avons utilisées, le seul autre composé antioxydant détecté dans les cellules semble être la biapigénine ; sa présence dans les cellules est cohérente avec le fait que ce composé ne porte pas de fonction glycosyl, car la glycosylation rend les flavonoides moins aptes à traverser la barrière lipidique des cellules. A ce titre nous aurions également pu détecter la quercétine qui est elle aussi non glycosylée, cependant des études ont montré que le métabolisme de ce composé est rapide en milieu cellulaire²⁹, de ce fait elle pourrait à t=4 heures avoir déjà été métabolisée par nos cellules. Des études menées en LC-MS permettront dans le futur de s'affranchir de l'effet matrice des phospholipides et de détecter peut-être un plus grand nombre de métabolites du Millepertuis dans les cellules traitées.

²⁹ Gutzeit, H. O., et al., *Croatica Chemica Acta*, 2005, **78**, 3, p 337

VI. Efficacité photodynamique in vitro des extraits de Millepertuis

VI. A. Protocole d'évaluation

La phototoxicité in vitro des extraits de Millepertuis a été évaluée sur les cellules AY27 avec le même laser que celui utilisé pour les études en solution. Afin d'obtenir un faisceau laser plus large et plus homogène, le faisceau sortant du Nd-YAG a été dirigé vers un réseau de fibres optiques par le biais d'un prisme. La sortie des fibres a été introduite dans une boîte opaque où les échantillons à irradier ont été placés afin d'éviter tout artefact dû à la lumière extérieure (Figure VII. 25).

D'une façon générale les lasers pulsés sont rarement utilisés en PDT. Leur mécanisme d'action est de plus en plus étudié, et diffère de celui des lasers continus. Leur efficacité est intimement liée à la fréquence de tir, à la durée des impulsions et à leur énergie. Diverses études ont montré que l'utilisation de lasers pulsés avec des fréquences de tir élevées et des impulsions d'énergie faible peuvent permettre une pénétration dans les tissus cancéreux et des modifications histologiques équivalentes à celles observées dans le cas du laser continu³⁰. A l'inverse, certaines études ont montré que l'utilisation de lumière pulsée à haute énergie et à faible fréquence pouvait permettre un traitement plus en profondeur³¹, à dose de lumière égale (50J/cm²). Concernant le type de dommages induits, Miyamoto et al. ont montré que les cellules HeLa traitées avec l'HpD se trouvent essentiellement en apoptose après une irradiation à 514,5 nm en lumière pulsée (laser Nd-YAG, durée d'impulsion 7-9 ns, fréquence de répétition 10 Hz) alors que la lumière continue dans des conditions de fluence équivalentes génère plutôt une mort par nécrose (laser à argon)³².

Si la lumière continue constitue la référence en thérapie photodynamique, nous avons tout de même jugé pertinent de travailler en lumière pulsée puisque notre objectif était, non pas de déterminer d'une façon absolue les résultats obtenus via la PDT avec les extraits de Millepertuis, mais de comparer les résultats obtenus avec ceux de la PDT avec l'hypéricine. D'autres sources de lumières peu onéreuses (lumière blanche avec³³ ou sans filtres³⁴, ampoules générant toute une gamme de longueurs d'onde³⁵) ont également été utilisées pour réaliser des études de photothérapie avec l'hypéricine, et nous aurions pu réaliser notre

³⁰ Cowled, P. A., et al., *Photochemistry and Photobiology*, 1984, **39**, p 115

³¹ Okunaka, T., et al., *Japan Journal of Cancer Research*, 1992, **83**, p 226

³² Miyamoto, Y., et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1999, **53**, 1-3, p 53

³³ Uzdensky, A., et al., *Medical Laser Application*, 2006, **21**, 4, p 271

³⁴ Chaloupka, R., et al., *FEBS Letters*, 1999, **462**, 3, p 295

³⁵ Kocanova, S., et al., *Apoptosis*, 2007, **12**, 4, p 731

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

étude avec du matériel de ce type, mais elles ne permettent pas de réaliser une irradiation à une seule longueur d'onde, à l'inverse des lasers. Or, dans le cas des extraits de Millepertuis, une irradiation sur toute une gamme de longueur d'onde aurait pu permettre d'activer en plus de l'hypéricine et de ses dérivés, d'autres molécules, comme par exemple des porphyrines de la famille des chlorophylles, et donc donner des résultats différents de ceux que l'on pourrait obtenir en milieu physiologique. Des cellules incubées avec des extraits de Millepertuis ont également fait l'objet d'irradiations laser à 630 nm dans le but d'effectuer une comparaison avec le Photofrin³⁶, cependant de tels protocoles d'irradiation, même s'ils ont permis d'obtenir de bons résultats avec FP, sont peu représentatifs du potentiel offert par les extraits de Millepertuis pour la PDT, compte-tenu de la différence entre le coefficient d'extinction du Photofrin ($2,2 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ dans l'eau calculé d'après ³⁷) et celui des extraits de Millepertuis ($0,33 \text{ L.g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ dans le méthanol calculé d'après ³⁸) à cette longueur d'onde.

Nous avons illuminé nos cultures cellulaires à 597 nm, longueur d'onde qui correspond au maximum d'absorption de l'hypéricine en milieu aqueux (cf Figure VII. 2 dans ce Chapitre). La fluence a été réglée à $0,05 \text{ mJ/cm}^2$ (énergie mesurée de $0,15 \text{ mJ} \pm 0,02 \text{ mJ}$ sur une cellule de mesure circulaire de 3 cm^2).

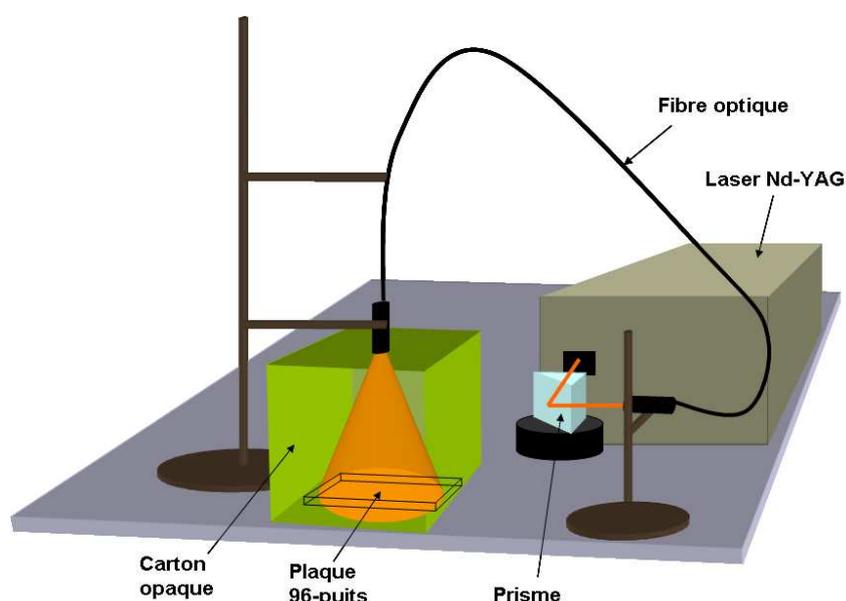


Figure VII. 25 : Dispositif expérimental utilisé pour l'irradiation laser des échantillons biologiques

³⁶ Nseyo, U., *et al.*, *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection : Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy*, 2005, **5689**, p 97

³⁷ Ferreira, J., *et al.*, *Laser Physics Letters*, 2007, **4**, 10, p 743

³⁸ Skalkos, D., *et al.*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2006, **82**, 2, p 146

	AY-27 lumière continue	AY-27 lumière pulsée
Nombre de cellules par puits	5000	10000
Durée de culture	24h	48h
Durée de l'incubation	2h	2h
Intervalle drogue-lumière	0	1h
Durée de remise en culture	72h	24h
Longueur d'onde	595 nm	597 nm
Irradiance	1 à 4 mW/cm ²	5000 W/cm ²
Durée d'illumination	15 ou 30 minutes	12 minutes (durée effective : 0,072 ms)
Dose totale de lumière	0,9 à 7,2 J/cm ²	0,36 J/cm ²

Tableau VII. 2 : Tableau comparatif des variables utilisées par Kamuhabwa et al. pour la photodestruction des cellules AY-27 en lumière continue³⁹ et celles utilisées en lumière pulsée au cours de nos expériences

VI. B. Comparaison de la phototoxicité de l'hypéricine et de la pseudohypéricine

Si l'hypéricine et la pseudohypéricine présentent des structures assez similaires, leur stabilité en milieu physiologique est très différente. Nous avons donc souhaité évaluer la photocytotoxicité de ces deux composés sur nos cellules AY27. Le temps d'incubation choisi pour ces expériences était de 90 minutes, car il permettait d'avoir dans les cellules des concentrations environ équivalentes en hypéricine et pseudohypéricine (cf IV. B. 2 dans ce Chapitre). Les résultats que nous avons obtenus sont présentés sur la Figure VII. 26. Il s'est avéré que la pseudohypéricine n'a présenté aucune phototoxicité dans nos conditions expérimentales, et l'efficacité photodynamique d'un mélange équimolaire (1,25 µM + 1,25 µM) des deux composés correspond à celle constaté pour l'hypéricine à 1,25 µM. Au cours de nos recherches bibliographiques, nous avons trouvé des résultats similaires concernant la pseudohypéricine, essentiellement attribués à la force de son interaction (relativement à l'hypéricine) avec les protéines présentes dans le milieu d'incubation⁴⁰. Il semble d'après nos résultats que l'interaction de la pseudohypéricine avec les protéines intracellulaires pourrait être également plus forte, diminuant la quantité d'espèces toxiques qu'elle produit sous illumination en milieu cellulaire.

Il est à noter que même pour les durées d'illumination les plus longues, le taux de cellules viables reste assez élevé (18%) par rapport à d'autres résultats qui ont pu être publiés

³⁹ Kamuhabwa, A. R., et al., *Photochemistry and Photobiology*, 2001, **74**, 2, p 126

⁴⁰ Vandenberghe, A. L., et al., *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1998, **45**, 2-3, p 87

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

(environ 5% pour la réf³⁹). Ce résultat pourrait s'expliquer par la durée d'attente entre le traitement photodynamique et la mise en contact des cellules avec le MTT, qui est par exemple de 72 heures dans le cas de l'étude de Kamuhabwa et al., et de 24 heures dans la notre. Une autre explication pourrait provenir de l'utilisation de lumière pulsée au lieu de lumière continue.

La phototoxicité des extraits de Millepertuis a été déterminée pour des durées d'incubation de deux heures, durée pour laquelle nous avons constaté une différence significative d'internalisation des hypéricines entre le milieu d'incubation contenant de l'hypéricine pure et celui contenant de l'extrait de Millepertuis. Différents extraits ont été testés dans un premier temps, avec des concentrations en hypéricines dans le milieu d'incubation de 2,5 μ M : l'extrait au DMSO, l'extrait au MeOH, et chacun de ces deux extraits préparés avec du matériel végétal préextrait trois fois au CHCl₃. Les résultats, présentés sur la Figure VII. 27, montrent que parmi ces quatre extraits, seuls ceux réalisés directement dans le DMSO présentent une photocytotoxicité quasi-comparable à celle de l'hypéricine. Il est à noter que les écart-types observés, non dessinés pour une meilleure lecture du graphique, n'ont jamais excédé 10% de la valeur du taux de survie. En revanche, nous avons constaté une phototoxicité moindre des extraits méthanoliques secs repris dans le DMSO, et, même pour un temps d'incubation de deux heures seulement, une légère toxicité à l'obscurité de l'extrait méthanolique sans préextraction, du même ordre de grandeur que celle observée pour 4 heures d'incubation dans le cas de l'extrait réalisé directement dans le DMSO (cf partie III. D de ce Chapitre). Pour cette raison, nous avons également testé cet extrait à une concentration non cytotoxique, 1,25 μ M ; finalement on constate que la mort des cellules incubées avec les extraits MeOH repris dans le DMSO est moins rapide que dans le cas des extraits MeOH-CHCl₃ repris dans le DMSO.

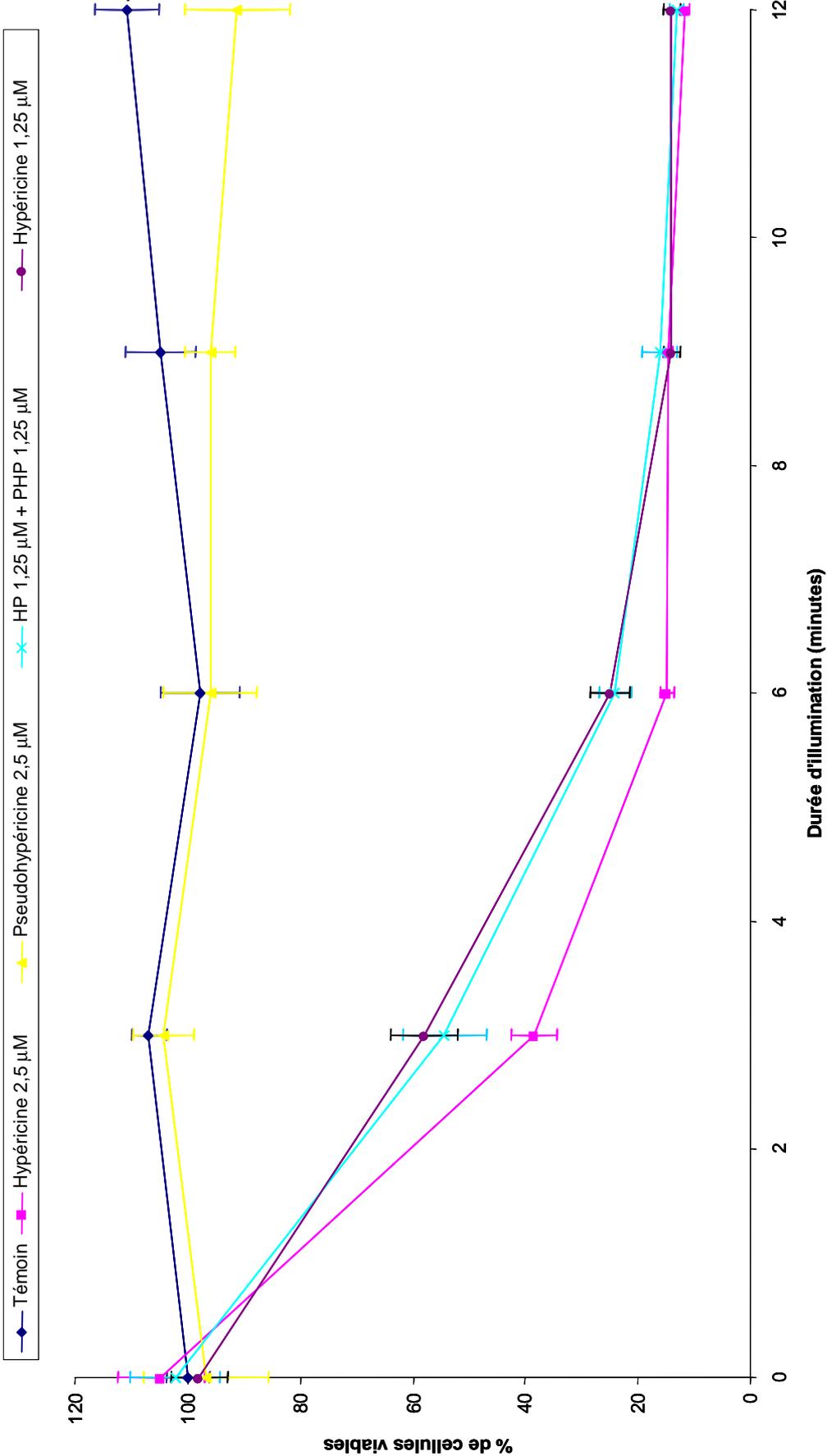


Figure VII. 26 : Phototoxicité de l'hypéricine, de la pseudohypéricine et d'un mélange des deux composés sur les cellules AY-27

VI. C. Phototoxicité des extraits de Millepertuis

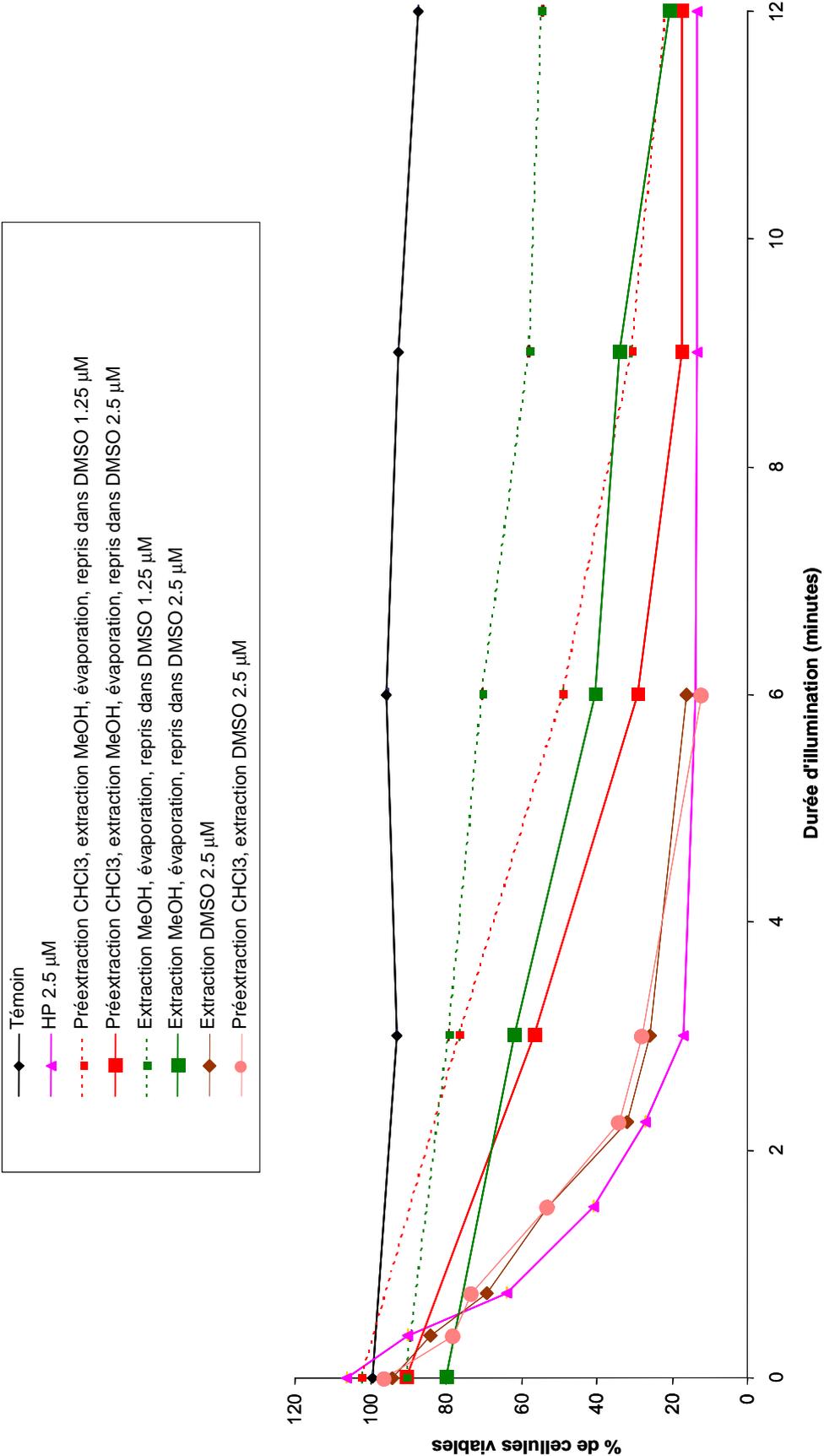


Figure VII. 27 : Photocytotoxicité des extraits de Millepertuis sur les cellules AY-27

VI. D. Conclusions

Les résultats obtenus concernant la phototoxicité des extraits de Millepertuis indiquent qu'ils peuvent dans certaines conditions s'avérer aussi efficace que l'hypéricine, à concentration égale en composés photoactifs. Dans le cadre de nos expériences nous avons constaté que la phototoxicité est en premier lieu corrélée avec la concentration intracellulaire en composés photoactifs ; c'est dans le cas des extraits réalisés directement dans le DMSO que le traitement s'avère être le plus efficace, tandis que les extraits méthanoliques repris dans le DMSO, même s'ils permettent la conservation de l'extrait sous sa forme sèche, s'avèrent moins phototoxiques.

Si dans le cas de nos cellules AY-27 nous sommes parvenus à obtenir une phototoxicité marquée, notamment dans le cas d'extraits préparés directement dans le DMSO, les résultats obtenus parallèlement dans d'autres études sont moins probants, et méritent d'être mentionnés ici. Schmitt et al. ont montré qu'à concentration égale en hypéricines, un mélange standard/extrait (EtOH 100%) est plus phototoxique qu'une solution de standard, quelle que soit la proportion de standard et d'extrait. Ils n'ont pas obtenu le même type d'effet avec l'extrait issu d'un matériel végétal préextrait au chloroforme, qui à concentration égale en hypéricines induit la même phototoxicité qu'une solution du standard, mais dont l'ajout dans une solution d'hypéricine en réduit la phototoxicité. Quant à l'extrait au chloroforme, il réduit lui aussi la phototoxicité de l'hypéricine. Ces données montrent que la préparation des extraits de Millepertuis peut être optimisée pour obtenir une phototoxicité intéressante pour la PDT, mais elles sont difficiles à interpréter car la composition des divers extraits étudiés n'est pas connue de façon précise, mais déduite d'après la polarité des molécules concernées :

- les hypéricines sont extraites du matériel végétal par l'éthanol mais pas par le chloroforme
- la préextraction au chloroforme permet d'extraire l'hyperforine, les caroténoïdes, les dérivés porphyriniques
- la préextraction au chloroforme ne permet pas d'extraire les polyphénols, les acides hydroxycinnamiques.

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

Afin d'aller au-delà de ces considérations, Schmitt et al. ont entrepris une démarche consistant à étudier l'influence de certains composés sur la phototoxicité de l'hypéricine. Leur choix s'est porté sur cinq composés choisis d'après les auteurs pour leurs propriétés antioxydantes : l'hypéroside, l'isoquercitrine, la quercétine, l'acide chlorogénique et le pyrophéophorbide. Cependant il est à noter que les deux premières familles de molécules, les flavonoïdes et les acides hydroxycinnamiques, peuvent se comporter soit comme des antioxydants, soit comme des pro-oxydants, en fonction notamment de leur concentration. Les porphyrines sont également connues pour leurs propriétés photosensibilisatrices, et ces propriétés ne sont pas à négliger, surtout dans les études comportant une photoactivation à la lumière blanche. Cependant ces considérations n'enlèvent rien à l'intérêt de la démarche entreprise dans le cadre de leur étude, et qui leur a permis de démontrer que le pyropheophorbide (0,25 et 0,50 μM) était capable de réduire la phototoxicité de l'hypéricine (dès 10 μM), expliquant de ce fait la réduction de phototoxicité observée avec l'extrait au chloroforme. Cependant l'extrait méthanolique obtenu après préextraction au chloroforme (la fraction polaire FP) présente lui aussi une capacité à réduire la phototoxicité de l'hypéricine, mais il ne contient pas de pyrophéophorbide. En ce qui concerne l'acide chlorogénique, il augmente la phototoxicité des faibles dosages d'hypéricine et diminue celle des dosages plus importants ; ce composé peut lui être présent dans FP, mais l'est également dans ET. D'autres études ont également mis en avant les propriétés phototoxiques d'autres composés, tels que le rutin ⁴¹. L'amentoflavone, que nous avons détectée par ESI-FTICRMS dans les lysats cellulaire n'a à notre connaissance pas fait l'objet d'étude visant à déterminer son influence sur la phototoxicité de l'hypéricine.

⁴¹ Wilhelm, K. P., et al., *Phytomedicine*, 2001, **8**, 4, p 306

Conclusions :

Les données présentées dans ce Chapitre ont permis de donner un aperçu des propriétés que présentent les extraits de Millepertuis en milieu cellulaire, par comparaison avec le composé de référence qu'est l'hypéricine. L'analyse par spectrophotométrie d'absorption UV-Visible des solutions d'incubation indique que l'hypéricine se trouve sous forme agrégée dans le milieu de culture RPMI 1640, et qu'une proportion d'environ 2,5 % de protéines (sous la forme de sérum de veau fœtal SVF) suffit à monomériser l'hypéricine d'une solution à $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$. Le degré d'agrégation du photosensibilisant a une influence importante sur son internalisation par les cellules ; l'ajout de 10% de SVF dans une solution d'incubation à $2,5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ d'hypéricine réduit de moitié la quantité de photosensibilisateur retrouvée dans les cellules après quatre heures d'incubation.

Les tests de cytotoxicité menés préalablement à toute autre expérience ont montré que l'extrait total de Millepertuis ne présentait pas de cytotoxicité à l'obscurité marquée envers les cellules AY-27 pour une durée d'incubation de quatre heures, typiquement utilisée pour les instillations intravésicales. Nous avons également préparé un extrait dépourvu d'hyperforine, puisque celle-ci est connue pour posséder des propriétés de cytotoxicité, par le biais d'une préextraction du matériel végétal avec deux solvants apolaires, le chloroforme et l'hexane ; cet extrait s'est également avéré non toxique, avec un taux de survie des cellules proche de 100% et légèrement supérieur à celui observé pour l'extrait total. D'après les analyses par Spectrométrie de Masse réalisées sur cet extrait, il ne contient effectivement plus d'hyperforine, mais certains de ses dérivés oxygénés, plus polaires donc moins sensibles à l'extraction par un solvant apolaire, sont encore présents en quantité limitée.

L'internalisation des composés photoactifs par les cellules AY-27 a également fait l'objet d'investigations, sur une durée d'incubation de quatre heures. Il est apparu que durant la première partie de l'expérience ils s'accumulent de façon plus importante dans les cellules lorsqu'ils sont administrés sous la forme d'extraits de Millepertuis que lorsqu'une solution d'hypéricine est utilisée. Pour des durées d'incubation plus longues, les concentrations intracellulaires tendent à se rapprocher. Il est à noter que le même phénomène est observé dans le cas d'une solution d'incubation contenant des protéines, indiquant que ce phénomène ne dépend pas de l'état d'agrégation des photosensibilisants dans le milieu. De plus, la cinétique d'incorporation est identique avec l'extrait total ET et la fraction polaire FP du Millepertuis.

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

La pseudohypéricine présente des propriétés significativement différentes de l'hypéricine. Si dans la première partie de l'incubation les concentrations intracellulaires sont les mêmes pour les deux composés, la concentration en pseudohypéricine atteint par la suite un pallier. Ce comportement permet d'expliquer les données obtenues pour l'extrait de Millepertuis et pourrait avoir pour origine une moins bonne tolérance des cellules AY-27 envers ce composé ; bien que la pseudohypéricine n'ait pas présenté de cytotoxicité au cours de notre étude, d'autres équipes l'ont précédemment mise en exergue. De plus, la pseudohypéricine est également plus polaire que l'hypéricine, ce qui pourrait ralentir son passage à travers la barrière lipidique des cellules. Lorsqu'une solution d'incubation (dépourvue de protéines) contient les deux agents photosensibles, les concentrations intracellulaires mesurées sont plus proches de celles correspondant à la pseudohypéricine ; la présence d'un dimère mixte hypéricine-pseudohypéricine sur le spectre de masse ESI-FTICRMS du mélange pourrait indiquer la présence d'agrégats mixtes dont les propriétés (cytotoxicité et polarité) se rapprocheraient plus de celles de la pseudohypéricine.

Nous avons également évalué l'influence de polyphénols connus pour augmenter le coefficient de partition eau/octanol de l'hypéricine sur l'internalisation de celle-ci. L'hypéroside et la procyanidine B2, utilisés dans des proportions du même ordre de grandeur que celles mesurées dans les extraits de Millepertuis, n'ont pas permis d'obtenir les mêmes concentrations intracellulaires en agents photosensibilisateurs que celles observées pour les extraits de Millepertuis.

L'influence du solvant d'extraction du matériel végétal a également pu être mise en évidence, avec notamment des concentrations intracellulaires en hypéricine et pseudohypéricine plus faibles dans les cellules incubées avec un extrait au méthanol évaporé puis repris dans le DMSO, par rapport aux concentrations mesurées dans le cas des extraits réalisés directement dans le DMSO ou la NMP. L'extrait réalisé dans la N-méthylpyrrolidone, dont la phototoxicité n'a pu être évaluée faute de temps, pourrait s'avérer particulièrement intéressant compte-tenu de la concentration intracellulaire en hypéricines atteinte et de la large prédominance de l'hypéricine par rapport à la pseudohypéricine dans les lysats cellulaires correspondants, qui a été ici évaluée de façon semi-quantitative en ESI-MS et dont les concentrations devront être confirmées par une analyse quantitative en LC-MS.

Les spectres de masse obtenus sur les lysats de cellules incubées ont permis de confirmer les données de spectrophotométrie UV-Visible quant à la présence des photosensibilisants dans les cellules. Les expériences menées en MS² ont fourni des empreintes identiques à celles obtenues sur les composés standards, indiquant, notamment dans le cas de la pseudohypéricine, qu'ils ne subissent pas de modification structurale. Par ailleurs nous

Chapitre VII : Millepertuis et milieu cellulaire

avons pu mettre en évidence la présence d'hyperforine dans les cellules incubées avec l'extrait total, et son absence dans les cellules incubées avec la fraction polaire ; les dérivés oxydés de l'hyperforine qui n'avaient pu être retirés par l'extraction au chloroforme et à l'hexane, ne semblent pas être présents dans les cellules, probablement en raison de leur polarité.

Les mesures de phototoxicité que nous avons réalisées ont permis de mettre en avant l'absence de phototoxicité de la pseudohypéricine dans les conditions que nous avons employées ; les résultats que nous avons obtenus sur les extraits de Millepertuis sont cohérents avec cette constatation et avec les concentrations intracellulaires déterminées pour les agents phototoxiques. Pour des durées d'incubation de deux heures, on obtient pour les extraits méthanoliques repris dans le DMSO une cytotoxicité non négligeable mais bien plus faible que pour l'hypéricine ; en revanche, dans le cas des extraits directement réalisés dans le DMSO, la photocytotoxicité est à peu près équivalente à celle mesurée pour l'hypéricine ; ceci est cohérent avec le fait que la concentration en agents photosensibles est environ 50% plus importante pour l'extrait que pour l'hypéricine, mais que la pseudohypéricine n'exerce probablement aucune phototoxicité dans ces conditions.

Conclusion générale

Conclusion générale

Les propriétés phototoxiques des fleurs de Millepertuis sont connues de longue date ; la première molécule phototoxique extraite de ces fleurs a été l'hypéricine, dont les propriétés ont rapidement conduit à son étude pour le photodiagnostic et la photothérapie des cancers dans les années 90. Si l'hypéricine s'avère très efficace lorsqu'elle est utilisée dans des conditions optimales, elle présente, comme la plupart des agents photosensibles, une solubilité faible en milieu aqueux ainsi qu'un coût de production élevé, bien que les voies de synthèse existantes fassent régulièrement l'objet d'améliorations. Dans ce contexte, l'objectif de notre travail a été d'évaluer des extraits de fleurs de Millepertuis en tant que formulation possible de l'hypéricine. Les extraits de Millepertuis, en raison de leur utilisation pour le traitement de la dépression légère, ont fait l'objet de nombreuses études concernant leur composition, leur stabilité, et les interactions médicamenteuses auxquels ils sont susceptibles de prendre part ; de ce fait, leurs propriétés sont relativement bien connues.

En premier lieu ces extraits ont été caractérisés par Spectrométrie de Masse à Temps de Vol (TOF) et à Résonance Cyclotronique des Ions à Transformée de Fourier (FTICR) de très haute résolution ; les techniques d'ionisation que nous avons utilisées, la désorption laser assistée ou non par matrice ((MALDI et LDI) et l'ionisation par électronébullisation (ESI) en injection directe, ne sont pas couramment utilisées pour l'analyse globale des extraits de plantes qui fait en général intervenir une étape de séparation chromatographique. Pour cette raison, au delà-même de notre volonté de caractériser nos extraits de Millepertuis, nous avons souhaité évaluer le potentiel de ces techniques analytiques d'une façon plus générale. La seconde étape de ce travail a été dévolue à la quantification de l'oxygène moléculaire singulet produite sous illumination par l'hypéricine et l'extrait de Millepertuis, tandis que dans une dernière partie nous avons effectué de façon prospective quelques essais en milieu cellulaire.

La technique d'Ionisation par Désorption Laser a été, au cours de cette étude, utilisée pour la première fois pour l'analyse globale d'extraits de Millepertuis. Les deux longueurs d'onde utilisées, 337 et 355 nm, ont conduit à des spectres très différents, que ce soit en mode de détection négatif ou positif. La plupart des métabolites secondaires du Millepertuis qui permettent généralement de juger de la qualité des extraits ont pu être détectés avec les deux longueurs d'onde dans l'un ou deux des modes de détection ; seules les hyperforines n'ont pu être mises en évidence à 355 nm. Ces expériences ont permis de mettre en avant le potentiel de ces techniques pour obtenir une empreinte d'un extrait de Millepertuis.

Les expériences menées en désorption laser directement sur le matériel végétal ont mis en avant la possibilité de détecter in situ les molécules de la famille des hypéricines, cependant des diamètres d'impact trop faibles ne peuvent être utilisés car ils induisent une

Conclusion générale

fragmentation de ces composés, compromettant ainsi l'étude de leur répartition spatiale semi-quantitative au niveau du végétal. Cette technique reste toutefois adaptée à la détection qualitative des composés au sein des divers organes de la plante, sans nécessiter de protocole de préparation complexe d'échantillons. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'absence d'hyperforine dans les glandes à hypéricine sans recourir à une extraction sélective de ces glandes.

Dans un second temps, nous avons évalué le potentiel de l'ionisation par Electronébullisation couplée à la Spectrométrie de Masse FTICR pour l'analyse des extraits de Millepertuis. Compte-tenu du nombre important de paramètres à régler, ceux-ci ont en premier lieu fait l'objet d'optimisations. Cette technique est celle qui nous a donné les meilleurs résultats, puisqu'elle permet en mode de détection négatif la détection d'un grand nombre de métabolites secondaires du Millepertuis : hypéricines, hyperforines, flavonoïdes, mais également acides hydroxycinnamiques et procyanidines. Il est à noter que cette technique permet la détection des hypéricines et des hyperforines avec un excellent rapport signal/bruit. En mode de détection positif, sont détectés les flavonoïdes glycosylés, les hyperforines, ainsi que quelques lipides. L'analyse de composés standard a permis de préciser le comportement des composés soumis à ce type d'ionisation, tandis que les techniques de dissociation IRMPD et SORI-CID couplées à la FTICRMS ont permis, d'une part de mettre en avant des fragmentations spontanées lors de l'analyse des extraits, et d'autre part de proposer des hypothèses concernant certains mécanismes de fragmentation encore non élucidés, notamment en ce qui concerne l'hyperforine et les hypéricines.

Les études menées concernant la production d'oxygène moléculaire singulet des divers photosensibilisants ont nécessité l'emploi d'une sonde spécifique à l'oxygène moléculaire singulet, le diphenylisobenzofurane, dont le suivi de la dégradation par GC-MS a permis de mettre en avant une production d' $^1\text{O}_2$ équivalente pour l'hypéricine et la pseudohypéricine dans les conditions employées. A l'inverse, la protohypéricine, à laquelle nous nous sommes intéressés en raison de la possibilité d'obtenir des extraits très riches en protopigments, a démontré une capacité très réduite à générer de l' $^1\text{O}_2$. Enfin, l'extrait de Millepertuis démontre lui une production d'oxygène moléculaire singulet plus importante que l'hypéricine dans les mêmes conditions, à laquelle pourraient participer les protopigments et les chlorophylles présents dans l'extrait.

Les études préliminaires que nous avons menées en milieu cellulaire ont mis en avant la non cytotoxicité des extraits à la concentration que nous avons étudiée. Toutefois, en raison d'une légère diminution de la viabilité des cellules incubées avec l'extrait total (ET), nous

Conclusion générale

avons également préparé un extrait dépourvu d'hyperforine (composé connu pour être cytotoxique) au moyen d'une préextraction du matériel végétal avec des solvants apolaires. Les analyses menées en ESI-FTICRMS sur cet extrait ont mis en avant l'absence d'hyperforine mais la présence de certains de ses dérivés oxydés connus et d'autres détectés pour la première fois, qui, compte tenu de leur polarité plus importante, ont été moins sensibles à l'extraction par l'hexane et le chloroforme. Toutefois, l'analyse en spectrométrie de masse de lysats de cellules incubées avec cette fraction polaire (FP) du Millepertuis indique d'une part, que les cellules sont bien exemptes d'hyperforine, et d'autre part que ces dérivés oxydés ne traversent pas la barrière membranaire dans nos conditions d'incubation.

La pseudohypéricine, quant à elle, possède une moins bonne capacité à entrer dans les cellules. Quand bien même nous nous sommes placés dans des conditions qui permettent son internalisation dans les mêmes conditions que l'hypéricine, sa phototoxicité s'est avérée quasi nulle dans nos conditions expérimentales.

Des différences d'internalisation sont également apparues entre l'hypéricine pure et les extraits de Millepertuis. Il semble que pour les durées d'incubation les plus courtes, les concentrations intracellulaires en hypéricines soient plus importantes dans le cas de l'extrait de Millepertuis réalisé directement dans le DMSO. Dans ces conditions, la phototoxicité des extraits est identique à celle de l'hypéricine, probablement en raison de la faible phototoxicité de la pseudohypéricine ; l'analyse par ESI-FTICRMS des lysats de cellules incubées avec l'extrait total indique la présence d'amentoflavone qui pourrait éventuellement par son action antioxydante réduire la phototoxicité des hypéricine et devra faire l'objet d'investigations futures. En revanche, dans le cas des extraits méthanoliques repris dans le DMSO, il semble que l'internalisation des composés photoactifs se fasse moins bien.

Ces résultats indiquent que les extraits de Millepertuis peuvent se comporter comme des agents photosensibilisants efficaces dans certaines conditions ; si nous avons pu mettre en avant la phototoxicité de l'hypéricine utilisée sous la forme d'extraits de Millepertuis, l'étude de l'influence des autres composés présents dans les extraits ouvre de nouvelles perspectives pour la compréhension des propriétés de ces extraits.

Perspectives

Perspectives

Les résultats obtenus en milieu cellulaires ont permis d'avancer quelques hypothèses concernant le comportement des extraits de Millepertuis. Cependant, diverses voies d'investigation peuvent être envisagées afin de les préciser.

Les cinétiques d'internalisation observées pour la pseudohypéricine et les extraits de Millepertuis présentent des paliers qui pourraient avoir pour cause une réaction de la cellule au contact de ces photosensibilisants. Si dans le cadre de notre étude ils ne se sont pas révélés toxiques, une évaluation de leur toxicité chronique par des expériences de type essais clonogéniques est à envisager. Dans le cas où une cytotoxicité chronique serait mise en évidence, une réduction des concentrations employées devra être mise en oeuvre.

Par ailleurs, dans le cadre de perspectives concernant le photodiagnostic des lésions de la vessie, des analyses *in vivo* pourront être entreprise afin de déterminer dans quelle mesure les extraits de Millepertuis permettent une accumulation sélective des hypéricines dans les tissus cancéreux par rapport au cas où l'hypéricine standard est employée.

D'autre part, les résultats mitigés obtenus concernant la pseudohypéricine nous orientent vers l'utilisation d'extraits ayant un rapport hypéricine/pseudohypéricine le plus élevé possible, d'autant que certaines équipes ont relevé une cytotoxicité plus marquée pour la pseudohypéricine par rapport à l'hypéricine. A ce titre, l'extrait que nous avons préparé dans la N-méthylpyrrolidone pourrait s'avérer intéressant compte-tenu du rapport hypéricine/pseudohypéricine que nous avons estimé être clairement en faveur de l'hypéricine dans les cellules incubées avec cet extrait, et qui devra être confirmé par une des expériences de LC-MS quantitatives. Il sera donc intéressant de mesurer la phototoxicité de cet extrait. De même, il sera plus judicieux par la suite de normaliser les extraits en hypéricine et non plus en concentration totale en hypéricines.

Il est à noter que les expériences que nous avons menées l'ont été sans ajout de protéines dans les milieux d'incubation, compte-tenu de l'instabilité qui avait été reportée pour la pseudohypéricine dans ce type de milieu. Les expériences menées dans le futur devront, pour se rapprocher des conditions cliniques, inclure une étape de monomérisation des hypéricines par une protéine de type albumine par exemple. La concentration en protéine pourra éventuellement faire l'objet d'ajustements, selon l'affinité des divers composés pour celle-ci, afin de pouvoir faire entrer préférentiellement l'hypéricine dans les cellules.

Perspectives

Par ailleurs le couplage d'une chromatographie liquide sur la source Electrospray du spectromètre de masse FTICR 9,4 T devrait permettre une analyse plus fine des lysats de cellules incubées et de s'affranchir de l'effet de matrice induit par les phospholipides notamment ; si cette technique de détection met en évidence d'autres composés antioxydants (que la biapigénine que nous avons pu mettre en évidence en injection directe) dans les cellules, un suivi de la métabolisation de ces composés permettrait de déterminer les moments les plus favorables à la photoactivation de l'hypéricine.

L'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire montre que l'hypéricine, qui présente un fort potentiel dans le cadre du photodiagnostic et de la photothérapie des cancers, ne voit pas son activité réduite au sein des extraits de Millepertuis, que de plus la présence d'antioxydants ne gêne pas forcément sa phototoxicité et qu'enfin ce type de formulation peut conduire à une meilleure internalisation des composés photosensibles hypéricine et pseudohypéricine dans les cellules tumorales.

Nous avons effectué tout au long de ce travail une veille bibliographique constante. Un nombre important d'articles concernant les propriétés photodynamiques des extraits de Millepertuis sont parus durant ces toutes dernières années. Nous avons confronté nos résultats avec ceux de la bibliographie notamment dans le Chapitre consacré aux études en milieu cellulaire. Nos travaux, ainsi que ceux de la bibliographie récente, ouvrent la voie vers de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer comparée à celle faisant intervenir des agents photosensibilisateurs plus classiquement utilisés.

Tables des figures et tableaux

Table des figures

Chapitre I :

Figure I. 1 : Structure générique des phénanthropérylène quinones	5
Figure I. 2 : Mécanisme photochimique de la Thérapie Photodynamique	7
Figure I. 3 : Configurations électroniques de l'oxygène moléculaire (HOMO)	9
Figure I. 4 : Acidités bay (a.) et peri (b.) de l'hypéricine.....	13
Figure I. 5 : Structure du skyrin et de la protohypéricine isolés de <i>Dermocybe Austroveneta</i>	14
Figure I. 6 : Structures de l'acide hypéricinique et du fagopyrin	15
Figure I. 7 : Voie de semi-synthèse proposée pour l'hypéricine par Falk et al.....	16
Figure I. 8 : Voie de semi-synthèse proposée pour l'hypéricine par Zalkow et al.	17
Figure I. 9 : Spectres d'absorption (1), de fluorescence (2 : excitation par un laser Ar ⁺ à 293K), et de phosphorescence (3 : excitation à 549nm, $\Delta\lambda_{exc} = 2,5nm$, 77K) de l'hypéricine dans l'éthanol.....	20
Figure I. 10 : Spectres d'absorption de l'hypéricine (3.8×10-6M) dans l'éthanol - trait continu : éthanol neutre, trait pointillé : éthanol acide, traits+points : éthanol basique.....	20
Figure I. 11 : Image endoscopique de la vessie après instillation d'hypéricine (40mL d'une solution à 8μM pendant 2 heures : P, lésion papillaire ; N, muqueuse normale)	29

Chapitre II :

Figure II. 1 : La fleur de Millepertuis	36
Figure II. 2 : Les principaux phénylpropanoïdes présents dans le Millepertuis.....	38
Figure II. 3 : Xanthonnes du Millepertuis	38
Figure II. 4 : Principaux flavonoïdes présents dans le Millepertuis : dérivés de la quercétine	39
Figure II. 5 : Positions de glycosylation les plus communément observées sur les unités flavone, flavonol et flavanone (les aglycones en gras correspondent à celles répertoriées dans les extraits de Millepertuis	39
Figure II. 6 : Les biflavones du Millepertuis.....	40
Figure II. 7 : Principaux tanins du Millepertuis	41
Figure II. 8 : Structure de l'acide gallique.....	41
Figure II. 9 : Voies de désactivation de l'oxygène moléculaire singulet	42
Figure II. 10 : Les principaux caroténoïdes du Millepertuis.....	44
Figure II. 11 : L'hyperforine et l'adhyperforine	44
Figure II. 12 : L'hydropéroxyacidiforine	45
Figure II. 13 : Dérivés de l'hyperforine (à gauche, l'hyperforine ; au milieu, hyperfirine ; à droite, secohyperforine)	46
Figure II. 14 : Produits de dégradation de l'hyperforine (à gauche, R=H → Furohyperforine, R=OH → Furohyperforine hydroperoxyde, à droite oxepahyperforine) observés dans le méthanol	46
Figure II. 15 : Principaux composés de la famille de l'hypéricine présents dans le Millepertuis	47
Figure II. 16 : Voie de biosynthèse probable de l'hypéricine dans <i>Hypericum Perforatum</i>	48

Figure II. 17 : a. : pseudohypéricine dégradée par NaOH 0,5N ; b., c. : hypothèses de produits de dégradation (la liaison en pointillés peut être simple ou double)	49
Figure II. 18 : Evolution de différentes formulations galéniques de Millepertuis (jaune : flavonols, bleu : hyperforines, magenta : hypéricines, ronds : Millepertuis+lactose+stéarate de Mg, carrés : Millepertuis+lactose+stéarate de Mg+antioxydants).....	54
Figure II. 19 : Photodégradation des flavonols, hypéricines et hyperforines.....	55
Figure II. 20 : Effet de l'hypéricine seule, de l'hyperforine seule, et de l'administration conjointe des deux molécules sur deux lignées de cellules cancéreuses	57

Chapitre III :

Figure III. 1 : Spectres d'absorption de l'hypéricine (a) et de la pseudohypéricine (b).....	64
Figure III. 2 : Spectre d'absorption de la <i>chlorophylle a</i> à 10^{-5} M dans le méthanol (a), spectre typique d'un extrait de fleurs de Millepertuis (b)	65
Figure III. 3 : Spectres d'absorption UV-Vis typiquement observé pour les cyanidines à 0,1 M (1 : pH=1, 2 : pH=3, 3 : pH=4,6, 4 : pH=5,7, 5 : pH=6,5, 6 : pH=7,6).....	66
Figure III. 4 : Spectre d'absorption de la protohypéricine dans le méthanol (a.), transformation de la protohypéricine en hypéricine par l'action de la lumière du jour ($c=10^{-5}$ M) (b.)	66
Figure III. 5 : Chromatogramme obtenu sur un extrait de Millepertuis ; la détection par spectrophotométrie d'absorption à 591 nm permet l'analyse des naphthodianthrones.....	67
Figure III. 6 : Principe de la Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice (MALDI)	68
Figure III. 7 : Schéma de notre spectromètre à temps de vol configuré en mode réflectron.....	73
Figure III. 8 : Schéma du FTICRMS 9,4T couplé à la source ProMALDI.....	74
Figure III. 9 : Schéma du FTICRMS 9.4T IonSpec couplé à la source électrospray.....	77
Figure III. 10 : Représentation schématique d'un quadripôle.....	78
Figure III. 11 : Schéma de la cellule d'analyse de la FTICRMS 9.4T.....	80
Figure III. 12 : Calcul de la fréquence cyclotronique des ions.....	81
Figure III. 13 : Séquence FTICRMS typique	85
Figure III. 14 : Accélération/décélération induites par l'application d'une fréquence supérieure à la fréquence cyclotronique de l'ion	86
Figure III. 15 : Spectres de fragmentation obtenus en impact électronique (70eV) pour le diphenylisobenzofurane (DPBF, en bas) et l'orthodibenzoylbenzene (oBB, en haut)	88
Figure III. 16 : Représentation du microscope à épifluorescence Olympus AX 70 (Olympus America inc.).....	90
Figure III. 17 : Conversion du MTT en formazan	91

Chapitre IV :

Figure IV. 1 : Spectre ESI-CAD-MS obtenu par Piperopoulos et al. pour l'hypéricine	95
Figure IV. 2 : Nomenclature proposée par Domon et al. pour les fragmentations glycosidiques observées en FAB-MS/MS.....	96
Figure IV. 3 : Nomenclature proposée par Ma et al. pour les fragments issus de l'ion pseudomoléculaire $[M+H]^+$ de la partie aglycone des flavonoïdes	96

Figure IV. 4 : Distributions isotopiques obtenues lors de l'analyse d'une solution d'hypéricine à 10^{-5} M par LDI-TOF en mode de détection néгатif (a.) et positif (b.) et MALDI-TOF en mode positif (c.)	99
Figure IV. 5 : Spectre LDI-TOFMS en mode de détection néгатif d'un extrait méthanolique de Millepertuis	101
Figure IV. 6 : Spectre LDI-TOFMS obtenu en mode de détection positif pour l'acide 2,5-dihydrobenzoïque (2,5-DHB) (concentration 10^{-1} M, mode positif, $\lambda=337$ nm, 80 % d'atténuation laser)	102
Figure IV. 7 : Spectre MALDI-TOFMS en mode de détection positif d'un extrait de Millepertuis (# : pics de matrice, $\lambda = 337$ nm, 90% d'atténuation laser)	104
Figure IV. 8 : Structures des chlorophylles, phéophytines et phéophorbides	105
Figure IV. 9 : Agrandissement des zones du spectre de l'extrait de Millepertuis correspondant aux dérivés de la chlorophylle	105
Figure IV. 10 : Spectre MALDI-TOFMS de la <i>chlorophylle a</i> à : a. 95 %, b. 90 % d'atténuation laser ($\lambda= 337$ nm)	106
Figure IV. 11 : Structure du terthiophène.....	107
Figure IV. 12 : Structure générale des phospholipides	107
Figure IV. 13 : Agrandissement de la zone du spectre de l'extrait de Millepertuis correspondant aux phospholipides.....	108
Figure IV. 14 : Spectre LDI-FTICRMS en mode de détection néгатif pour 10 μ L d'extrait déposés.....	110
Figure IV. 15 : Spectre d'absorption UV-Visible enregistré pour l'hyperforine dans le méthanol.....	111
Figure IV. 16 : Spectre MALDI-FTICRMS obtenu en mode de détection positif pour l'extrait méthanolique de fleurs de Millepertuis.....	112
Figure IV. 17 : Spectre de fragmentation obtenu en mode SORI-CID pour le pic $m/z = 539$	113
Figure IV. 18 : Schéma de fragmentation proposé pour le pic $m/z = 539$ (les fragmentations sont présentées sur la molécule d'amentoflavone, sauf dans le cas de perte de phénol)	114
Figure IV. 19 : Spectre MALDI-FTICRMS obtenu en mode de détection positif pour l'extrait méthanolique de Millepertuis ($m/z < 539$, matrice 2,5 DHB à 1M, $\lambda = 355$ nm)	116
Figure IV. 20 : Spectre MALDI-FTICRMS obtenu en mode de détection positif pour l'extrait méthanolique de Millepertuis ($m/z > 539$, matrice 2,5 DHB à 1M, $\lambda = 355$ nm)	116
Figure IV. 21 : Répartition spatiale en intensité absolue des pics à m/z 503 (a) et 519 (b) sur une surface du pétale contenant une glande	122
Figure IV. 22 : Spectre de masse obtenu en LDI-TOFMS (mode de détection néгатif) sur une glande à hypéricines ($\lambda = 266$ nm)	123
Figure IV. 23 : Spectre LDI-TOFMS obtenu à 65% d'atténuation laser en mode de détection néгатif sur une solution méthanolique d'hypéricine (10^{-5} M)	123
Figure IV. 24 : Spectre LDI-TOFMS obtenu à 65% d'atténuation laser en mode de détection néгатif sur une solution méthanolique de pseudohypéricine (10^{-5} M)	124
Figure IV. 25 : A gauche, l'échantillon de pétale de Millepertuis analysé par IMS (rectangle en pointillés = zone étudiée), à droite, des taches ne conduisant pas à la détection des hypéricines	126
Figure IV. 26 : Spectre ProMALDI-FTICRMS obtenu en mode de détection néгатif par analyse directe d'une glande noire présente sur un pétale de fleur de Millepertuis	127
Figure IV. 27 : A gauche, image obtenue par MET sur une glande à hypéricines (la flèche indique les cellules périphériques aplaties soupçonnées d'être les siège de la biosynthèse des hypéricines d'après ⁶⁸); à droite, répartition spatiale du pic pseudomoléculaire (m/z 503) de l'hypéricine obtenue par LDI-TOFMS sur un pétale de fleur de Millepertuis	129

Chapitre V :

Figure V. 1 : Influence du potentiel appliqué à la pointe électrospray sur l'intensité totale des ions détectés dans le cadre de l'analyse d'un extrait méthanolique de Millepertuis.....	133
Figure V. 2 : Influence de la tension du cône d'échantillonnage.....	134
Figure V. 3 : Influence du potentiel du cône d'échantillonnage sur a. : l'intensité totale mesurée, b. : l'intensité des pics à m/z 487, 503, 517 et 519, c. : le rapport d'intensités 519/503).....	135
Figure V. 4 : Influence de la valeur du shutter DC sur l'intensité totale des pics observés sur les spectres de masse.....	136
Figure V. 5 : Influence de la durée d'accumulation (en secondes) des ions dans Q3	137
Figure V. 6 : Spectre ESI-FTICRMS en mode de détection négatif d'un extrait de Millepertuis brut	138
Figure V. 7 : Agrandissement de la zone correspondant aux phloroglucinols	138
Figure V. 8 : Agrandissement de la zone correspondant à l'hypéricine	139
Figure V. 9 : Spectre ESI-FTICRMS obtenu en mode de détection positif pour un extrait méthanolique de Millepertuis avec une différence de potentiel importante entre le cône d'échantillonnage et le cône d'extraction (120V).....	141
Figure V. 10 : Spectre obtenu en mode de détection positif pour un extrait total de Millepertuis avec une différence de potentiel entre le cône d'échantillonnage et le cône d'extraction de 40V et après un ajout d'1% d'acide formique pur dans la solution	142
Figure V. 11 : Spectre ESI-FTICRMS de l'hyperforine (10^{-7} M dans le méthanol) en mode de détection négatif (conditions d'analyse équivalentes à celles utilisées pour les extraits de Millepertuis).....	145
Figure V. 12 : Spectre MS ² SORI-CID de l'hyperforine en mode de détection négatif	146
Figure V. 13 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'hyperforine en mode de détection négatif	147
Figure V. 14 : Mécanisme de perte de CO ₂ proposé par Flechtner et al. pour l'anion hydrophénoxyde	148
Figure V. 15 : Proposition de mécanisme de perte de CO ₂ conduisant au fragment à m/z 351	149
Figure V. 16 : Proposition de mécanisme pour la formation de l'ion m/z 407	149
Figure V. 17 : Proposition de mécanisme pour la formation de l'ion m/z 337	150
Figure V. 18 : Spectre de fragmentation SORI-CID de l'ion protoné (m/z 537,4) de l'hyperforine en mode de détection positif	151
Figure V. 19 : Spectre ESI-FTICRMS obtenu en mode de détection négatif pour une solution méthanolique d'hypéroside à 10^{-6} M	152
Figure V. 20 : Spectre de fragmentation MS ² SORI-CID obtenu pour l'ion à m/z 927 présent sur le spectre ESIFTCRMS de l'extrait de Millepertuis en mode de détection négatif	153
Figure V. 21 : Spectre de fragmentation MS ² IRMPD du pic observé à m/z 959 sur les extraits de Millepertuis en mode de détection positif (100ms à 100%)	154
Figure V. 22 : Schéma de fragmentation proposé pour le diglycoside-diacylglycérol à m/z 959	155
Figure V. 23 : Structure générale des céramides	156
Figure V. 24 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'ion m/z 503 (analyse d'une solution méthanolique d'hypéricine à 10^{-6} M) en mode de détection négatif	158
Figure V. 25 : Expériences de MS ³ et MS ⁴ réalisées sur la molécule d'hypéricine dans le but d'en préciser les voies de fragmentation	159
Figure V. 26 : Mécanisme de perte de CH ₄ pour la molécule d'hypéricine a	160

Figure V. 27 : Mécanismes proposés pour la perte de CO ₂	161
Figure V. 28 : Mécanisme le plus probable pour la perte de CO ₂	162
Figure V. 29 : Mécanismes de perte de CH ₂ =C=O et H ₂ O	163
Figure V. 30 : Structures de la pseudohypéricine (g) et de l'isopseudohypéricine (h).....	164
Figure V. 31 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'ion à m/z 519 (analyse d'une solution méthanolique de pseudohypéricine à 10 ⁻⁶ M) en mode de détection négatif	164
Figure V. 32 : Fragments isobares présents à m/z 475 sur le spectre MS ² de la pseudohypéricine	165
Figure V. 33 : Propositions de structures pour les ions résultant des pertes de CH ₃ OH et CH ₂ O	165
Figure V. 34 : Proposition de structure pour l'ion résultant de la perte de CH ₄ par la pseudohypéricine.....	166
Figure V. 35 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'ion à m/z 519 correspondant à l'isopseudohypéricine (analyse d'une solution méthanolique de pseudohypéricine à 10 ⁻⁶ M basifiée par l'ammoniaque) en mode de détection négatif	167
Figure V. 36 : Spectre de fragmentation IRMPD obtenu pour l'ion à m/z 519 (laser : 2 secondes à 100%) en mode de détection négatif	168
Figure V. 37 : Mécanisme de perte de méthane pour l'isopseudohypéricine.....	168
Figure V. 38 : Spectre de fragmentation IRMPD l'ion à m/z 505 (analyse d'une solution de protohypéricine à 10 ⁻⁶ M) en mode de détection négatif	169
Figure V. 39 : Spectre de fragmentation IRMPD de l'ion à m/z 521 (analyse d'un extrait de bourgeons normalisé à 5.10 ⁻⁶ M en hypéricines totales) en mode de détection négatif	170

Chapitre VI :

Figure VI. 1 : Oxydation du DPBF par l'oxygène moléculaire singulet.....	178
Figure VI. 2 : Spectres d'absorption UV-Vis du DPBF (a.) et de l'oBB (b.) à 10 ⁻⁵ M dans l'éthanol.....	178
Figure VI. 3 : Stabilité du DPBF dans nos conditions d'irradiation.....	182
Figure VI. 4 : Evolution du spectre d'absorption UV-Visible d'une solution contenant hypéricine, DPBF et o-BB, pendant le temps nécessaire à son analyse par GC-MS.....	182
Figure VI. 5 : Influence de l'agitation sur la vitesse de dégradation du DPBF en présence d'hypéricine au cours d'une illumination laser à 591 nm	183
Figure VI. 6 : Influence de l'oxygénation du mélange hypéricine/DPBF sur la cinétique de disparition du DPBF au cours de l'illumination laser à 591 nm.....	184
Figure VI. 7 : Evolution des concentrations de DPBF et d'oBB mesurées au cours de l'illumination laser d'une solution contenant de l'hypéricine et du DPBF	184
Figure VI. 8 : Spectres LDI-TOF en mode de détection négatif obtenus pour des extraits réalisés à l'obscurité de a : un broyat de fleurs, b : des fleurs entières, c : des bourgeons, d : des fleurs protégées de la lumière par du papier depuis le stade du bourgeonnement.....	186
Figure VI. 9 : Pourcentage de DPBF transformé en 4 minutes d'illumination à 591 nm par les solutions d'extrait de Millepertuis, de pseudohypéricine (PHP), d'hypéricine+pseudohypéricine (PHP+HP) et de protohypéricine (pHP) par rapport à une solution d'hypéricine (HP) dans les mêmes conditions	188
Figure VI. 10 : Spectres LDI-TOFMS de la solution d'extrait de millepertuis à t = 0, 4 et 8 minutes d'irradiation laser à 591 nm (M correspond à m/z 503 et M' à m/z 519, soient les pics pseudomoléculaires de l'hypéricine et de la pseudohypéricine ; les signaux correspondant aux protopigments contribuent à l'intensité des signaux en M+2 et M'+2)	189

Figure VI. 11 : Spectres LDI-TOFMS de la solution de protohypéricine irradiée à t = 0 et t = 4 minutes d'illumination laser à 591 nm	190
Figure VI. 12 : Pourcentage de DPBF transformé en 4 minutes d'illumination à 532 nm par les solutions d'extrait et de protohypéricine (pHP) par rapport à une solution d'hypéricine dans les mêmes conditions.....	190
Figure VI. 13 : Cinétique de transformation de la protohypéricine en hypéricine sous illumination laser à 590 nm (orange) et 532 nm (vert).....	191

Chapitre VII :

Figure VII. 1 : Spectres UV-Visible de l'hypéricine à 10^{-4} M (a.) et 10^{-5} M (b.) dans du milieu RPMI 1640.....	195
Figure VII. 2 : Influence de la proportion en DMSO et en SVF dans le milieu d'incubation sur le degré d'internalisation de l'hypéricine (incubation de quatre heures).....	196
Figure VII. 3 : Spectre ESIFTICRMS en mode de détection négatif de l'extrait obtenu après préextraction du matériel végétal avec les solvants apolaires chloroforme et hexane	198
Figure VII. 4 : Spectre ESIFTICRMS en mode de détection positif de l'extrait obtenu après préextraction du matériel végétal avec les solvants apolaires.....	199
Figure VII. 5 : Agrandissement de la zone en pointillés du spectre ESI-FTICRMS présenté sur la Figure VII. 4	200
Figure VII. 6 : Voies de mono-oxydation de l'hyperforine proposées par Fuzzati et al. d'après une étude par LC-MS dans a. le méthanol (en présence d'air), b. le <i>n</i> -hexane (MW = 552 g.mol ⁻¹ pour tous les composés)	201
Figure VII. 7 : Tests de cytotoxicité réalisés avec l'hypéricine pure, l'extrait total (ET) de Millepertuis, ses fractions polaire (FP) et apolaire (FA), concentration en hypéricines des solutions d'incubation : 2,5 μ M).....	204
Figure VII. 8 : Images obtenues en microscopie à épifluorescence sur les cellules AY-27 incubées pendant 4 h avec l'hypéricine à $2,5 \cdot 10^{-6}$ M (à gauche) et la fraction polaire du Millepertuis (extrait réalisé directement dans le DMSO normalisé à $2,5 \cdot 10^{-6}$ M en hypéricines, à droite)	207
Figure VII. 9 : Cinétiques d'absorption des hypéricines par des cellules AY-27 incubées avec de l'hypéricine, de l'extrait total (ET) et de la fraction polaire (FP) du Millepertuis (solutions normalisées à 2,5 μ M d'hypéricines) ; a. : en l'absence de protéines dans le milieu d'incubation ; b. avec un milieu d'incubation contenant 10% de protéines (Sérum de Veau Fœtal SVF)	208
Figure VII. 10 : Spectre ESI-FTICRMS en mode de détection négatif pour une solution contenant hypéricine (HP) à 1,25 μ M et pseudohypéricine (PHP) à 1,25 μ M.....	210
Figure VII. 11 : Cinétiques d'absorption des hypéricines par des cellules AY-27 incubées avec de l'hypéricine (2,5 μ M), de la pseudohypéricine (2,5 μ M) et un mélange équimolaire de ces deux composés (1,25 μ M) dans un milieu d'incubation ne contenant pas de protéines	211
Figure VII. 12 : Cinétiques d'internalisation obtenues pour la pseudohypéricine sur les lignées cellulaires MCF-7, HT-29 et A549	212
Figure VII. 13 : Influence de l'hypéroside et de la procyanidine B2 sur la concentration intracellulaire en hypéricine obtenue après une heure d'incubation des cellules (milieu d'incubation ne contenant pas de protéines)	214
Figure VII. 14 : Influence du solvant d'extraction sur la concentration intracellulaire en hypéricines (incubations de 4 heures à 2,5 μ M)	216
Figure VII. 15 : Spectre MALDI-TOF en mode de détection positif de la phase apolaire du Millepertuis (matrice 2,5-DHB à 10^{-2} M, # : pics de matrice).....	218
Figure VII. 16 : Spectres ESI-FTICRMS obtenu pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec l'extrait total (ET) en mode de détection négatif	219

Figure VII. 17 : Spectre de fragmentation IRMPD (500 ms d'irradiation à 100% de puissance laser) du lipide présent à m/z 861 sur le spectre ESI-FTICRMS en mode de détection négatif – Le massif isolé comprend également en plus faible abondance le dérivé monoinsaturé à m/z 863 – Pour R ₁ et R ₂ , voir la nomenclature des phospholipides précisée en Annexes	220
Figure VII. 18 : Spectres ESI-FTICRMS obtenu pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec l'extrait total (ET) en mode de détection positif	220
Figure VII. 19 : Spectre de fragmentation IRMPD (750 ms d'irradiation à 100% de puissance) du lipide présent à m/z 809 sur le spectre ESI-FTICRMS en mode de détection positif – Nomenclature présentée en annexe.....	221
Figure VII. 20 : Spectres ESI-FTICRMS obtenu pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec la fraction polaire (FP) en mode de détection négatif	221
Figure VII. 21 : Spectres ESI-FTICRMS obtenu pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec la fraction polaire (FP) en mode de détection positif	222
Figure VII. 22 : Spectre ESI-FTICRMS obtenu en mode de détection négatif pour un lysat méthanolique de cellules AY-27 incubées avec l'extrait au NMP (extrait total).....	223
Figure VII. 23 : Spectre ESI-FTICRMS en mode de détection négatif d'un mélange équimolaire d'hypéricine et de pseudohypéricine	223
Figure VII. 24 : Spectre ESI-FTICRMS en mode de détection négatif d'un extrait de Millepertuis (extrait total) préparé dans la N-méthylpyrrolidone (dilué à 1/1000 dans le méthanol).....	224
Figure VII. 25 : Dispositif expérimental utilisé pour l'irradiation laser des échantillons biologiques	226
Figure VII. 26 : Phototoxicité de l'hypéricine, de la pseudohypéricine et d'un mélange des deux composés sur les cellules AY-27.....	229
Figure VII. 27 : Photocytotoxicité des extraits de Millepertuis sur les cellules AY-27	230

Table des tableaux

Chapitre I :

Tableau I. 1 : Données publiées concernant les valeurs de pKa mesurées pour l'hypericine	18
Tableau I. 2 : Rendements quantiques de production d'oxygène moléculaire singulet mesurés pour l'hypericine dans divers milieux	21
Tableau I. 3 : Données bibliographiques concernant la localisation subcellulaire de l'hypericine.....	24

Chapitre II :

Tableau II. 1 : Constantes de réaction de l'oxygène singulet avec quelques polyphénols'	42
Tableau II. 2 : Principales formulations du Millepertuis (traitement de la dépression)	53

Chapitre III :

Tableau III. 1 : Conditions d'analyse MALDI-TOFMS fréquemment utilisées pour les principales familles de molécules susceptibles d'être présentes dans les extraits de Millepertuis (ND = Données non disponibles).....	71
Tableau III. 2 : Caractéristiques des blocs disponibles sur le microscope à épifluorescence Olympus AX 70 (Olympus America inc.)	90

Chapitre IV :

Tableau IV. 1 : Tableau récapitulatif des rapports signal/bruit obtenus pour la détection de l'hypericine (solution méthanolique à 10^{-5} M) en (MA)LDI/TOFMS dans les différentes conditions testées (ND : non détecté ; 2,5-DHB : acide 2,5-dihydroxybenzoïque ; AV : acide vanillique ; AN : acide nicotinique ; HCCA : acide α -cyano-4-hydroxycinnamique ; ; TFA : acide trifluoroacétique 1%)	100
Tableau IV. 2 : Données expérimentales et théoriques pour les ions détectés en mode de détection négatif en LDI-TOFMS sur l'extrait de Millepertuis.....	100
Tableau IV. 3 : Données expérimentales et théoriques pour les ions détectés en mode de détection positif en MALDI-FTICRMS sur l'extrait de Millepertuis	117
Tableau IV. 4 : Utilisation de la Spectrométrie de Masse pour l'analyse directe d'échantillons végétaux	120

Chapitre V :

Tableau V. 1 : Données expérimentales et théoriques pour les ions détectés en mode de détection négatif en ESI-FTICRMS sur l'extrait de Millepertuis	140
--	-----

Tableau V. 2 : Formules brutes théoriques des ions non identifiés sur les spectres ESI-FTICRMS de l'extrait méthanolique de Millepertuis	143
Tableau V. 3 : Identification des fragments détectés pour l'hyperforine en mode SORI-CID	146
Tableau V. 4 : Fragments détectés pour l'hyperforine uniquement en mode IRMPD	147
Tableau V. 5 : Pertes de neutres observées en ESI-MS/MS (mode néгатif) sur certaines anthraquinones.....	157
Tableau V. 6 : Apport de la spectrométrie de masse très haute résolution et de la MS ³ pour l'identification des fragments de l'hyperforine.....	160

Chapitre VI :

Tableau VI. 1 : Récapitulatif des données bibliographiques concernant la comparaison entre la production d'oxygène moléculaire singulet de la pseudohyperforine et celle de l'hyperforine.....	176
Tableau VI. 2 : Rapports protopigments/pigments d'après les données LDI-TOFMS (Figure VI. 8).....	184

Chapitre VII :

Tableau VII. 1 : Influence de la méthode d'extraction sur le rapport pseudohyperforine/hyperforine d'après Smelcerovic et al.	213
Tableau VII. 2 : Tableau comparatif des variables utilisées par Kamuhabwa et al. pour la photodestruction des cellules AY-27 en lumière continue et celles utilisées en lumière pulsée au cours de nos expériences.....	227

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Composés de référence et solvants utilisés au cours de cette étude

Nom du composé	Abréviat ion utilisée	Masse molaire (g.mol⁻¹)	Origine	Aspect	Pureté (évaluée par le fournisseur sauf pour la protohypéricine)
Hexane			Carlos Erba (Peypin, France)	Liquide incolore	95%
Chloroforme	CHCl ₃		Carlos Erba-SDS (Peypin, France)	Liquide incolore	99,9%
Diméthylsulfoxyde	DMSO		Carlos Erba (Peypin, France)	Liquide incolore	99,5%
Méthanol	MeOH		VWR International (Fontenay sous bois, France)	Liquide incolore	
Hypéricine	HP	504,45	Planta Natural Products (Vienna, Austria)	Solide noir	>99% (HPLC)
Pseudohypéricine	PHP	520,45	Planta Natural Products (Vienna, Austria)	Solide noir	>99% (HPLC)
Protohypéricine	pHP	506,45	Lintz University (Austria) Groupe du Professeur H. Falk	Solide noir	85-90% (ESI-MS (Université de Linz), LDI-TOFMS, spectro UV-Vis et HPLC (LSMCL))
Emodine		270,24	Sigma-Aldrich	Solide jaune	90 % (HPLC)
Hyperforine	HYP	536,79	HWI Analytik GmbH	En solution dans MeOH	90% (HPLC)
Hypéroside	Hyp	464,38	Sigma-Aldrich	Solide blanc	90 % (HPLC)
Procyanidine B2	PB2	578,52	Sigma-Aldrich	Solide blanc	90 % (HPLC)

Annexe 2 : Liste des abréviations utilisées

2,5 DHB	Acide <u>2,5</u> - <u>d</u> ihydroxy <u>b</u> enzoïque
ALA	Acide 5- <u>a</u> mino <u>l</u> aeuvulinique
ASE	Extraction par Solvant Accélérée (<u>A</u> celerated <u>S</u> olvent <u>E</u> xtraction)
CAD	<u>C</u> ollisionnaly <u>A</u> ctivated <u>D</u> issociation
CI	<u>C</u> onversion <u>i</u> nterne
CID	<u>C</u> ollisionnaly <u>I</u> nduced <u>D</u> issociation
CIS	<u>C</u> roisement <u>I</u> nter- <u>S</u> ystème
CIS	<u>C</u> arcinome <u>I</u> n <u>S</u> itu
ddp	<u>D</u> ifférence <u>d</u> e <u>p</u> otentiel
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxide
DPBF	Diphénylisobenzofurane
ECD	<u>E</u> lectron <u>C</u> apture <u>D</u> issociation
ECS	<u>E</u> lectrode au <u>c</u> alomel <u>s</u> aturé
ESI	<u>E</u> lectrospray <u>I</u> onization (Ionisation par Electronébulisation)
ET	<u>E</u> xtrait <u>t</u> otal
eV	<u>E</u> lectron- <u>V</u> olt
FA	<u>F</u> raction <u>a</u> polaire
FAB	<u>F</u> ast <u>A</u> tom <u>B</u> ombardment (Bombardement d'atomes rapides)
FP	<u>F</u> raction <u>p</u> olaire
FTICRMS	<u>F</u> ourier <u>T</u> ransform <u>I</u> on <u>C</u> yclotronic <u>R</u> esonance <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry (Spectrométrie de Masse à Résonance Cyclotronique des Ions à Transformée de Fourier)
GALDI	<u>G</u> raphite- <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption- <u>I</u> onization (Désorption/Ionisation Laser Assistée par Graphite)
HP	Hypéricine
HPLC	<u>H</u> igh <u>P</u> erformance <u>L</u> iquid <u>C</u> hromatography (Chromatographie Liquide Haute Performance)
HYP	<u>H</u> yperforine
IMS	<u>I</u> magerie par <u>S</u> pectrométrie de <u>M</u> asse
IRMPD	<u>I</u> nfra <u>R</u> ed <u>M</u> ulti <u>P</u> hoton <u>D</u> issociation
LDI	<u>L</u> aser <u>D</u> esorption- <u>I</u> onization (Désorption/Ionisation Laser)
MALDI	<u>M</u> atrix- <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption- <u>I</u> onization (Désorption/Ionisation Laser Assistée par Matrice)

Annexes

MEB	<u>M</u> icroscopie <u>é</u> lectronique à <u>b</u> alayage
MET	<u>M</u> icroscopie <u>E</u> lectronique en <u>T</u> ransmission
MIKES	<u>M</u> ass- <u>A</u> nalyzed <u>I</u> on <u>K</u> inetic <u>E</u> nergy <u>S</u> pectrometry
MM	<u>M</u> asse <u>m</u> olaire
mTHPC	m- <u>T</u> étra <u>H</u> ydroxy <u>P</u> hény <u>C</u> hlorine
MTT	3-(4,5-di <u>M</u> éthyl <u>t</u> hiazol-2-yl)-2,5diphény <u>T</u> etrazolium
Nd-YAG	Monocrystal de grenat $Y_3Al_5O_{12}$ dopé au néodyme
NMP	<u>N</u> - <u>m</u> éthylpyrrolidone
oBB	<u>O</u> rtho-di <u>B</u> enzoy <u>B</u> enzène
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> aline (Tampon physiologique)
PDD	<u>P</u> hoto <u>D</u> ynamic <u>D</u> iagnosis (Diagnostic Photodynamique)
PDT	<u>P</u> hotodynamic <u>T</u> herapy (Thérapie Photodynamique)
PEG	<u>P</u> oly <u>é</u> thylène glycol
PHP	<u>P</u> seudo <u>h</u> ypéricine
pHP	<u>P</u> roto <u>h</u> ypéricine
pPHP	<u>P</u> rotopseudo <u>h</u> ypéricine
ppm	<u>P</u> artie <u>P</u> ar <u>M</u> illion
RDA	<u>R</u> étro <u>D</u> iels <u>A</u> lder
RF	<u>R</u> adio <u>f</u> réquence
RMN	<u>R</u> ésonance <u>M</u> agnétique <u>N</u> ucléaire
ROS	<u>R</u> eactive <u>O</u> xygen <u>S</u> pecies (Espèces Réactives de l'oxygène)
SDS	<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate
SIMS	<u>S</u> econdary <u>I</u> ons <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry (Spectrométrie de Masse des Ions Secondaires)
SPE	Extraction sur Phase Solide (<u>S</u> olid- <u>P</u> hase <u>E</u> xtraction)
SVF	<u>S</u> érum de <u>V</u> eau <u>F</u> oetal
THAP	<u>T</u> etra <u>h</u> ydroxy <u>a</u> cétophénone
TOFMS	<u>T</u> ime of <u>F</u> light <u>M</u> ass <u>S</u> pectrometry (Spectrométrie de Masse à Temps de Vol)
UV-Vis	<u>U</u> ltraviolet- <u>V</u> isible

Annexe 3 : Mesures de masses exactes

Ion détecté	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
[Quercétine-H] ⁻	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301,035	301,036	2	4000
[Hypéroside-H] ⁻	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463,088	463,086	4	4480
[Hypéricine-H] ⁻	C ₃₀ H ₁₅ O ₈ ⁻	503,077	503,081	7	3800
[Pseudohypéricine-H] ⁻	C ₃₀ H ₁₅ O ₉ ⁻	519,072	519,079	14	4100
[Hyperforine-H] ⁻	C ₃₅ H ₅₁ O ₄ ⁻	535,379	535,379	1	6200
[Amentoflavone-H] ⁻	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	537,083	537,090	14	5800
[Adhyperforine-H] ⁻	C ₃₆ H ₅₃ O ₄ ⁻	549,395	549,385	20	6000
[Rutin-H] ⁻	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609,146	609,147	1	7000

Spectre de l'extrait méthanolique LDI-TOF négatif (Chapitre IV, I. B. 1.)

Annexes

Ion détecté	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
[Kaempférol+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	287.055	287.066	38	6117
[Quercétine+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁺	303.050	303.059	30	3860
[Apigenin glucoside+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₀ ⁺	433.113	433.127	32	7528
[Quercitrine+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ ⁺	449.108	449.093	33	8000
[Hypéroside+H] ⁺	C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂ ⁺	465.103	465.088	31	7949
[Hypéroside +Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ Na ⁺	487.085	487.089	8	7262
[Hypéroside+K] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ K ⁺	503.059	503.060	2	7624
[Amentoflavone+H] ⁺	C ₃₀ H ₁₉ O ₁₀ ⁺	539.097	539.110	24	6531
[Phéophorbide a + H] ⁺	C ₃₅ H ₃₇ N ₄ O ₅ ⁺	593.276	593.267	15	8722
[Phéophorbide b+H] ⁺	C ₃₅ H ₃₅ N ₄ O ₆ ⁺	607.255	607.250	9	9515
[PC(34,3)+H] ⁺	C ₄₂ H ₇₉ NO ₈ P ⁺	756.554	756.560	8	10810
[PC(34,2)+H] ⁺	C ₄₂ H ₈₁ NO ₈ P ⁺	758.569	758.575	7	11634
[PC(34,1)+H] ⁺	C ₄₂ H ₈₃ NO ₈ P ⁺	760.585	760.582	4	11323
[PC(36,6)+H] ⁺	C ₄₄ H ₇₇ NO ₈ P ⁺	778.538	778.538	0	11666
[PC(36,5)+H] ⁺	C ₄₄ H ₇₉ NO ₈ P ⁺	780.554	780.556	3	12249
[PC(36,4)+H] ⁺	C ₄₄ H ₈₁ NO ₈ P ⁺	782.569	782.572	3	12236
[PC(36,3)+H] ⁺	C ₄₄ H ₈₃ NO ₈ P ⁺	784.585	784.582	4	10733
[PC(36,2)+H] ⁺	C ₄₄ H ₈₅ NO ₈ P ⁺	786.601	786.601	0	11580
[PC(34,3)+K] ⁺	C ₄₂ H ₇₈ NO ₈ PK ⁺	794.510	794.516	8	9007
[PC(34,2)+K] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ PK ⁺	796.525	796.520	7	11874
[PC(34,1)+K] ⁺	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ PK ⁺	798.541	798.547	7	11524
[Rutine+Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ Na ⁺	633.143	633.155	20	10918
[Rutine+K] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ K ⁺	649.117	649.141	38	9719
[Phéophytine a+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₅ ⁺	871.573	871.571	3	11557
[Phéophytine b+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₃ N ₄ O ₆ ⁺	885.552	885.533	22	12020

Spectre de l'extrait méthanolique en MALDI-TOF (mode positif, DHB) (Chapitre IV, I. B. 2.)

Annexes

Formule brute	Masse mesurée	Masse calculée	Erreur (ppm)
$C_{30}H_{17}O_9^+$	521.08701	521.08671	0.6
$C_{28}H_{17}O_9^+$	497.08658	497.08671	0.3
$C_{29}H_{19}O_8^+$	495.10747	495.10744	0.1
$C_{28}H_{15}O_8^+$	479.07651	479.07614	0.8
$C_{29}H_{17}O_7^+$	477.09727	477.09688	0.8
$C_{26}H_{15}O_8^+$	455.07635	455.07614	0.5
$C_{27}H_{17}O_7^+$	453.09717	453.09688	0.6
$C_{24}H_{13}O_9^+$	445.05561	445.05541	0.4
$C_{22}H_{13}O_9^+$	421.05562	421.05541	0.5
$C_{23}H_{15}O_8^+$	419.07634	419.07614	0.5
$C_{23}H_{13}O_8^+$	417.06078	417.06049	0.7
$C_{24}H_{13}O_7^+$	413.06579	413.06558	0.5
$C_{22}H_{11}O_8^+$	403.04449	403.04484	0.9
$C_{23}H_{15}O_6^+$	387.08620	387.08631	0.3
$C_{21}H_{13}O_7^+$	377.06539	377.06558	0.5
$C_{20}H_9O_7^+$	361.03456	361.03428	0.8
$C_{22}H_{15}O_5^+$	359.09160	359.09140	0.6
$C_{21}H_{11}O_6^+$	359.05521	359.05501	0.6
$C_{20}H_{11}O_6^+$	347.05523	347.05501	0.6
$C_{19}H_{11}O_6^+$	335.05519	335.05501	0.5
$C_{20}H_{11}O_5^+$	331.06032	331.06010	0.7
$C_{19}H_{11}O_5^+$	319.06027	319.06010	0.5
$C_{18}H_{11}O_5^+$	307.06027	307.06010	0.6
$C_7H_5O_4^+$	153.01878	153.01824	0.4

Spectre de fragmentation SORI-CID de l'amentoflavone/biapigénine ProMALDI-FTICRMS (Chapitre IV, II. C. 2. ii.)

Annexes

Ion détecté	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
[Kaempférol+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₆ ⁺	287.05501	287.05518	0.6	824300
[Quercétine+H] ⁺	C ₁₅ H ₁₁ O ₇ ⁺	303.04993	303.04971	0.7	785000
[2Glucose-H ₂ O+Na] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ Na ⁺	365.10543	365.10549	0.2	665100
[2Glucose-H ₂ O+K] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ K ⁺	381.07937	381.07977	1	644000
[Hypéroside +Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ Na ⁺	487.08470	487.0848	0.2	503200
[Hypéroside+K] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ K ⁺	503.05863	503.05871	0.2	486600
[Hypéricine+H] ⁺	C ₃₀ H ₁₇ O ₈ ⁺	505.09179	505.09238	1.2	501100
[Pseudohypéricine] ⁺⁺	C ₃₀ H ₁₆ O ₉ ⁺	520.07888	520.07924	0.7	463800
[Pseudohypéricine+H] ⁺	C ₃₀ H ₁₇ O ₉ ⁺	521.08671	521.0869	0.4	471000
[3Glucose-2H ₂ O+Na] ⁺	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ Na ⁺	527.15826	527.15811	0.3	454200
[Pyrophéophorbide a-2H +H] ⁺	C ₃₃ H ₃₃ N ₄ O ₃ ⁺	533.25472	533.25436	0.7	457900
[Fragment PC(34,2)+H] ⁺	C ₃₇ H ₆₇ O ₄ ⁺	575.50339	575.50316	0.4	421200
[Phéophorbide a+H] ⁺	C ₃₅ H ₃₇ N ₄ O ₅ ⁺	593.27585	593.27547	0.6	419600
[Phéophorbide b+H] ⁺	C ₃₅ H ₃₅ N ₄ O ₆ ⁺	607.25511	607.25513	0	396800
[Rutine+Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ Na ⁺	633.14261	633.14094	2.6	388900
[Rutine+K] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ K ⁺	649.11654	649.11577	1.2	383300
[PC(34,2)-triméthylamine+K] ⁺	C ₃₉ H ₇₁ O ₈ PK ⁺	737.45181	737.45314	1.8	321400
[PC(34,3)+H] ⁺	C ₄₂ H ₇₉ NO ₈ P ⁺	756.55378	756.55462	1.1	319200
[PC(36,5)+H] ⁺	C ₄₄ H ₇₉ NO ₈ P ⁺	780.55378	780.55410	0.4	316400
[PC(34,2)+K] ⁺	C ₄₂ H ₈₀ NO ₈ PK ⁺	796.52531	796.52651	1.5	301800
[Phéophytine a+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₅ N ₄ O ₅ ⁺	871.57320	871.57336	0.2	273400
[Phéophytine b+H] ⁺	C ₅₅ H ₇₃ N ₄ O ₆ ⁺	885.55246	885.55541	3.3	279600

Spectre ProMALDI-FTICRMS de l'extrait en mode de détection positif (II. C. 2. iii)

Annexes

Composé (sous forme [M-H] ⁻)	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
Quercétine	C ₁₅ H ₉ O ₇ ⁻	301.03482	301.03497	0.5	288100
Fragment hyperforine	C ₁₉ H ₂₁ O ₄ ⁻	313.14453	313.14447	0.2	296900
Fragment hyperforine	C ₂₀ H ₂₅ O ₃ ⁻	313.18092	313.18089	0.1	303000
Fragment hyperforine	C ₁₉ H ₂₃ O ₄ ⁻	315.16018	315.16027	0.3	254700
Acide chlorogénique	C ₁₆ H ₁₇ O ₉ ⁻	353.08725	353.08746	0.6	246700
Fragment hyperforine	C ₂₄ H ₃₁ O ₄ ⁻	383.22278	383.22312	0.9	255800
Fragment hyperforine	C ₂₆ H ₃₅ O ₃ ⁻	395.25917	395.25921	0.1	242900
Fragment hyperforine	C ₂₅ H ₃₃ O ₄ ⁻	397.23843	397.23803	1	245700
Quercitrine	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ ⁻	447.09329	447.09293	0,8	209500
Hypéroside	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂ ⁻	463.08820	463.08852	0,7	199200
Quercétine glucuronoside	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₃ ⁻	477.06746	477.06765	0,4	198500
Hypéricine	C ₃₀ H ₁₅ O ₈ ⁻	503.07724	503.07664	1,2	214100
[3 Glucose – 2H ₂ O]	C ₁₈ H ₃₂ O ₁₆ ⁻	503.16176	503.16166	0.2	205000
Pseudohypéricine	C ₃₀ H ₁₅ O ₉ ⁻	519.07216	519.07174	0,8	230900
Hyperforine	C ₃₅ H ₅₁ O ₄ ⁻	535.37928	535.37933	0,1	196500
Amentoflavone/Biapigenin	C ₃₀ H ₁₇ O ₁₀ ⁻	537.08272	537.08234	0,7	194800
Furohyperforine	C ₃₅ H ₅₁ O ₅ ⁻	551.37420	551.37376	0,8	187600
Furohyperforine hydroperoxyde	C ₃₅ H ₅₁ O ₆ ⁻	567.36911	567.36854	1,0	184100
Procyanidine B2	C ₃₀ H ₂₇ O ₁₂ ⁻	577.13515	577.13550	0,6	156400
Rutin	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₆ ⁻	609.14611	609.14654	0,7	145600
Procyanidine C2	C ₄₅ H ₃₇ O ₁₈ ⁻	865.19854	865.19932	0,9	120400
2 Hypéroside	C ₄₂ H ₃₉ O ₂₄ ⁻	927.18368	927.18349	0.2	117700
Hypéroside + Amentoflavone	C ₅₁ H ₃₇ O ₂₂ ⁻	1001.17820	1001.17770	0.5	97000
Procyanidine D2	C ₆₀ H ₄₉ O ₂₄ ⁻	1153.26193	1153.26251	0.5	90500

Spectre ESI-FTICRMS en mode négatif (Chapitre V, II. C. 1.)

Annexes

Espèce	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
[2 Glucose-H ₂ O+Na] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ Na ⁺	365.10543	365.10550	0.2	345800
[2 Glucose-H ₂ O+K] ⁺	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁ K ⁺	381.07937	381.07941	0.1	321600
[Hypéroside + Na] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ Na ⁺	487.08470	487.08509	0,8	254400
[Hypéroside + K] ⁺	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ K ⁺	503.05863	503.05862	0	253900
[Hyperforine + H] ⁺	C ₃₅ H ₅₃ O ₄ ⁺	537.39384	537.39341	0,8	224800
[Furohyperforine + H] ⁺	C ₃₅ H ₅₃ O ₅ ⁺	553.38875	553.38847	0,5	209100
[Hyperforine + Na] ⁺	C ₃₅ H ₅₂ O ₄ Na ⁺	559.37578	559.37617	0,7	223900
[Hyperforine + K] ⁺	C ₃₅ H ₅₂ O ₄ K ⁺	575.34972	575.35001	0,5	168500
[Furohyperforine + K] ⁺	C ₃₅ H ₅₂ O ₅ K ⁺	591.34463	591.34510	0,8	205800
[Furohyperforine hydroperoxyde + Na] ⁺	C ₃₅ H ₅₂ O ₆ Na ⁺	591.36561	591.36555	0,1	155900
[Furohyperforine hydroperoxyde + K] ⁺	C ₃₅ H ₅₂ O ₆ K ⁺	607.33955	607.33973	0,3	223600
[Rutin + Na] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ Na ⁺	633.14261	633.14312	0,8	182200
[Galactosyl-di-linoléylglycérol+Na] ⁺	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₀ Na ⁺	797.51742	797.51838	1.2	189000
[Galactosyl-di-linoléylglycérol oxydé + Na] ⁺	C ₄₅ H ₇₄ O ₁₁ Na ⁺	813.51233	813.51290	0.7	170500
[Di-galactosyl-di-linoléylglycérol + H] ⁺	C ₅₁ H ₈₅ O ₁₅ ⁺	937.58830	937.58764	0.7	163200
[Di-galactosyl-di-linoléylglycérol + Na] ⁺	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₅ Na ⁺	959.57024	959.57014	0.1	245300
[Di-galactosyl-di-linoléylglycérol oxydé + Na] ⁺	C ₅₁ H ₈₄ O ₁₆ Na ⁺	975.56516	975.56614	1.0	239400

Spectre ESI-FTICRMS en mode positif sans acide formique (Chapitre V, II. C. 2.)

Annexes

Espèce	Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
Fragment céramide ?	$C_{22}H_{44}NO^+$	338.34174	338.34147	0.8	288100
Fragment hyperforine	$C_{23}H_{31}O_3^+$	355.22677	355.22669	0.2	307300
	$C_{21}H_{44}O_4^{++}$	360.32341	360.32366	0.7	266800
[2 Glucose-H ₂ O+Na] ⁺	$C_{12}H_{22}O_{11}Na^+$	365.10543	365.10542	0.0	278500
	$C_{24}H_{39}O_4^+$	391.28429	391.28401	0.7	243100
Fragment hyperforine	$C_{27}H_{39}O_3^+$	411.28937	411.28921	0.4	253000
Fragment hyperforine	$C_{26}H_{37}O_4^+$	413.26864	413.26878	0.3	218400
	$C_{26}H_{43}O_4^+$	419.31559	419.31599	1	266400
Fragment hyperforine	$C_{30}H_{45}O_4^+$	469.33124	469.33123	0.0	223300
Fragment hyperforine	$C_{31}H_{45}O_4^+$	481.33124	481.33158	0.7	241300
[Hypéroside + Na] ⁺	$C_{21}H_{20}O_{12}Na^+$	487.08470	487.08503	0.7	234100
[Hyperforine + H] ⁺	$C_{35}H_{53}O_4^+$	537.39384	537.39303	1.5	206300
[Amentoflavone+H] ⁺	$C_{30}H_{19}O_{10}^+$	539.09727	539.09824	1.8	230800
[Furohyperforine-2H+H] ⁺	$C_{35}H_{51}O_5^+$	551.37310	551.37390	1.5	
[Adhyperforine+H] ⁺	$C_{36}H_{55}O_4^+$	551.40949	551.41030	1.5	265100
[Furohyperforine/oxepahyperforine+H] ⁺	$C_{35}H_{53}O_5^+$	553.38875	553.38860	0.3	190400
[Hyperforine + Na] ⁺	$C_{35}H_{52}O_4Na^+$	559.37578	559.37484	1.7	195300
[Furohyperforine hydroperoxyde + H] ⁺	$C_{35}H_{53}O_6^+$	569.38367	569.38333	0.6	191400
[Hyperforine + K] ⁺	$C_{35}H_{52}O_4K^+$	575.34972	575.35051	1.4	241900
[Furohyperforine/oxepahyperforine+Na] ⁺	$C_{35}H_{52}O_5Na^+$	575.37070	575.37038	0.6	177900
[Furohyperforine hydroperoxyde+Na] ⁺	$C_{35}H_{52}O_6Na^+$	591.36561	591.36574	0.2	224000
[Furohyperforine hydroperoxyde+K] ⁺	$C_{35}H_{52}O_6K^+$	607.33955	607.34121	0.3	295300

Spectre ESI-FTICRMS en mode positif avec acide formique (Chapitre V, II. C. 2.)

Annexes

Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
$C_{30}H_{42}O_4^-$	466.30886	466.30978	2	35400
$C_{29}H_{39}O_4^-$	451.28538	451.28531	0.2	36100
$C_{27}H_{35}O_4^-$	423.25408	423.25413	0.1	37500
$C_{26}H_{35}O_4^-$	411.25408	411.25424	0.4	39100
$C_{28}H_{39}O_2^-$	407.29555	407.29588	0.8	36800
$C_{25}H_{33}O_4^-$	397.23843	397.23839	0.1	39800
$C_{26}H_{35}O_3^-$	395.25917	395.25920	0.1	41000
$C_{25}H_{33}O_3^-$	381.24352	381.24354	0.1	41900
$C_{26}H_{35}O_2^-$	379.26425	379.26439	0.4	42700
$C_{25}H_{33}O_2^-$	365.24860	365.24864	0.1	44800
$C_{24}H_{33}O_2^-$	353.24860	353.24878	0.5	44300
$C_{25}H_{35}O^-$	351.26934	351.26932	0.1	46000
$C_{24}H_{33}O^-$	337.25369	337.25870	0.0	48000
$C_{24}H_{31}O^-$	335.23804	335.23823	0.6	49800
$C_{21}H_{25}O_3^-$	325.18092	325.18113	0.7	47400
$C_{19}H_{23}O_4^-$	315.16018	315.16017	0.0	50900
$C_{20}H_{25}O_3^-$	313.18092	313.18093	0.0	51500
$C_{19}H_{21}O_4^-$	313.14453	313.14462	0.3	52500

Spectre de fragmentation IRMPD de l'hyperforine en mode de détection négatif (Chapitre V, II. A. 2.)

Annexes

Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
$C_{31}H_{45}O_4^+$	481.33124	481.33120	0.1	33100
$C_{30}H_{45}O_4^+$	469.33124	469.33102	0.5	34400
$C_{26}H_{37}O_4^+$	413.26864	413.26878	0.3	38300
$C_{27}H_{39}O_3^+$	411.28937	411.28933	0.1	38300
$C_{22}H_{29}O_4^+$	357.20604	357.20580	0.7	44200
$C_{23}H_{31}O_3^+$	355.22677	355.22669	0.2	44200
$C_{21}H_{29}O_4^+$	345.20604	345.20600	0.1	45000

Spectre de fragmentation SORI-CID de l'hyperforine en mode de détection positif (Chapitre V, II. A. 2.)

Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
$C_{29}H_{11}O_8^-$	487.04594	487.04650	1.1	33000
$C_{29}H_{15}O_7^-$	475.08233	475.08238	0.1	31000
$C_{28}H_{13}O_7^-$	461.06668	461.06672	0.1	33700
$C_{29}H_{15}O_6^-$	459.08741	459.08696	1.0	32600
$C_{29}H_{14}O_6^-$	458.07959	458.07957	0.0	31600
$C_{28}H_{15}O_6^-$	447.08741	447.08768	0.6	34800
$C_{27}H_9O_7^-$	445.03538	445.03532	0.1	33900
$C_{28}H_{12}O_6^-$	444.06394	444.06383	0.2	33800
$C_{28}H_{11}O_6^-$	443.05611	443.05612	0.0	33700
$C_{27}H_{13}O_6^-$	433.07176	433.07160	0.4	34100
$C_{28}H_{15}O_5^-$	431.09250	431.09228	0.5	34700
$C_{27}H_{15}O_5^-$	419.09250	419.09223	0.7	37400
$C_{28}H_{13}O_4^-$	413.08193	413.08175	0.4	34500
$C_{26}H_{13}O_5^-$	405.07685	405.07699	0.4	38700
$C_{25}H_{13}O_3^-$	361.08702	361.08716	0.4	46100

Spectre de fragmentation IRMPD de l'hypericine en mode de détection négatif (Chapitre V, II. D. 1.)

Annexes

Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
$C_{29}H_{11}O_9^-$	503.04086	503.04082	0.1	57200
$C_{30}H_{13}O_8^-$	501.06159	501.06193	0.7	55500
$C_{29}H_{13}O_8^-$	489.06159	489.06190	0.6	55700
$C_{29}H_{11}O_8^-$	487.04594	487.04587	0.1	58800
$C_{29}H_{10}O_8^-$	486.03812	486.03836	0.5	56700
$C_{29}H_{15}O_7^-$	475.08233	475.08225	0.2	56800
$C_{28}H_{11}O_8^-$	475.04594	475.04580	0.3	59500
$C_{27}H_9O_8^-$	461.03029	461.03055	0.6	64600
$C_{28}H_{11}O_7^-$	459.05103	459.05099	0.1	56800
$C_{29}H_{13}O_6^-$	457.07176	457.07185	0.2	55600
$C_{26}H_{11}O_8^-$	451.04594	451.04678	1.9	62200
$C_{27}H_{11}O_7^-$	447.05103	447.05102	0.0	56600
$C_{28}H_{15}O_6^-$	447.08741	447.08752	0.2	55900
$C_{28}H_{13}O_6^-$	445.07176	445.07200	0.5	58300
$C_{28}H_{11}O_6^-$	443.05611	443.05616	0.1	58700
$C_{29}H_9O_7^-$	433.03538	433.03558	0.5	65800
$C_{27}H_{11}O_6^-$	431.05611	431.05619	0.2	61000
$C_{25}H_9O_7^-$	421.03538	421.03539	0.0	64100
$C_{26}H_{11}O_5^-$	403.06120	403.06118	0.0	64500
$C_{24}H_9O_5^-$	377.04555	377.04556	0.0	67700

Spectre de fragmentation IRMPD de la pseudohypéricine en mode de détection négatif (Chapitre V, II.
D. 2.)

Annexes

Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
$C_{29}H_{11}O_9^-$	503.04086	503.04096	0.2	31300
$C_{30}H_{13}O_8^-$	501.06159	501.05977	3	23700
$C_{29}H_{11}O_8^-$	487.04594	487.04591	0.1	33200
$C_{29}H_{15}O_7^-$	475.08233	475.08216	0.4	34900
$C_{28}H_{11}O_8^-$	475.04594	475.04678	1.8	33700
$C_{27}H_9O_8^-$	461.03029	461.03054	0.5	34900
$C_{28}H_{11}O_7^-$	459.05103	459.05069	0.7	34200
$C_{27}H_{11}O_7^-$	447.05103	447.05128	0.6	36400
$C_{28}H_{11}O_6^-$	443.05611	443.05616	0.1	36800
$C_{26}H_9O_7^-$	433.03538	433.03545	0.2	36700
$C_{27}H_{11}O_6^-$	431.05611	431.05617	0.1	36700

Spectre de fragmentation IRMPD de l'isopseudohypéricine en mode de détection négatif (II. D. 3.)

Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
$C_{29}H_{13}O_8^-$	489.06159	489.06186	0.5	32500
$C_{29}H_{17}O_7^-$	477.09798	477.09820	0.5	32400
$C_{28}H_{15}O_7^-$	463.08233	463.08242	0.2	33200
$C_{29}H_{17}O_6^-$	461.10306	461.10241	1.4	31600
$C_{28}H_{13}O_7^-$	461.06668	461.06675	0.2	32900
$C_{27}H_{11}O_7^-$	447.05103	447.05116	0.3	34600
$C_{28}H_{13}O_6^-$	445.07176	445.07171	0.1	34000
$C_{27}H_{15}O_6^-$	435.08741	435.08714	0.6	33700
$C_{28}H_{17}O_5^-$	433.10815	433.10787	0.6	33900
$C_{26}H_{11}O_6^-$	419.05611	419.05602	0.2	35400
$C_{27}H_{13}O_5^-$	417.07685	417.07674	0.3	35000
$C_{26}H_{15}O_5^-$	407.09250	407.09235	0.4	36700
$C_{27}H_{17}O_4^-$	405.11323	405.11330	0.2	36400
$C_{25}H_{11}O_5^-$	391.06120	391.06133	0.3	41100
$C_{26}H_{13}O_4^-$	389.08193	389.08230	1.0	38900

Spectre de fragmentation IRMPD de la protohypéricine en mode de détection négatif (Chapitre V, II.

D. 4.)

Annexes

Formule brute	Masse exacte	Masse mesurée	Erreur (ppm)	Résolution
$C_{29}H_{13}O_9^-$	505.05651	505.05632	0.4	32000
$C_{29}H_{17}O_8^-$	493.09289	493.09303	0.3	33300
$C_{29}H_{13}O_8^-$	489.06159	489.06143	0.3	32000
$C_{29}H_{11}O_8^-$	487.04594	487.04639	0.9	30700
$C_{28}H_{15}O_8^-$	479.07724	479.07735	0.2	33500
$C_{29}H_{17}O_7^-$	477.09798	477.09785	0.3	33800
$C_{28}H_{13}O_7^-$	461.06668	461.06669	0.0	34400
$C_{28}H_{17}O_6^-$	449.10306	449.10307	0.0	35800
$C_{28}H_{13}O_6^-$	445.07176	445.07189	0.3	35700
$C_{26}H_{15}O_6^-$	423.08741	423.08738	0.1	38000
$C_{27}H_{17}O_5^-$	421.10815	421.10831	0.4	38700
$C_{25}H_{11}O_6^-$	407.05611	407.05601	0.2	40300
$C_{24}H_{11}O_5^-$	379.06120	379.06120	0.0	42800
$C_{24}H_{11}O_4^-$	363.06628	363.06629	0.0	43100

Spectre de fragmentation IRMPD de la protopseudohypéricine en mode de détection négatif (Chapitre V, II. D. 4.)

**Annexe 4 : Tableau non exhaustif des espèces chimiques
susceptibles d'être présentes dans les extraits de Millepertuis
(données bibliographiques)**

	Dérivés d'antraquinone
	Dérivés de chlorophylle
	Phloroglucinols
	Acides gras
	Caroténoïdes et xanthophylles
	Polyphénols

Nom du composé	Formule	Masse	[M+Na] ⁺	[M+K] ⁺	[M-H] ⁻
Acide gamma aminobutyrique	C4H9O2N	103.06333	126.05255	142.02649	102.05605
Choline	C5H14NO ⁺	104.10699			
Pyrocatechol / Resorcinol	C6H4(OH)2	110.03678	133.02655	149.00049	109.02895
2-méthyl-octane/6-méthyl-6-heptène-2-one/pyrogallol	C6H3(OH)3	126.03169	149.02146	164.9954	125.02386
Nonane ^[1]	C9H20	128.15650	151.14627	167.12021	127.14867
Pinene / Myrcene / Limonene ^[1]	C10H16	136.12520	159.11497	175.08891	135.11737
3 methylnonane	C10H22	142.17215	165.16192	181.13586	141.16432
Acide cinnamique ^[2]	C9H8O2	148.05243	171.04165	187.01559	147.04515
Protocatechuic acid ^[3]	C7H6O4	154.02661	177.01583	192.98977	153.01933
Eucalyptol	C10H18O	154.13577	177.12554	193.09948	153.12794
Coumaric acid	C9H8O3	164.04734	187.03711	203.01105	163.03951
Caffeic acid	C9H8O4	180.04226	203.03203	219.00597	179.03443
Dodecanol	C12H26O	186.19837	209.18814	225.16208	185.19054
Ascorbic acid	C6H8O6	176.03209	199.02186	214.9958	175.02426
Geranyl acetate	C12H20O2	196.14633	219.1361	235.11004	195.1385
Lauric acid	C12H24O2	200.17763	223.1674	239.14134	199.1698
Germacrene / b caryophyllene / Cadinene ^[1]	C15H24	204.1878	227.17757	243.15151	203.17997
Caryophyllene oxyde ^[1]	C15H24O	220.18272	243.17249	259.14643	219.17489
Acide myristique	C14H28O2	228.20893	251.1987	267.17264	227.2011
Palmitoleic acid	C16H30O2	254.22458	277.21435	293.18829	253.21675
Emodinanthrone ^[2]	C15H12O4	256.07356	279.06333	295.03727	255.06573
Palmitic acid	C16H32O2	256.24023	279.23	295.20394	255.2324
Tetrahydroxyxanthone ^[2]	C13H8O6	260.03209	283.02186	298.9958	259.02426
Emodin	C15H10O5	270.05282	293.04259	309.01653	269.04499
Apigenin	C15H10O5	270.05282	293.04259	309.01653	269.04499
Gallocatechin	C12H14O7	270.07395	293.06317	309.03711	269.06668
Oleic acid	C18H34O2	282.25588	305.24565	321.21959	281.24805
Kaempferol	C15H10O6	286.04774	309.03751	325.01145	285.03991
Cyanidin	C15H11O6 ⁺	287.05501			

Annexes

Epicatechin	C15H14O6	290.07904	313.06881	329.04275	289.07121
Quercetin ^[2]	C15H10O7	302.04265	325.03242	341.00636	301.03482
Dihydroquercetin, taxifolin	C15H12O7	304.0583	327.04807	343.02201	303.05047
Isorhamnetin	C16H12O7	316.0583	339.04807	355.02201	315.05047
Myricetin	C15H10O8	318.03757	341.02734	357.00128	317.02974
Chlorogenic acid (base acide coumarique)	C16H18O8	338.10017	361.08939	377.06333	337.09289
Erucic acid	C22H42O2	338.31848	361.30825	377.28219	337.31065
Chlorogenic acid (base acide cafféique) ^[4]	C16H18O9	354.09508	377.08485	393.05879	353.08725
Lignoceric acid	C24H48O2	368.36543	391.3552	407.32914	367.3576
Sitostérol	C29H50O	414.38617	437.37594	453.34988	413.37834
Mangiferin ^[5]	C19H18O11	422.08491	445.07413	461.04807	421.07763
Kaempferol rhamnoside, apigenin glucoside	C21H20O10	432.10565	455.09542	471.06936	431.09782
Kielcorin C ^[2]	C26H24O6	432.15729	455.14706	471.121	431.14946
Cyanidin rhamnoside ^[3]	C21H21O10+	433.11292			
Guaijaverin ^[3]	C20H18O11	434.08491	457.07413	473.04807	433.07763
Quercitrin ^[2]	C21H20O11	448.10056	471.09033	487.06427	447.09273
Cyanidin glucoside ^[6]	C21H21O11+	449.10784			
Isorientin ^[3]	C21H22O11	450.11621	473.10543	489.07937	449.10894
Hyperoside / Isoquercitrin ^[2]	C21H20O12	464.09548	487.08525	503.05919	463.08765
Secohyperforine ^[7]	C30H44O4	468.32396	491.31318	507.28712	467.31668
Miquielanin ^[3]	C22H20O12	476.09548	499.08470	515.05863	475.08820
Adsecohyperforine ^[7]	C31H46O4	482.33961	505.32883	521.30277	481.33233
Hyperfoliatin ^[8]	C31H46O5	498.33452	521.32375	537.29768	497.32725
Cyclopseudohypericin ^[2]	C30H12O8	500.05322	523.04299	539.01693	499.04539
Hypericin ^[2]	C30H16O8	504.08452	527.07429	543.04823	503.07669
Quercetin acetyl galactoside ^[3]	C23H22O13	506.10604	529.09526	545.06920	505.09876
Protohypericin ^[2]	C30H18O8	506.10017	529.08994	545.06388	505.09234
Pseudohypericin ^[2]	C30H16O9	520.07943	543.0692	559.04314	519.0716
Protopseudohypericin ^[2]	C30H18O9	522.09508	545.08485	561.05879	521.08725
Hyperforin ^[2]	C35H52O4	536.38656	559.37633	575.35027	535.37873
Lycopene / beta Carotene	C40H56	536.4382	559.42797	575.40191	535.43037
Biapigenin / Amentoflavone ^[2]	C30H18O10	538.09	561.07977	577.05371	537.08217
Adhyperforin ^[2]	C36H54O4	550.40221	573.39198	589.36592	549.39438
Furohyperforin / Oxepahyperforin ^[9]	C35H52O5	552.38147	575.37124	591.34518	551.37364
Cryptoxanthin	C40H56O	552.43312	575.42289	591.39683	551.42529
Canthaxanthin	C40H52O2	564.39673	587.3865	603.36044	563.3889
Furoadhyperforin ^[9]	C36H54O5	566.39712	589.38689	605.36083	565.38929
Furohyperforin hydroperoxyde ^[9]	C35H52O6	568.37639	591.36616	607.3401	567.36856
Lutein / Zeaxanthin / Xanthophyll	C40H56O2	568.42803	591.4178	607.39174	567.4202
Procyanidin A	C30H24O12	576.12678	599.11655	615.09049	575.11895
Procyanidin B ^[2]	C30H26O12	578.14243	601.1322	617.10614	577.1346
Furoadhyperforin hydroperoxyde ^[9]	C36H54O6	582.39204	605.38181	621.35575	581.38421
Antheraxanthin	C40H56O3	584.42295	607.41272	623.38666	583.41512
Pheophorbide a	C35H36N4O5	592.26857	615.25834	631.23228	591.26074
Pheophorbide b	C35H34N4O6	606.24783	629.2376	645.21154	605.24
Astaxanthin	C40H52O4	596.38656	619.37633	635.35027	595.37873
Violaxanthin	C40H56O4	600.41786	623.40763	639.38157	599.41003
Rutin (Quercétine rutinoside) ^[2]	C27H30O16	610.15338	633.14315	649.11709	609.14555
Hydroperoxicadiforin ^[2]	C50H74O6	770.54854	793.53831	809.51225	769.54071
Procyanidin C	C45H38O18	866.20581	889.19558	905.16952	865.19798
Phaeophytin a	C55H74N4O5	870.56592	893.55569	909.52963	869.55809
Phaeophytin b	C55H72N4O5	884.54519	907.53496	923.5089	883.53736

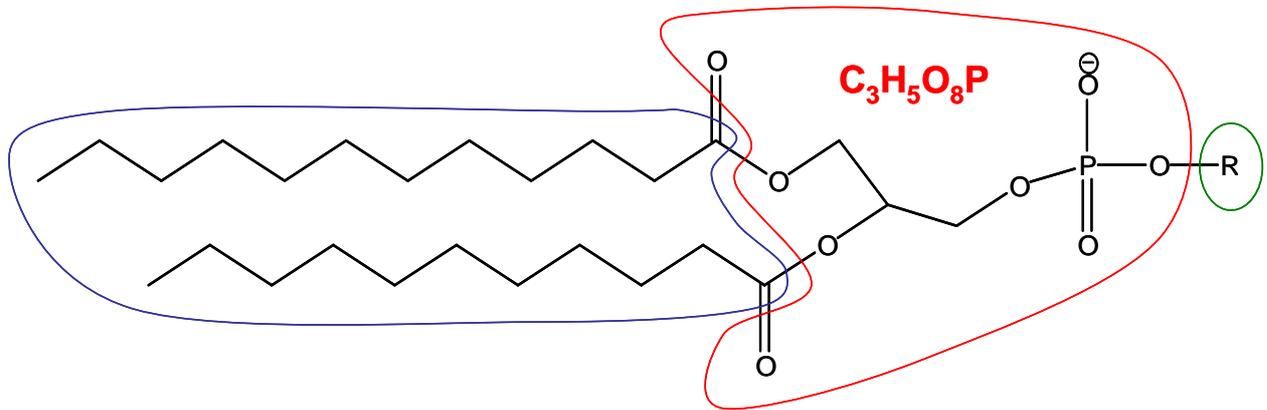
Annexes

Chlorophylle a	C55H72MgN4O5	892.53531	915.52508	931.49902	891.52748
Chlorophylle b	C55H70MgN4O6	906.51458	929.50435	945.47829	905.50675

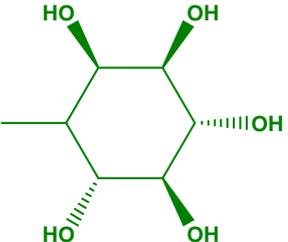
- [1] Couladis M, Baziou P, Petrakis PV, Harvala C, Essential oil composition of *Hypericum perforatum* L. growing in different locations in Greece, *Flavour and Fragrance Journal*, **2001**; 16: 204.
- [2] Patocka J, The chemistry, pharmacology, and toxicology of the biologically active constituents of the herb *Hypericum perforatum* L., *Journal of Applied Biomedicine*, **2003**; 1: 61.
- [3] Jurgeniemi G, Nahrstedt A, Phenolic compounds from *Hypericum perforatum*., *Planta Medica*, **2002**; 68: 88.
- [4] Tatsis EC, Boeren S, Exarchou V, Troganis AN, Vervoort J, Gerothanassis IP, Identification of the major constituents of *Hypericum perforatum* by LC/SPE/NMR and/or LC/MS, *Phytochemistry*, **2007**; 68: 383.
- [5] Kitanov GM, Nedialkov PT, Mangiferin and isomangiferin in some *Hypericum* species, *Biochemical systematics and ecology*, **1998**; 26: 647.
- [6] Mulinacci N, Giaccherini C, Santamaria AR, Caniato R, Ferrari F, Valletta A, Vincieri FF, Pasqua G, Anthocyanins and xanthenes in the calli and regenerated shoots of *Hypericum perforatum* var. *angustifolium* (sin. Fröhlich) Borkh., *Plant Physiology and Biochemistry*, **2008**; 46: 414.
- [7] Charchoglyan A, Abrahamyan A, Fujii I, Boubakir Z, Gulder TAM, Kutchan TM, Vardapetyan H, Bringmann G, Ebizuka Y, Beerhues L, Differential accumulation of hyperforin and secohyperforin in *Hypericum perforatum* tissue cultures, *Phytochemistry*, **2007**; 68: 2670.
- [8] Benkiki N, Kabouche Z, Tillequin F, P. V, Chosson E, Seguin E, A new polyisoprenylated phloroglucinol derivative from *Hypericum perforatum* (Clusiaceae), *Zeitschrift für Naturforschung. C. A journal of biosciences*, **2003**; 58: 655.
- [9] Verotta L, Appendino G, Jakupovic J, Bombardelli E, Hyperforin analogues from St John's Wort (*Hypericum Perforatum*), *J. Nat. Prod.*, **2000**; 63: 412.

Annexe 4 : Nomenclature des phospholipides

Formule générale :



Nature du groupement R :

R	Type de phospholipide
-H	Acide phosphatidique (PA)
$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—NH}_3^+$	Phosphatidyléthanolamine (PE)
$\text{—CH}_2\text{—CH}_2\text{—N}^+(\text{CH}_3)_3$	Phosphatidylcholine (PC)
$\text{—CH}_2\text{—CH}(\text{COOH})(\text{NH}_2)$	Phosphatidylsérine (PS)
$\text{—CH}_2\text{—CH}(\text{OH})(\text{CH}_2\text{OH})$	Phosphatidylglycérol (PG)
	Phosphatidylinositol (PI)

Annexes

Nomenclature des chaînes hydrocarbonées :

Au cours de ce travail nous avons pour chaque phospholipide identifié fait mention du nombre total d'atomes de carbone porté par les deux chaînes hydrocarbonées ainsi que du nombre d'insaturations présentes sur les chaînes ; ainsi, PC(36,2) correspond à une phosphatidylcholine comportant au total 36 atomes de carbone et deux insaturations sur les chaînes latérales. Sa formule brute sous forme protonée par exemple est alors : $C_{44}H_{85}O_8PN^+$ ($C_{36}H_{66}+C_3H_6O_8P+C_5H_{13}N^+$) et sa masse monoisotopique 786,60073 Da.

Longueur des chaînes aliphatiques :

D'une façon générale chacune des chaînes latérales contient un nombre pair d'atomes de carbone, typiquement compris entre 16 et 22, ce qui induit un nombre total de carbones sur les chaînes aliphatiques compris entre 32 et 44.

Annexes

Masses monoisotopiques des ions phospholipidiques négatifs :

Carbones	Insaturations	PA	PS	PG	PI
32	0	647.4657	734.4978	721.5025	809.5186
32	1	645.4501	732.4821	719.4869	807.5029
32	2	643.4344	730.4665	717.4712	805.4873
32	3	641.4188	728.4508	715.4556	803.4716
32	4	639.4031	726.4352	713.4399	801.4560
32	5	637.3875	724.4195	711.4243	799.4403
32	6	635.3718	722.4039	709.4086	797.4247
34	0	675.4970	762.5291	749.5338	837.5499
34	1	673.4814	760.5134	747.5182	835.5342
34	2	671.4657	758.4978	745.5025	833.5186
34	3	669.4501	756.4821	743.4869	831.5029
34	4	667.4344	754.4665	741.4712	829.4873
34	5	665.4188	752.4508	739.4556	827.4716
34	6	663.4031	750.4352	737.4399	825.4560
36	0	703.5283	790.5604	777.5651	865.5812
36	1	701.5127	788.5447	775.5495	863.5655
36	2	699.4970	786.5291	773.5338	861.5499
36	3	697.4814	784.5134	771.5182	859.5342
36	4	695.4657	782.4978	769.5025	857.5186
36	5	693.4501	780.4821	767.4869	855.5029
36	6	691.4344	778.4665	765.4712	853.4873
38	0	731.5596	818.5917	805.5964	893.6125
38	1	729.5440	816.5760	803.5808	891.5968
38	2	727.5283	814.5604	801.5651	889.5812
38	3	725.5127	812.5447	799.5495	887.5655
38	4	723.4970	810.5291	797.5338	885.5499
38	5	721.4814	808.5134	795.5182	883.5342
38	6	719.4657	806.4978	793.5025	881.5186
40	0	759.5909	846.6230	833.6277	921.6438
40	1	757.5753	844.6073	831.6121	919.6281
40	2	755.5596	842.5917	829.5964	917.6125
40	3	753.5440	840.5760	827.5808	915.5968
40	4	751.5283	838.5604	825.5651	913.5812
40	5	749.5127	836.5447	823.5495	911.5655
40	6	747.4970	834.5291	821.5338	909.5499
42	0	787.6222	874.6543	861.6590	949.6751
42	1	785.6066	872.6386	859.6434	947.6594
42	2	783.5909	870.6230	857.6277	945.6438
42	3	781.5753	868.6073	855.6121	943.6281
42	4	779.5596	866.5917	853.5964	941.6125
42	5	777.5440	864.5760	851.5808	939.5968
42	6	775.5283	862.5604	849.5651	937.5812
44	0	815.6535	902.6856	889.6903	977.7064
44	1	813.6379	900.6699	887.6747	975.6907
44	2	811.6222	898.6543	885.6590	973.6751
44	3	809.6066	896.6386	883.6434	971.6594
44	4	807.5909	894.6230	881.6277	969.6438
44	5	805.5753	892.6073	879.6121	967.6281
44	6	803.5596	890.5917	877.5964	965.6125

Annexes

Masses monoisotopiques des ions phospholipidiques positifs :

Carbones	Insaturations	[M+H] ⁺		[M+Na] ⁺		[M+K] ⁺	
		PE	PC	PE	PC	PE	PC
32	0	692.5225	734.5694	714.5050	756.5519	730.4784	772.5253
32	1	690.5068	732.5538	712.4893	754.5363	728.4627	770.5097
32	2	688.4912	730.5381	710.4737	752.5206	726.4471	768.4940
32	3	686.4755	728.5225	708.4580	750.5050	724.4314	766.4784
32	4	684.4599	726.5068	706.4424	748.4893	722.4158	764.4627
32	5	682.4442	724.4912	704.4267	746.4737	720.4001	762.4471
32	6	680.4286	722.4755	702.4111	744.4580	718.3845	760.4314
34	0	720.5538	762.6007	742.5363	784.5832	758.5097	800.5566
34	1	718.5381	760.5851	740.5206	782.5676	756.4940	798.5410
34	2	716.5225	758.5694	738.5050	780.5519	754.4784	796.5253
34	3	714.5068	756.5538	736.4893	778.5363	752.4627	794.5097
34	4	712.4912	754.5381	734.4737	776.5206	750.4471	792.4940
34	5	710.4755	752.5225	732.4580	774.5050	748.4314	790.4784
34	6	708.4599	750.5068	730.4424	772.4893	746.4158	788.4627
36	0	748.5851	790.6320	770.5676	812.6145	786.5410	828.5879
36	1	746.5694	788.6164	768.5519	810.5989	784.5253	826.5723
36	2	744.5538	786.6007	766.5363	808.5832	782.5097	824.5566
36	3	742.5381	784.5851	764.5206	806.5676	780.4940	822.5410
36	4	740.5225	782.5694	762.5050	804.5519	778.4784	820.5253
36	5	738.5068	780.5538	760.4893	802.5363	776.4627	818.5097
36	6	736.4912	778.5381	758.4737	800.5206	774.4471	816.4940
38	0	776.6164	818.6633	798.5989	840.6458	814.5723	856.6192
38	1	774.6007	816.6477	796.5832	838.6302	812.5566	854.6036
38	2	772.5851	814.6320	794.5676	836.6145	810.5410	852.5879
38	3	770.5694	812.6164	792.5519	834.5989	808.5253	850.5723
38	4	768.5538	810.6007	790.5363	832.5832	806.5097	848.5566
38	5	766.5381	808.5851	788.5206	830.5676	804.4940	846.5410
38	6	764.5225	806.5694	786.5050	828.5519	802.4784	844.5253
40	0	804.6477	846.6946	826.6302	868.6771	842.6036	884.6505
40	1	802.6320	844.6790	824.6145	866.6615	840.5879	882.6349
40	2	800.6164	842.6633	822.5989	864.6458	838.5723	880.6192
40	3	798.6007	840.6477	820.5832	862.6302	836.5566	878.6036
40	4	796.5851	838.6320	818.5676	860.6145	834.5410	876.5879
40	5	794.5694	836.6164	816.5519	858.5989	832.5253	874.5723
40	6	792.5538	834.6007	814.5363	856.5832	830.5097	872.5566
42	0	832.6790	874.7259	854.6615	896.7084	870.6349	912.6818
42	1	830.6633	872.7103	852.6458	894.6928	868.6192	910.6662
42	2	828.6477	870.6946	850.6302	892.6771	866.6036	908.6505
42	3	826.6320	868.6790	848.6145	890.6615	864.5879	906.6349
42	4	824.6164	866.6633	846.5989	888.6458	862.5723	904.6192
42	5	822.6007	864.6477	844.5832	886.6302	860.5566	902.6036
42	6	820.5851	862.6320	842.5676	884.6145	858.5410	900.5879
44	0	860.7103	902.7572	882.6928	924.7397	898.6662	940.7131
44	1	858.6946	900.7416	880.6771	922.7241	896.6505	938.6975
44	2	856.6790	898.7259	878.6615	920.7084	894.6349	936.6818
44	3	854.6633	896.7103	876.6458	918.6928	892.6192	934.6662
44	4	852.6477	894.6946	874.6302	916.6771	890.6036	932.6505
44	5	850.6320	892.6790	872.6145	914.6615	888.5879	930.6349
44	6	848.6164	890.6633	870.5989	912.6458	886.5723	928.6192

Study of active naphthodianthrone St John's Wort compounds by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance and multi-stage mass spectrometry in sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociation and infrared multiphoton dissociation modes

Audrey Hecka, Benoît Maunit, Frédéric Aubriet and Jean-François Muller*

Laboratoire de Spectrométrie de Masse et Chimie Laser, Université Paul Verlaine – Metz, 1 boulevard Arago, 57078 Metz Cedex 3, France

Received 31 October 2008; Revised 18 December 2008; Accepted 15 January 2009

Five well-known active naphthodianthrone constituents of *Hypericum perforatum* (St John's Wort) extracts have been investigated by electrospray ionization Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI-FTICRMS) and ESI-FTICRMSⁿ. The studied compounds were hypericin, pseudohypericin, protohypericin, protopseudohypericin (biosynthetic precursors of the two former compounds, respectively) and isopseudohypericin (alkaline degradation product of pseudohypericin). Dissociation mass spectrometry measurements performed on the [M–H][–] ion presented a variable efficiency as a function of the used activation mode. Sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociation (SORI–CID) only led to a restricted number of fragment ions. In contrast, IRMPD ensured the detection of numerous product ions. Ions detected in ESI-FTICRMS and ESI-FTICRMSⁿ experiments were measured with a very high mass accuracy (typically mass error is lower than 0.5 mDa at *m/z* close to 500) that allowed unambiguous formulae to be assigned to each signal observed in a mass spectrum. In spite of similar structures, specific fragmentation patterns were observed for the different compounds investigated. This study may be useful in the future to characterize in natural extracts these compounds (or derivatives of these compounds) by liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) experiments by considering the MS/MS transitions highlighted in this paper. Copyright © 2009 John Wiley & Sons, Ltd.

Extracts of St John's Wort (*Hypericum perforatum*) have been widely used for the treatment of mild to moderate depression.¹ Among the compounds identified from *Hypericum perforatum* preparations (see Fig. 1), the naphthodianthrone hypericin (compound **1**) has received considerable interest. Indeed, it was first thought to be responsible for the activity of the *Hypericum perforatum* extract. Nowadays, hypericin is only considered as weakly involved in the antidepressant mechanism of this herb.² The main active principle is now thought to be hyperforin. Due to the lack of stability of this anxiolytic agent, hypericin still remains the reference compound for the quality assessment of *Hypericum perforatum* preparations. In addition, it has an important taxonomic value for the classification of *Hypericum* species. Moreover, this compound has also been extensively studied for its photodynamic properties.³ It has been demonstrated

that it is active for photodynamic therapy (PDT) of malignant diseases. Greater PDT activity was demonstrated with hypericin derivatives produced by modification of the hypericin backbone through classical organic chemistry methods.⁴ Pseudohypericin (compound **3**, Fig. 1) is a close analog of hypericin (**1**). It is found in larger amounts than hypericin in *Hypericum perforatum* extracts.⁵ This compound is less stable than hypericin⁶ when it is exposed to light, oxygen, heat or alkalization. It is also known to be less active than hypericin in physiological medium. Its lack of stability may help to explain this behavior.⁷ It has been recently demonstrated that *Hypericum perforatum* extracts, containing hypericin and pseudohypericin, may be used as photodynamic agents.⁸ The degradation of pseudohypericin in alkaline medium is known to be irreversible and leads to isopseudohypericin (compound **5**, Fig. 1), which results from the extent of the conjugation of pseudohypericin (**3**) by formation of an additional six-membered ring.⁹ Note that alkaline degradation of hypericin is reversible. Isopseudohypericin (**5**) and pseudohypericin (**3**) have the same

*Correspondence to: J.-F. Muller, Laboratoire de Spectrométrie de Masse et Chimie Laser, Université Paul Verlaine – Metz, 1 boulevard Arago, 57078 Metz Cedex 3, France.
E-mails: jfmuller@univ-metz.fr; jf.muller66@orange.fr

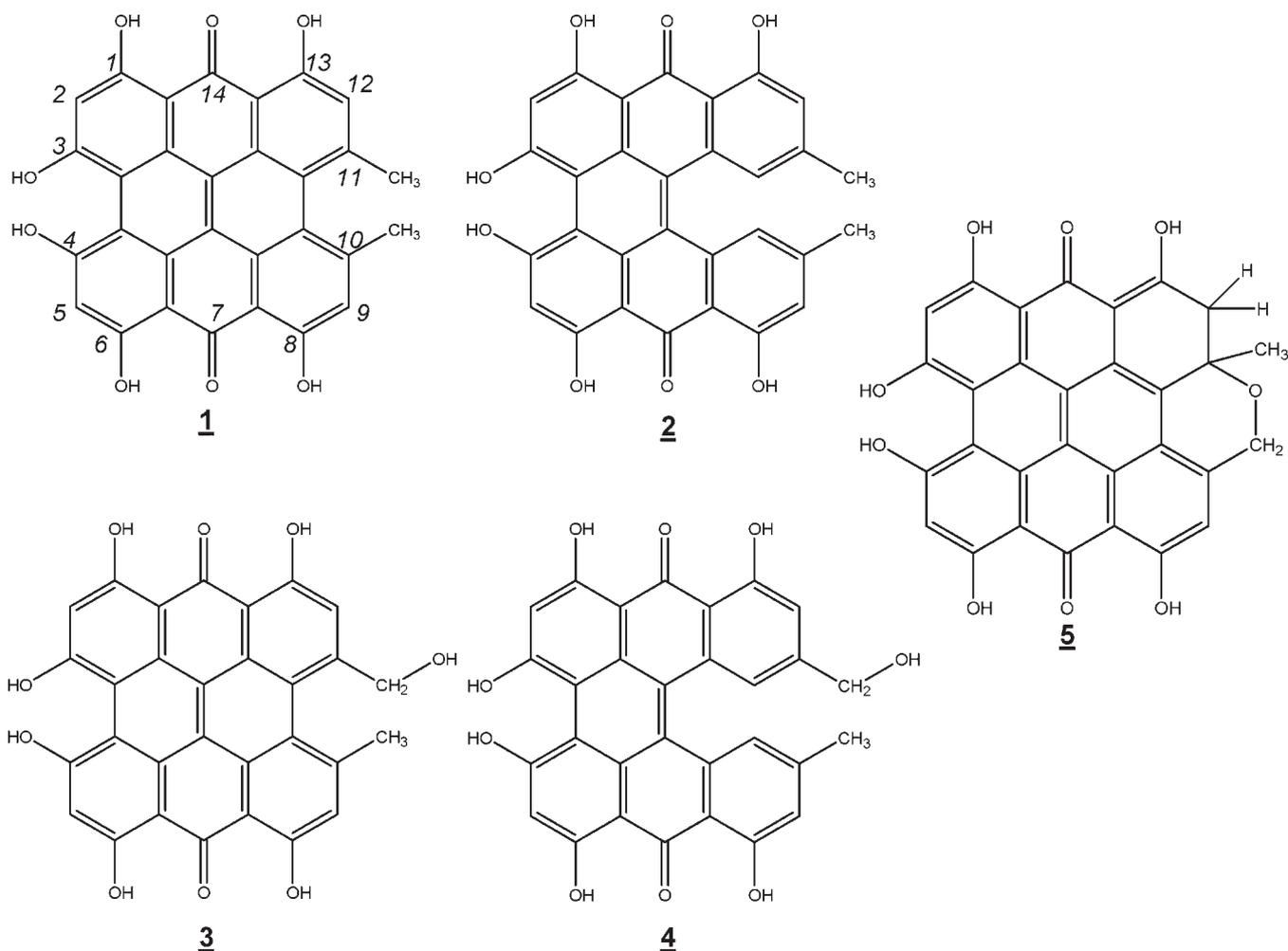


Figure 1. Structures of hypericin (**1**), protohypericin (**2**), pseudohypericin (**3**), protopseudohypericin (**4**) and isopseudohypericin (**5**).

molecular mass, which complicates the analysis of *Hypericum perforatum* extracts by simple mass spectrometry techniques; tandem mass spectrometry (MS/MS) is consequently required.

Protohypericin (compound **2**, Fig. 1) and protopseudohypericin (compound **4**, Fig. 1) are the biosynthetic precursors of hypericin and pseudohypericin. Their conversion into hypericin (**1**) and pseudohypericin (**3**), respectively, is light-dependent. Consequently, their amount in extracts is dependent on the extraction process as well as the origin and the maturity of the herb used for the extraction procedure.¹⁰ The precise mass spectrometric characterization of protohypericin (**2**) and protopseudohypericin (**4**), associated to the biosynthetic pathways¹¹ of hypericin and pseudohypericin, respectively, may be useful to highlight additional elements in the field of biosynthetic precursors of other naphthodianthrone constituents of *Hypericum perforatum* extracts.

Some papers have been published in the field of hypericin, pseudohypericin, protohypericin and protopseudohypericin characterization by mass spectrometry. Nevertheless, isopseudohypericin has never been analyzed by this technique.¹² Hypericin and its analogs cannot be efficiently analyzed by classical electron impact ionization due to the high temperatures required for their vaporization and their

thermolability. Hypericin, pseudohypericin, protohypericin and protopseudohypericin were successfully characterized by liquid chromatography/electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry and with collision-induced dissociation MS/MS experiments. The main fragmentation pathways have been found to be associated with neutral losses of CH_4 , CH_3OH , H_2O , $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$, CO_2 and CO . Nevertheless, the mass resolution obtained (typically in the unit mass range) was not sufficient to give unambiguous assignments of some of the detected fragment ions.¹² More recently, liquid chromatography/high-resolution mass spectrometry (LC/HRMS) was used to confirm the structure of the compounds produced by an endophytic fungus isolated from *Hypericum perforatum* stem samples and cultured in rich mycological medium.¹³ HRMS experiments were conducted with a LTQ-orbitrap mass spectrometer, which allowed mass resolution around 60 000 and mass measurement accuracy close to 2 ppm to be achieved. The MS/MS behavior of hypericin and emodin was compared with standard compounds. It should be noted that no study of the observed fragmentation pathways was reported in that paper. Consequently, one of the objectives of this paper is to definitely identify the fragmentation pathways of the five naphthodianthrone (compounds **1** to **5**) and to compare our results with those published previously.¹²

The detailed analysis of hypericin, pseudohypericin, protohypericin, protopseudohypericin, and isopseudohypericin by Fourier transform ion cyclotron resonance (ESI-FTICRMS) and multi-stage mass spectrometry (ESI-FTICRMSⁿ) will be reported in this paper. The high mass resolution and the high accuracy of mass measurement will be used to clearly identify product ions, which will be useful to propose fragmentation mechanisms for all of the five compounds. These new data will be helpful for future analysis (structural elucidation and monitoring) of these compounds and associated ones in other natural extracts or complex matrices such as cellular medium. Even if hypericin has only been found in *Hypericum* species, other compounds with structural similarities have been highlighted in other organisms.^{14,15}

EXPERIMENTAL

Chemicals

Hypericin **1** (99.5% HPLC) and pseudohypericin **3** (99.5% HPLC) were obtained from Planta Natural Products (Vienna, Austria). Protohypericin **2** (90% HPLC) was a kind gift from Professor Heinz Falk (University of Linz, Austria). *Hypericum perforatum* flowers were cultured by Dr. Anne Poutaraud (INRA, Colmar, France). Protopseudohypericin (**4**)-enriched extracts were obtained by methanolic infusion of flowers which had been protected from light since bud stage. Pseudohypericin was transformed into isopseudohypericin (**5**) through action of ammonia 37% until the solution, initially purple, turned green. Methanol (HPLC grade, VWR international, West Chester, PA, USA) was used as solvent after three distillation steps.

Mass spectrometry

ESI-FTICRMS and ESI-FTICRMSⁿ measurements were conducted on an Explorer HiRes FTICR mass spectrometer (Varian Corporation, Palo Alto, CA, USA) fitted with a 9.4 T shielded superconducting magnet and a Micromass Z-spray electrospray ionization (ESI) source.

The ESI source was operated in negative mode using the following parameters: needle potential, -4 kV; source temperature, 85°C; probe temperature, 100°C; nitrogen flow, 0.3 [arbitrary units]. The sampling and extractor cone voltages were set to -30 V and -10 V, respectively. Samples were dissolved in methanol and infused at a flow rate of 2 µL/min. Solutions of 5 µM were used for hypericin, protohypericin, pseudohypericin and isopseudohypericin. For protopseudohypericin, *Hypericum perforatum* extract containing a hypericin concentration of 10 µM was infused (concentration calculated from λ_{590} of the solution after 10 min of exposure to white light, assuming $\epsilon_{590} = 45,000 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ for hypericin and pseudohypericin). Deprotonation of naphthodianthrone compounds was found to be sufficient enough to yield [M-H]⁻ ions with a very good signal-to-noise (S/N) ratio without alkalization of the sample. Consequently, except for isopseudohypericin, no ammonia was added to avoid unwanted degradation of the studied compounds prior to MS analysis.

Ions were accumulated for 1000 ms in the Q3 storage hexapole, prior to injection into the FTICR cell by means of an ion guide transfer line. In the FTICR cell, ions were trapped with a -0.5 V potential. The average mass measurement accuracy was typically lower than 1 ppm, and the FWHM mass resolution close to 40 000 at m/z 500. After calibration, identification of the ions was achieved by exact mass measurement and comparison with theoretical masses and isotopic patterns calculated by the 'Omega Elemental Composition' software (Varian-IonSpec Corporation, Palo Alto, CA, USA). For product ions, maximum atom constraints for C, H and O were set to the respective number of atoms in the precursor ion (for [M-H]⁻ ions, hypericin: C₃₀H₁₅O₈, pseudohypericin: C₃₀H₁₅O₉, protohypericin: C₃₀H₁₇O₈, protopseudohypericin: C₃₀H₁₇O₉, isopseudohypericin: C₃₀H₁₅O₉).

MS/MS experiments were conducted in both sustained off-resonance irradiation collision-induced dissociation (SORI-CID) and infrared multiphoton dissociation (IRMPD) modes. Tandem mass spectrometry (MS/MS) measurements were accomplished by first isolation of the precursor ion using a stored waveform inverse Fourier transform (SWIFT) sequence,¹⁶ which ejected all species except those with the desired mass. All fragmentation experiments were performed after monoisotopic precursor ion isolation. Ion kinetic energy was then increased using SORI-CID,¹⁷ resulting in collisions with nitrogen, that was introduced into the FTICR mass spectrometer via a pulsed valve opened for 20 ms during the SORI event. The SORI frequency offset (1.5% of the precursor ion cyclotron frequency) was applied for 250 ms. IRMPD experiments were conducted with a 75 W CO₂ laser ($\lambda = 10.6 \mu\text{m}$). Irradiation time was typically 6 s with a 100% laser power. These conditions are required because of the highly stable structures of hypericin and hypericin-like molecules.

RESULTS AND DISCUSSION

ESI-FTICRMS experiments of naphthodianthrone compounds

First of all, hypericin, pseudohypericin, protohypericin, protopseudohypericin and isopseudohypericin were analyzed by ESI-FTICRMS in negative detection mode. At low *in-source* activation energy (sampling cone voltage: -30 V, extraction cone voltage: -10 V), the [M-H]⁻ deprotonated molecular ion was systematically observed at m/z 503.0776, 505.0925, 519.0726, 519.0728 and 521.0874 for hypericin, protohypericin, pseudohypericin, isopseudohypericin and protopseudohypericin, respectively. The S/N ratio was generally good at the used concentration (5.10⁻⁶ µM) and the limit of detection was estimated to be below 10 nM under the analytical conditions used. Fragmentation of these ions by *in-source* activation at the used cone voltage was found to be limited.

The used cultivation process allows significant amounts of protopseudohypericin to be obtained. Consequently, the MS analysis of such samples (methanolic extract) leads to the detection of an intense signal associated with the deprotonated ion of protopseudohypericin, as reported in Fig. 2. Under these conditions, protopseudohypericin, whose synthesis -to our knowledge- has not been reported in the

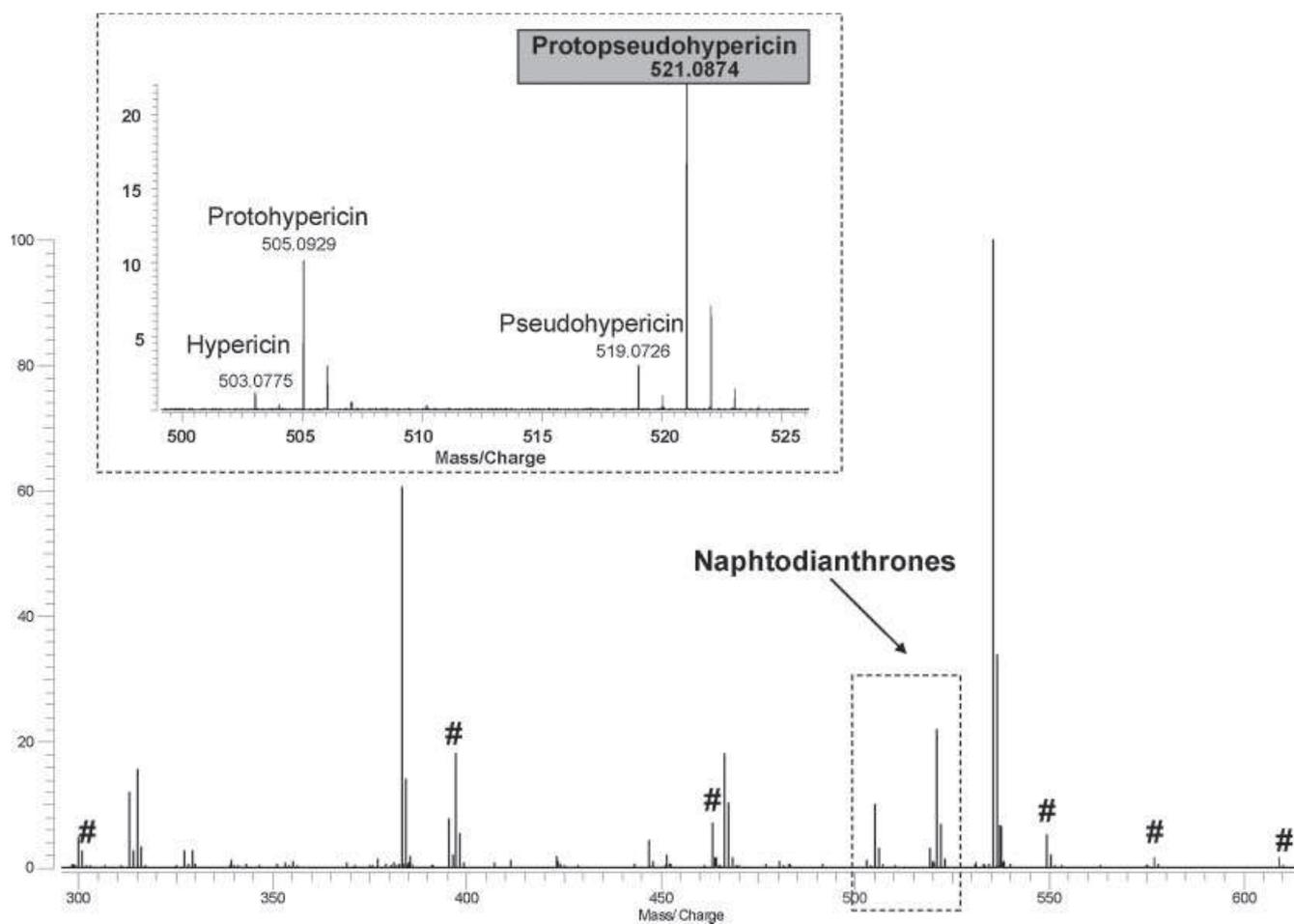


Figure 2. Analysis of St John's Wort extract for which the cultivation process favors larger amounts of the protopseudohypericin compound (see text for details). # Ions were used for internal calibration, they are relevant for known compounds present in St John's Wort extract. Detected ions are associated with $[M-H]^-$ deprotonated molecular species.

literature, was in this study investigated by both MS and MSⁿ approaches (see following sections). The mass spectrum reported in Fig. 2 has been internally calibrated by using five well-known secondary metabolites of *Hypericum perforatum*, rutin (m/z 609.1461), adhyperforin (m/z 549.3949), procyanidin B (m/z 577.1352), hyperosid (m/z 463.0882) and quercetin (m/z 301.0354), and one internal fragment (m/z 397.2384) of the phloroglucinol hyperforin.

The five investigated compounds only differ by the substituents at positions 10 and 11 (see Fig. 1) which explained their similar behavior in negative ESI-FTICRMS measurements. The detection of a very intense signal associated with deprotonated ions was reasonably explained by the ability of such molecules to be easily deprotonated by loss of the *bay* protons (positions 3 and 4), which are known to be very labile for such molecules. The conjugation of the system allows this charge to move from its initial location to another oxygen atom. As a consequence in further sections, which deal with MSⁿ experiments, proposed fragmentation pathways will be systematically described by considering the most suitable charge location.

At higher cone voltage, *in-source* fragmentation occurred (Fig. 3(a)). Nevertheless, these processes were not very

efficient. For example, the fragmentation of the deprotonated molecular ion $[M-H]^-$ at a cone voltage of 120 V led to the detection of three fragment ions, which abundance was found to be lower than 10% of the abundance of the precursor ion. The fragment ions were associated with the elimination of CH_4 , $CH_2CO + CO$ and $CH_2CO + 2CO$ at m/z 487.0482, 433.0731 and 405.0776, respectively.

ESI-FTICRMSⁿ experiments of naphtodianthrone compounds

SORI-CID experiments

The MS/MS behavior of the five $[M-H]^-$ deprotonated molecular ions observed in the study of the five compounds investigated was first examined by SORI-CID. This activation mode was found to be largely inefficient to activate precursor ions even if important voltage amplitude was used for SORI. Low-abundance product ions were observed whatever the investigated compounds. As an example Fig. 3(b) presents SORI-CID fragmentation of the $[M-H]^-$ deprotonated molecular ion of hypericin, that only led to neutral losses of CH_4 , CH_2CO , CO_2 and $CO_2 + CO$ at m/z 487.04623, 461.06618, 459.08738 and 431.09245 respectively.

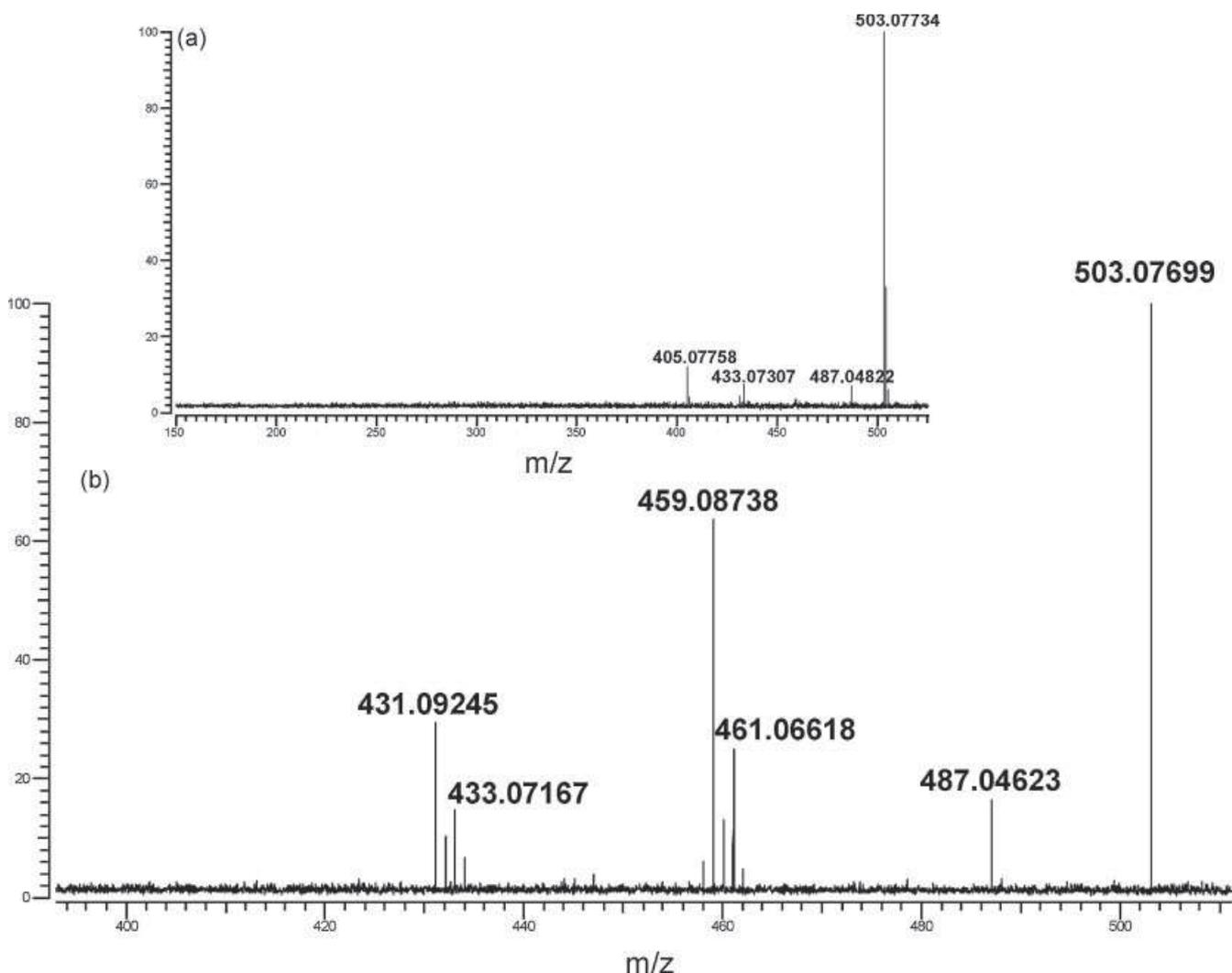


Figure 3. (a) Analysis of standard hypericin by ESI-FTICRMS at high *in-source* activation energy (sampling cone voltage: -130 V, extraction cone voltage: -10 V). (b) SORI-CID fragmentation of the $[M-H]^-$ deprotonated molecular ion of hypericin. See Experimental section for SORI-CID parameters; the V_{bp} amplitude of the SORI excitation was equal to 18.

IRMPD experiments

In contrast to the SORI-CID activation mode, IRMPD was found to yield a significant number of product ions, some of which were very abundant. Nevertheless, the used IRMPD parameters were very unusual if they were compared to classical IRMPD experiments performed on peptides for example. Indeed, high laser power (100%) and a long period of irradiation (up to 6 s) were required to dissociate the investigated $[M-H]^-$ precursor ion. According to the solid-phase infrared spectra of hypericin reported in Fig. 4, it appears evident that $10.6 \mu\text{m}$ (943 cm^{-1}) photons delivered by the continuous CO_2 laser were only poorly absorbed by naphthodianthrone compounds. Readers have to keep in mind that the IRMPD efficiency depends on the absorption of precursor ions in the gas phase, which may be estimated by the IR spectra of the compound associated with this precursor ion in the solid phase. The higher is the absorption of the precursor ions, the more efficient is the activation. Additionally, some of the fragment ions may be considered to be the result of consecutive fragmentation processes. In IRMPD experiments, both precursor and fragment ions are irradiated by the CO_2 laser. This may also explain the high number of fragment ions.

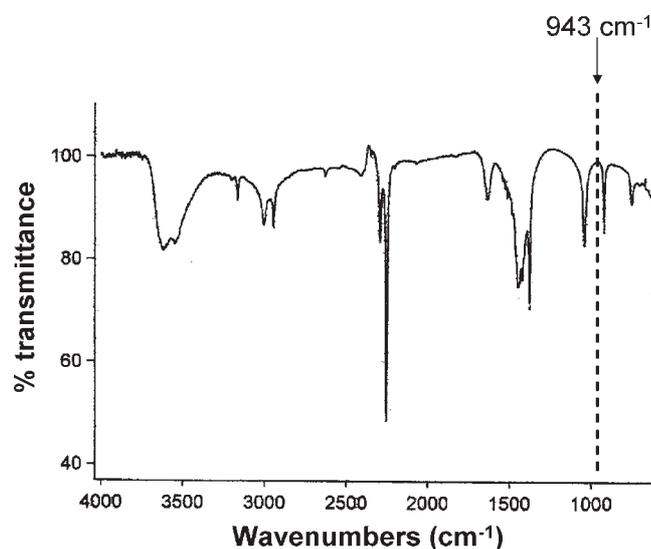


Figure 4. Solid infrared spectrum of hypericin.

More generally, the ion fragmentation pathways observed in hypericin and hypericin-associated compounds were found to be relevant to losses of CH_4 , CO_2 , CO , $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ and H_2O . In further sections, the fragmentation of each investigated compound will be detailed. The mass resolution obtained in these experiments and the mass measurement accuracy will allow unambiguous assignment of the product ions and consequently to correct some errors or at least to give additional information to previously published data, which suffered from a lack of mass resolution. The ability of the FTICRMS technique to perform successive tandem mass spectrometry experiments (MS^3 and MS^4) will be used to validate or uncorroborate some previous assignments associated with sequential losses of neutrals. In some cases IRMPD activation also led for these compounds to the release of radical species or to the formation of radical product ions. For the main fragmentation pathway, a mechanism will be proposed.

Hypericin IRMPD behavior

Hypericin was firstly investigated by MS^2 and MS^3 IRMPD. MS/MS of the $[\text{M}-\text{H}]^-$ ion is reported in Fig. 5. The activation of the precursor ion (**a**) induced the elimination of CH_4 , CO_2 , CO , $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ and H_2O neutrals. Consecutive neutral losses

also occurred and have been confirmed by MS^3 experiments. The very good mass measurement accuracy provided by FTICRMS (typically lower than 1 ppm) and MS^3 experiments allowed us to partially corroborate previous assignments, whereas identification of some fragments was reconsidered. In this way, dissociation of the $[\text{M}-\text{CH}_4-\text{H}]^-$ product ion indicated that m/z 443.0561 corresponded to $[\text{M}-\text{CH}_4-\text{CO}_2-\text{H}]^-$ rather than $[\text{M}-\text{CH}_2=\text{CO}-\text{H}_2\text{O}-\text{H}]^-$. Moreover, the product ion at m/z 419, previously assigned to $[\text{M}-2(\text{CH}_2=\text{CO})-\text{H}]^-$ (m/z 419.0561) in QqQ CID experiments was found to be associated with the elimination of three carbon monoxide moieties ($[\text{M}-3\text{CO}-\text{H}]^-$, m/z 419.0925) according to the measured m/z ratio, which was 419.0922.

The loss of the CH_4 neutral is thought to be favored by the high stability of the ejected neutral, as previously reported. The mechanism proposed in the literature¹² may involve the formation of a five-membered ring.

The elimination of CO_2 may be explained by three distinct mechanisms (see Fig. 6). All of them firstly required the opening of a six-membered ring to lead to the intermediate structure **f**. Indeed, no carbon in hypericin neighbors two oxygen atoms. Consequently, it is reasonable to consider that release of CO_2 is associated with a significant rearrangement, which allows an oxygen atom to be closer to a $\text{C}=\text{O}$ unit. The

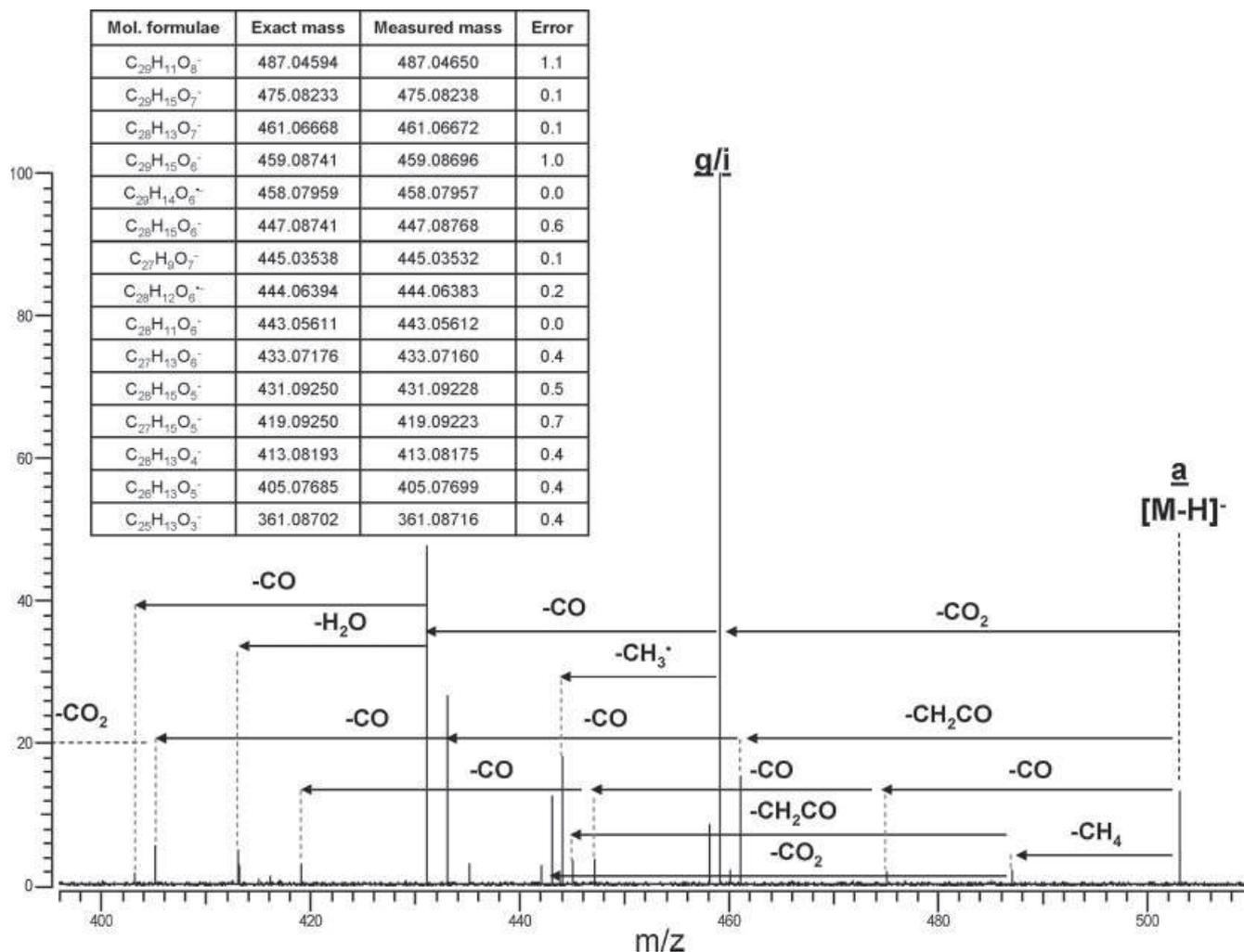


Figure 5. Fragmentation of ion **a** relative to the $[\text{M}-\text{H}]^-$ deprotonated molecular species of hypericin at m/z 503 in IRMPD mode. Activation for 6 s at 100% of the energy of the CO_2 laser. Errors are given in ppm.

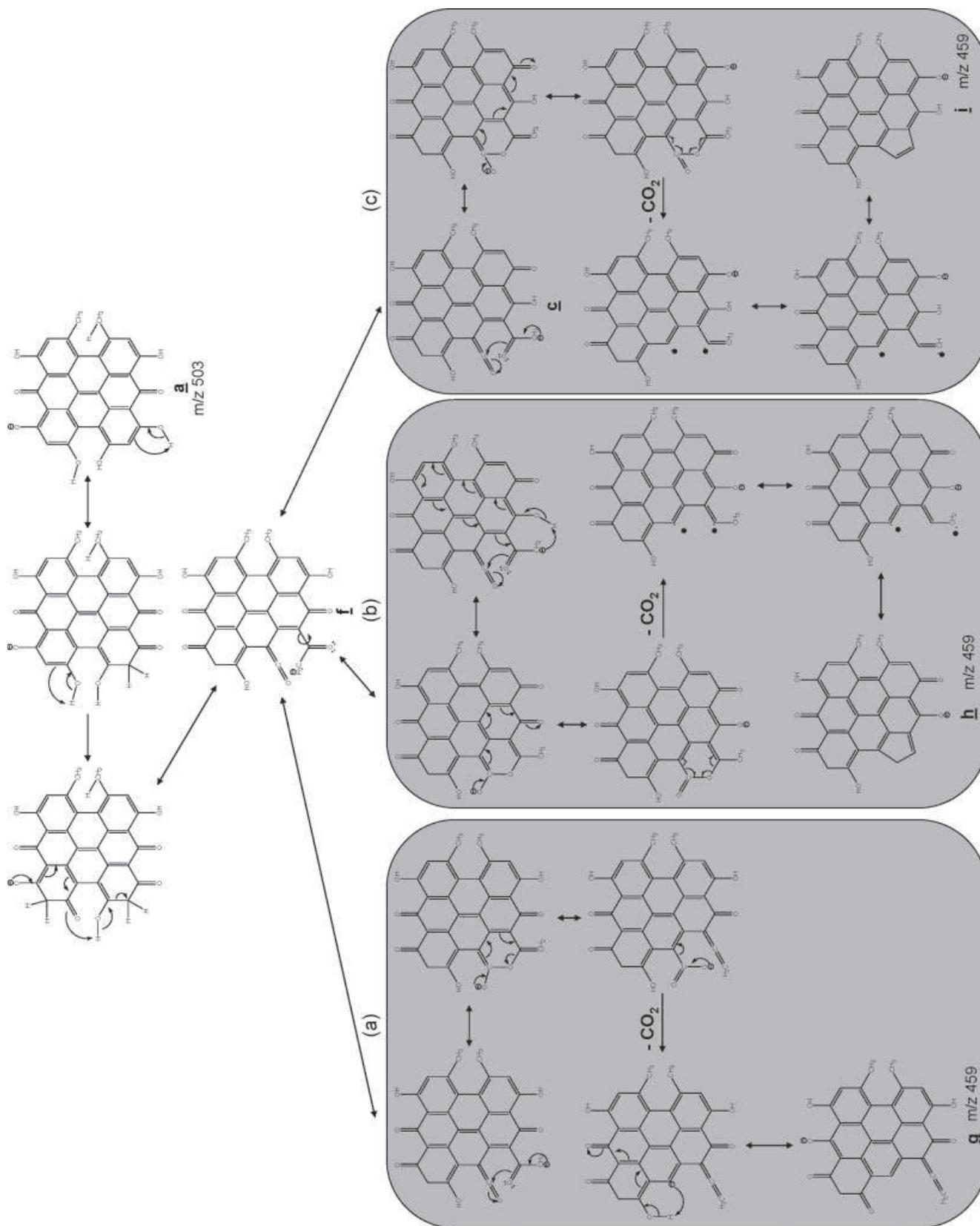


Figure 6. Proposed mechanisms for loss of CO₂ in the study of the pseudomolecular ion **a** of hypericin by IRMPD MS/MS.

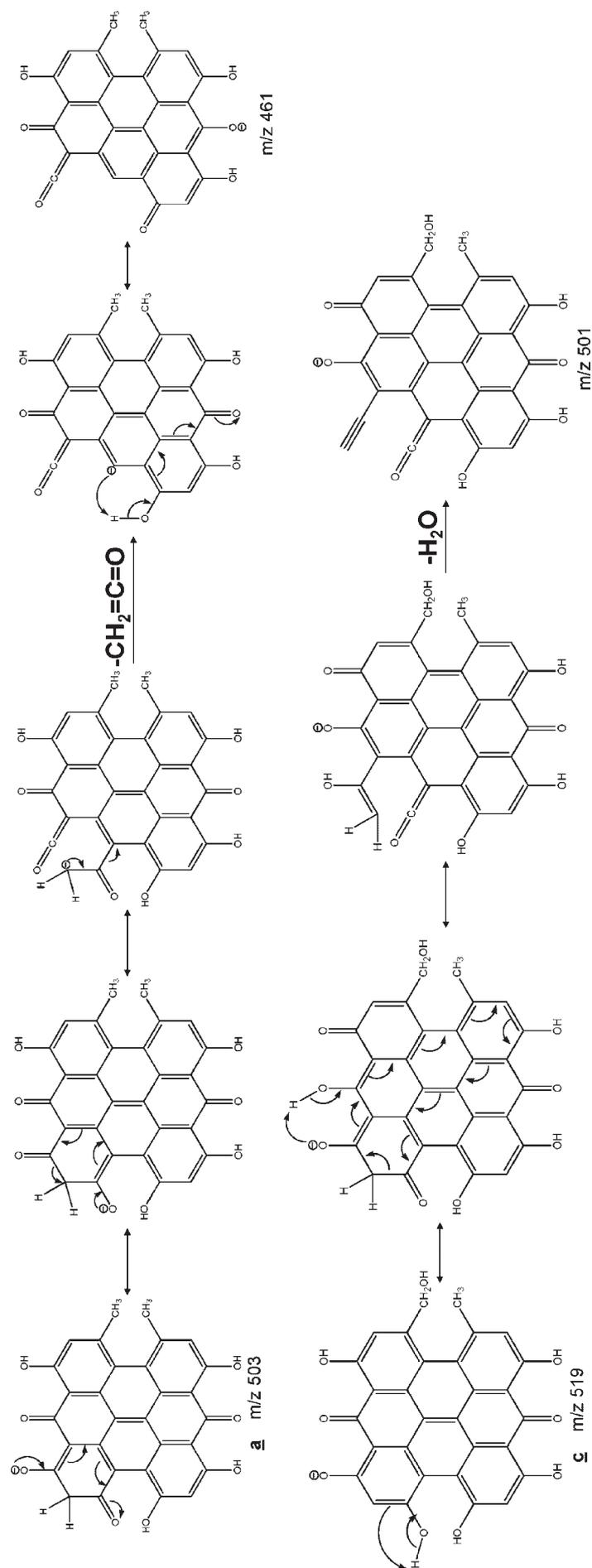


Figure 7. Proposed mechanisms for loss of $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ and loss of H_2O in the study of the **a** hypericin and **c** pseudohypericin pseudomolecular ions by IRMPD MS/MS, respectively.

opening of the six-membered ring is followed by a rearrangement. Different ways have to be considered. The first one (Fig. 6(a)) is adapted from a mechanism previously reported.¹⁸ It allows a CO₂ molecule to be eliminated by formation of an allenic group. The stabilization of the resulting product ion is favored by rearrangement, which results from the migration of a hydrogen atom from a neighboring phenolic group to the resulting carboanion and the migration of the negative charge to an oxygen atom to yield the ionic structure **g**. Figure 6(b) presents an alternative mechanism. Initial rearrangement is followed by migration of a hydrogen atom, which allows the formation of a new six-membered ring including two oxygen atoms directly linked to the same carbon. Two homolytic cleavages ensure the elimination of a CO₂ molecule. The resulting diradical stabilizes by formation of a more stable species by formation of a five-membered ring. Although the first part of the mechanism is concerted, the resulting product ion **h** has lost part of its aromaticity, and is consequently thought to be less stable than **g**. Figure 6(c)

presents an alternative to the second proposed mechanism, which results from the same kind of homolytic CO₂ cleavage but prevents the loss of aromaticity to yield the **i** ion. The high stability of both the allenic function and the five-membered rings formed led both mechanisms to be considered plausible.

Loss of ketene, i.e. CH₂=C=O-, can be rationalized by means of the well-known keto-enolic equilibrium of the phenolic group of hypericins. An increase in stability for the resulting product ion has to be considered as it was previously proposed in the first mechanism of CO₂ elimination to be due to the capture of a neighboring hydrogen atom by the formed carboanion. This rearrangement appears to be more suited for final structure stabilization than the formation of a tight four-membered ring (see top of Fig. 7).

A slightly different mechanism was also proposed to explain the elimination of water. Water loss from an enol group can occur after the opening of a six-membered ring (see bottom of Fig. 7). The resulting ring-opened structure is thought to be more suited to rationalize the H₂O moieties

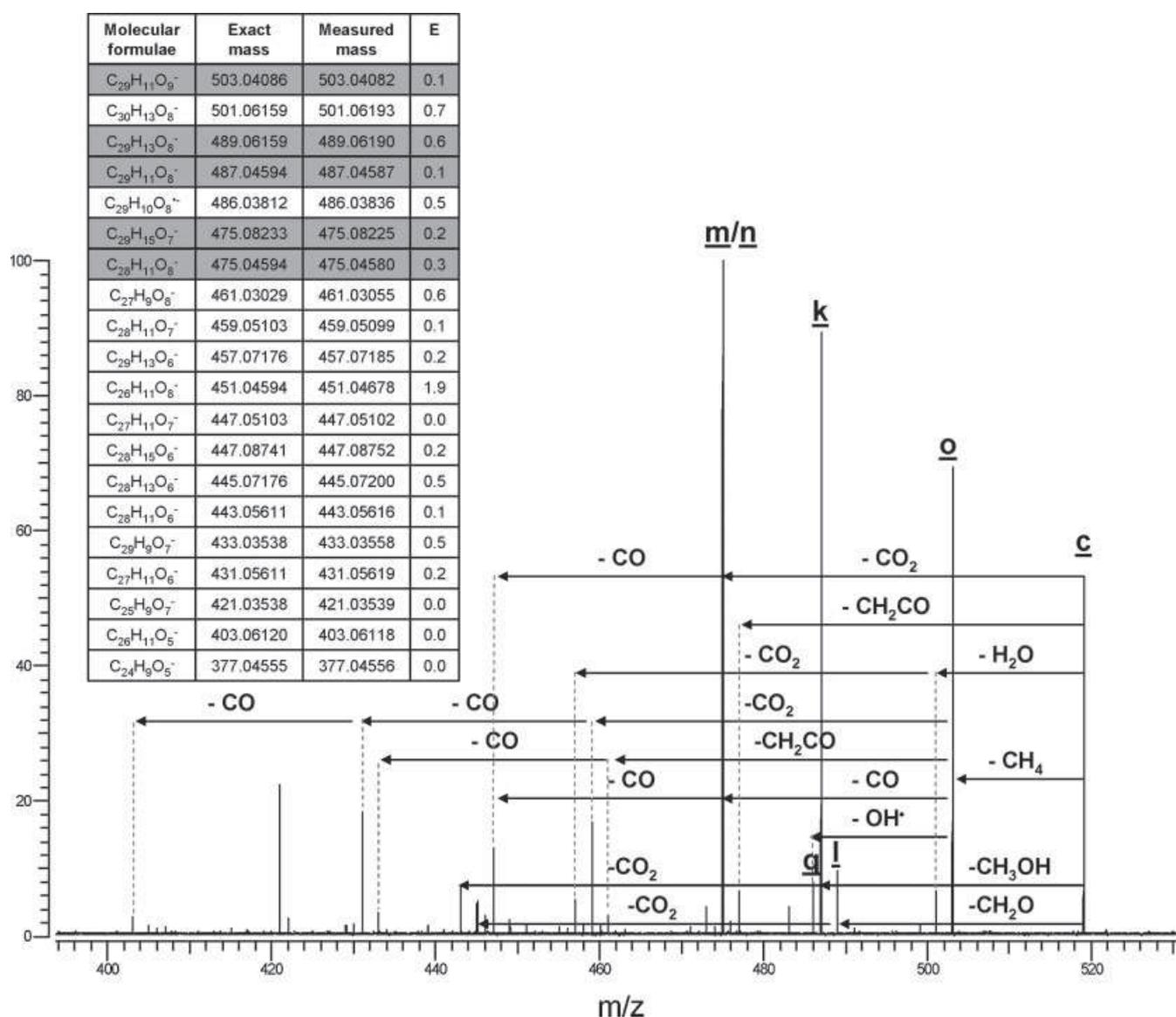


Figure 8. Fragmentation of the **c** ion relative to the [M-H]⁻ deprotonated molecular species of pseudohypericin at *m/z* 519 in IRMPD mode. Activation for 6 s at 100% of the energy of the CO₂ laser. Errors are given in ppm. Shaded lines correspond to major differences observed between pseudohypericin and hypericin.

than the mechanism associated with the formation of a benzyne-like structure previously proposed.¹²

Pseudohypericin and isopseudohypericin IRMPD behavior

This section is devoted to the examination of $[M-H]^-$ IRMPD experiments performed in the analysis of pseudohypericin and isopseudohypericin. First of all, our attention was focused on the influence of the $-CH_2OH$ vs. $-CH_3$ (for hypericin) substituent in position 11 in MS/MS experiments. This will allow a better understanding of the influence of this structural modification and confirm the fragmentation pathways proposed in a previous section. For a second time, comparison between pseudohypericin and its isomer – i.e. isopseudohypericin, the alkaline degradation product of pseudohypericin – will be given. This comparison will be useful to be able to distinguish both of them in future MS/MS studies dedicated to the analysis of crude plant extracts.

Figure 8 reports the IRMPD MS/MS spectrum of the deprotonated molecular ion $[M-H]^-$ of pseudohypericin (**c** ion). The very accurate mass measurement achieved allows the fragment ions to be unambiguously assigned and differences with the MS/MS behavior of hypericin to be highlighted. A specific focus on these differences will be discussed in this section. The first difference involves, for pseudohypericin, the specific elimination of CH_3OH and CH_2O to yield **k** and **l** ions, respectively. Consequently, both of these fragmentation pathways are associated with the presence of a $-CH_2OH$ instead of a $-CH_3$ substituent in position 11. Figure 9 reports the proposed mechanisms associated with these fragmentation channels.

A significant difference between the MS/MS behavior of hypericin and pseudohypericin, reported in Figs. 5 and 8, respectively, was the importance of the fragmentation channel associated with the release of CH_4 . Indeed, the examination of the intensity of $[M-CH_4-H]^-$ for each of the studied compounds appeared to be very different. The loss of CH_4 is highly favored for pseudohypericin; in contrast, $[M-CH_4-H]^-$ was only barely detected in the study of

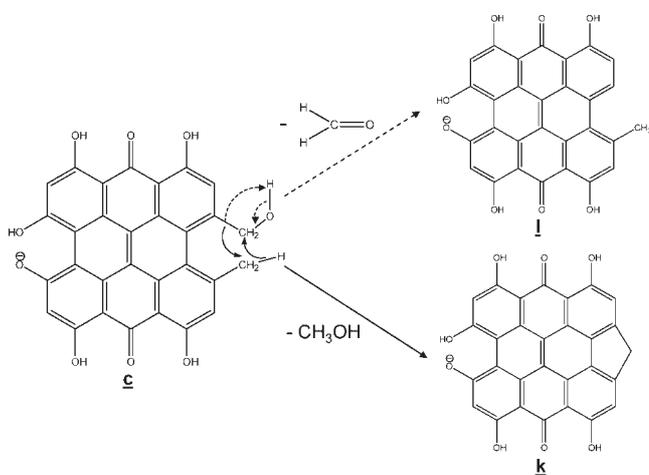


Figure 9. Proposed mechanisms for losses of CH_3OH and CH_2O in the study of the pseudomolecular ion **c** of pseudohypericin by IRMPD MS/MS.

hypericin. Moreover, the base peak observed after MS/MS of the deprotonated molecular $[M-H]^-$ precursor ion of pseudohypericin was associated with the $[M-CH_4-CO-H]^-$ product ion which was not detected in the study of hypericin. In that case, the major detected fragment ion was the **g/i** ion – i.e. $[M-CO_2-H]^-$ – corresponding to the release of carbon dioxide. To highlight this difference in behavior, high mass resolution and accurate mass measurement is required due to the fact that CO_2 (43.98983 Da) and $CH_4 + CO$ (44.02621) are isobaric. More specifically, Fig. 10 presents the magnification of MS/MS mass spectra in the m/z range associated with $[M-CH_4-CO-H]^-$ (**m**) and $[M-CO_2-H]^-$ (**n**) ions for hypericin and pseudohypericin. Additionally, it should also be noticed that CH_4 elimination appeared to be a favored fragmentation pathway of dissociation in the MS/MS study of the $[M-H]^-$ deprotonated molecular ion of isopseudohypericin reported in Fig. 11. Indeed, $[M-CH_4-H]^-$ was found to be the sole product ion, when activation parameters were used to investigate the MS/MS behavior of isopseudohypericin similar to those used in the MS/MS study of hypericin and pseudohypericin. An increase in the irradiation time was required to induce further fragmentation, as reported in Fig. 11. Consequently, the comparison of the MS/MS

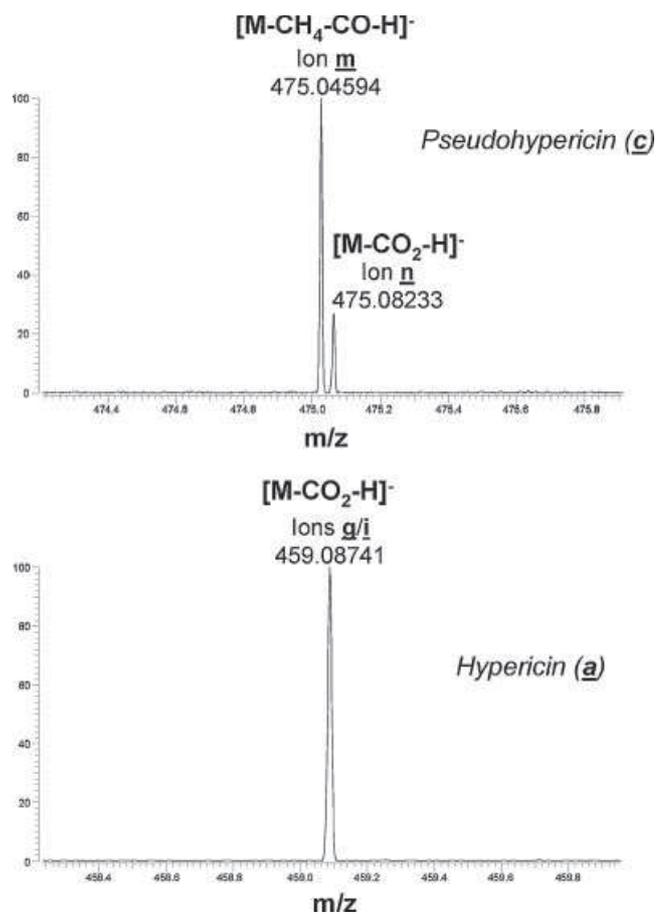


Figure 10. Fragmentation in IRMPD mode of $[M-H]^-$ deprotonated molecular ions relative to pseudohypericin (top) and hypericin (bottom) species in mass ranges associated to a 44 loss of mass release. Activation for 6 s at 100% of the energy of the CO_2 laser.

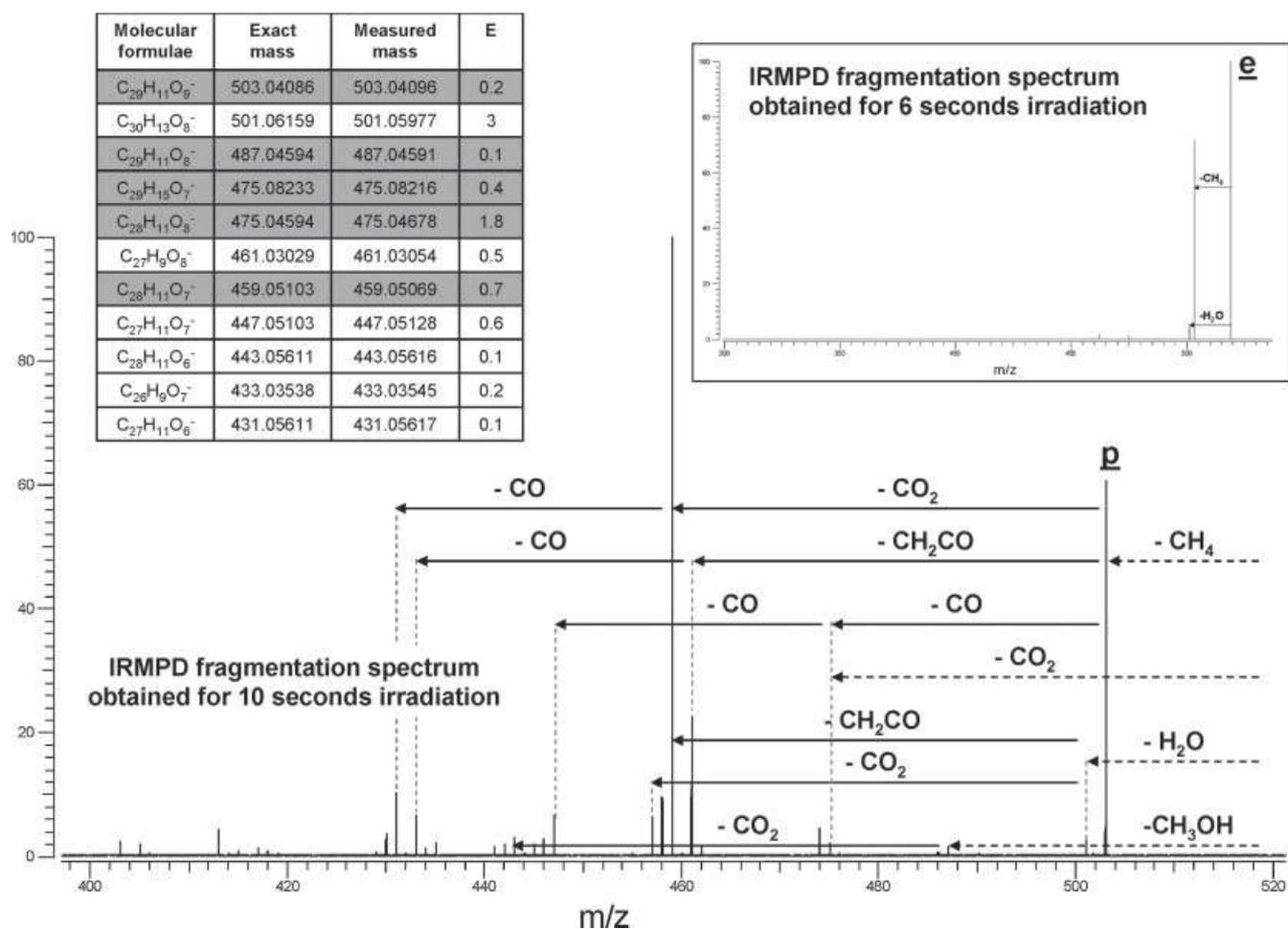


Figure 11. Fragmentation of the **e** ion relative to the $[M-H]^-$ deprotonated molecular species of isopseudohypericin at m/z 519 in IRMPD mode. Activation for 6 (in insert) or 10 s at 100% of the energy of the CO_2 laser. Errors are given in ppm. Dashed lines correspond to fragmentation steps originating from unobserved pseudomolecular ions. Shaded lines correspond to major differences observed between pseudohypericin and hypericin.

behavior of pseudohypericin and isopseudohypericin may be useful to rationalize the mechanism of CH_4 elimination for both of these compounds.

The specific behavior of isopseudohypericin may be explained by the increase in aromaticity of the resulting product ion after elimination of CH_4 . As a consequence, the ability of this ion to further eliminate an additional neutral is limited and explains the absence of fragments in the lower m/z range and the requirement of a higher activation energy to induce the elimination of $CH_2=C=O$, CO or CO_2 neutrals. For higher activation conditions, the loss of the CH_4 group was followed by the loss of CO_2 in the study of isopseudohypericin; this behavior is similar to what was observed with hypericin (see Fig. 5). On the contrary, pseudohypericin is characterized by the loss of the CO neutral after the elimination of CH_4 . Consequently, the structures of the $[M-CH_4-H]^-$ ion produced by MS/MS of pseudohypericin and isopseudohypericin are thought to be quite different although isopseudohypericin and pseudohypericin have quite similar structures. Figure 12 presents different hypotheses to rationalize this fact. The first hypothesis may be associated with the formation of a product ion **p** by elimination of CH_4 , whatever the precursor ion – i.e. the $[M-H]^-$ deprotonated molecular ion of

pseudohypericin (**c**) or isopseudohypericin (**e**). In contrast, the second mechanism may only be considered in the study of pseudohypericin, the six-membered oxygen-containing ring disfavored this process. The resulting product ion (**o**) is quite different from **p**, which is thought to be mainly associated with MS/MS of the $[pseudohypericin-H]^-$ precursor ion. The fragment ion (**o**) may easily undergo further elimination of CO after the cleavage of a C–C bond in the resulting five-membered ring. The displacement of the keto-enol equilibrium to favor the keto form, and the capture of the labile hydrogen in the α position of the carbonyl group, appears to be responsible for the elimination of CO (**m** ion). This process is favored towards the elimination of CO_2 as was observed for hypericin and isopseudohypericin. Additionally, the elimination of a hydroxyl radical to form $[M-CH_4-OH-H]^-$ (**q** ion) for pseudohypericin supports the occurrence of the second fragmentation mechanism for isopseudohypericin. This fragment ion is thought to result from the release of the dangling OH group by homolytic bond dissociation.

It is also very important to note that isopseudohypericin cannot easily eliminate a CH_3OH or CH_2O neutral due to its cyclic structure. Indeed, ions associated with these losses were only barely detected in MS/MS experiments conducted

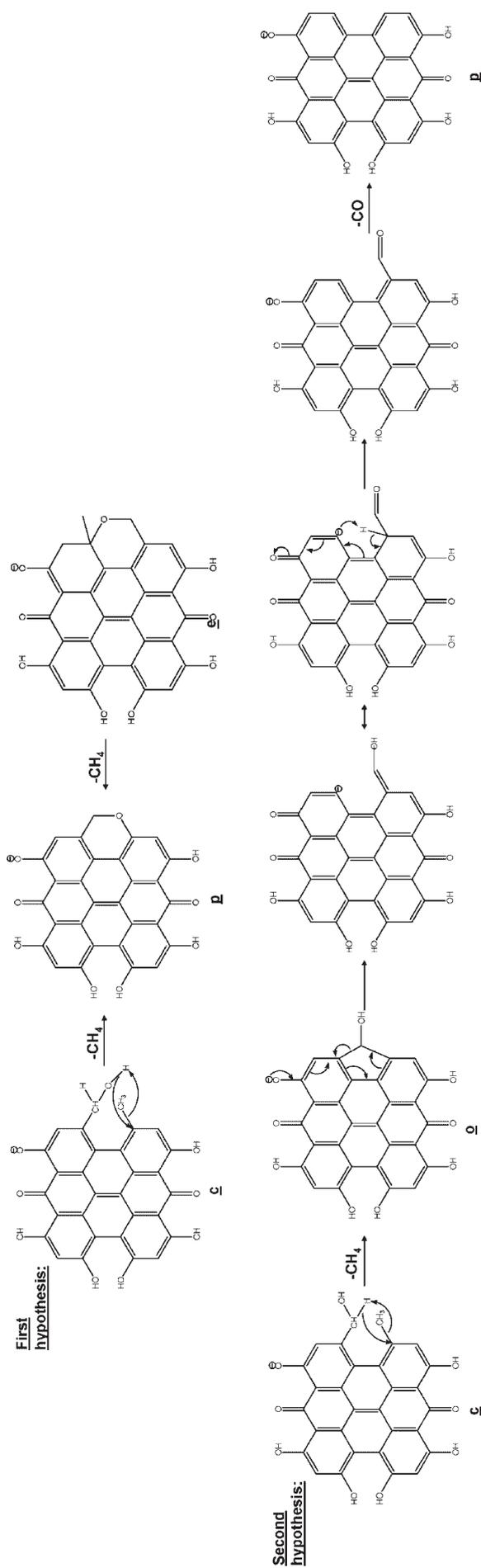


Figure 12. Proposed mechanisms for loss of CH_4 in the study of the **e** isopseudohypericin and **c** pseudohypericin pseudomolecular ions by IRMPD MS/MS. Mechanism of the further elimination of CO from the $[\text{M}-\text{CH}_4-\text{H}]^-$ product ion of pseudohypericin.

Table 1. Major differences observed between the five naphthodianthrone concerning their fragmentation pathways and relative intensities observed for detected fragments

	Hypericin	Pseudohypericin	Isopseudohypericin	Protohypericin	Protopseudohypericin
$[M-CH_4-H]^-$		++	+++ (recovery of aromaticity)		(defavored due to 8-membered ring formation)
$[M-CH_2O-H]^-$		+ (presence of $-CH_2OH$ substituent)			(defavored due to 8-membered ring formation)
$[M-CH_3OH-H]^-$		++ (presence of $-CH_2OH$ substituent)			(defavored due to 8-membered ring formation)
$[M-CO_2-H]^-$	+++	+		+++	+++
$[M-CH_4-CO-H]^-$		+++			
$[M-CH_4-CO_2-H]^-$	+	+	+++	+	+

on isopseudohypericin. Nevertheless, the detection of low abundance $[M-CH_3OH-H]^-$ and $[M-CH_2O-H]^-$ product ions in the study of isopseudohypericin by MS/MS may also be rationalized by incomplete degradation of pseudohypericin and the presence of small amounts of pseudohypericin. Finally, this difference in MS/MS behavior may be used to distinguish these isobaric compounds by MS/MS experiments.

Protohypericin and protopseudohypericin IRMPD behavior

The MS/MS behavior of protohypericin and protopseudohypericin presented important similarities with those observed in the study of hypericin and pseudohypericin. That is the reason why they are not graphically reported in this paper. The observed similarities for hypericin and protohypericin rationalize the proposed mechanisms for the MS/MS of hypericin. Indeed, most of the neutral losses observed for the $[M-H]^-$ ion of hypericin and protopseudohypericin only involved the 'left part' of the molecule and not the 'right part' which is associated with the structural differences of both compounds. This supports our hypotheses. One exception is the elimination of CH_4 , which is in fact only barely affected by the missing bond in the protohypericin molecule, compared with hypericin. No major differences in intensity in MS/MS mass spectra of the $[M-CH_4-H]^-$ ion were found for these two compounds.

The fragmentation behavior observed for protopseudohypericin and pseudohypericin presents a more important number of differences. For example, losses of CH_3OH and CH_4 , which were found to be favored for pseudohypericin, led to low abundance ions for protopseudohypericin. The absence of a C-C bond in the α position to positions 10 and 11 appeared to be responsible for this fact. The formation of an eight-membered ring is not favorable for such processes. Moreover, stabilization of the resulting product ions by recovery of the aromaticity may not occur for protopseudohypericin.

CONCLUSIONS

The present paper describes the mass spectrometric characterization of hypericin, pseudohypericin, protohypericin and protopseudohypericin, naphthodianthrone derivatives that exhibit important photodynamic activities and are used for the taxonomic classification of *Hypericum* species. Isopseu-

dohypericin, the alkaline degradation product of pseudohypericin, has also been investigated since it has not yet been fully characterized by mass spectrometry.

In spite of important structural similarities for all of the investigated compounds, ESI-FTICRMS and ESI-FTICRMSⁿ experiments presented in this paper allowed different behavior to be highlighted. The MS/MS fragmentation spectrum of hypericin is mainly dominated by ions resulting from loss of CO_2 and the subsequent elimination of CO. On the contrary, loss of CO_2 from the pseudomolecular ion of pseudohypericin is less significant. The mass accuracy measurement provided by FTICRMS allowed the differentiation of the $[pseudohypericin-CO_2-H]^-$ ion from its isobaric species $[pseudohypericin-CH_4-CO-H]^-$ to be achieved. The appearance of the $[pseudohypericin-CH_4-CO-H]^-$ ion, and the detection of the $[pseudohypericin-CH_4-OH-H]^-$ ion, provided some elements to better understand the elimination of a methane neutral. Isopseudohypericin obtained by alkaline treatment of pseudohypericin revealed a specific behavior -i.e. different to what was observed in the study of pseudohypericin. When activation conditions were similar to what had been used in the MS/MS of hypericin and pseudohypericin, $[isopseudohypericin-H]^-$ was found to be almost entirely converted into the $[isopseudohypericin-CH_4-H]^-$ fragment. This fragmentation pathway was favored because it allows the aromaticity of the molecule to be recovered. Consequently, further fragmentations are similar to what was observed for hypericin (elimination of CO_2).

Table 1 summarizes the different MS/MS behavior reported in this study for the five investigated naphthodianthrone in terms of fragmentation pathways and relative intensities of the detected product ions. The accurate mass measurement of the fragment ions as well as MS³ experiments allowed us to corroborate or reconsider assignments previously published. The mass spectral fingerprints obtained in this study will be useful to identify more surely these compounds, when *Hypericum perforatum* extracts are infused in an ESI source without chromatographic separation. The limits of detection reached with our experimental approach are below those obtained with classical chromatographic analysis.¹⁹ Moreover, the ion signal suppression effect in the analysis of whole *Hypericum perforatum* extract was found to be negligible for naphthodianthrone compounds. In the field of LC/MS analysis of *Hypericum perforatum* extracts, our work may be helpful to perform

quantification in the multiple reaction monitoring (MRM) mode for the naphthodianthrone compounds by choosing the more specific MS/MS transition.

Moreover, these new elements, which are mainly associated with the understanding of the dependency between the fragmentation pathway and the nature of substituents, may be useful to fully elucidate the biosynthetic pathways of the formation of hypericin or protohypericin analogs in *Hypericum perforatum* for which some steps are still unclear or unknown. In other respects, hypericin-like compounds have been detected in fossilized animal species and might exist in other organisms; they may be detected and analyzed by the proposed methodology, which is sensitive and specific. Finally, these results may also be of primary importance to characterize biologically active synthetic analogs of hypericin, which have been largely prepared through modification of the pigment substituents until now^{20,21} and are currently the object of structural modifications aiming at cellular vectorization.²²

REFERENCES

1. Bilia AR, Gallori S, Vincieri FF. *Life Sci.* 2002; **70**: 3077.
2. Mennini T, Gobbi M. *Life Sci.* 2004; **75**: 1021.
3. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PAM. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2002; **34**: 221.
4. Delaey EM, Obermueller R, Zupko I, De Vos D, Falk H, de Witte PAM. *Photochem. Photobiol.* 2001; **74**: 164.
5. Kitanov GM. *Biochem. Systematics Ecol.* 2001; **29**: 171.
6. Fourneron JD, Herbette G, Caloprisco E. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences - Series IIC - Chemistry* 1999; **2**: 127.
7. Vandenberghe AL, Kamuhabwa A, Delaey E, Himpens BE, Merlevede WJ, de Witte PA. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 1998; **45**: 87.
8. Stavropoulos NE, Kim A, Nseyo UU, Tsimaris I, Chung TD, Miller TA, Redlak M, Nseyo UO, Skalkos D. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 2006; **84**: 64.
9. Fourneron JD, Nait-Si Y, Rosas R, Faure R, Viant P. *Tetrahedron Lett.* 2003; **44**: 6285.
10. Poutaraud A, Di Gregorio F, Tin VC, Girardin P. *Planta Med.* 2001; **67**: 254.
11. Walker LW. Communication in Portland State University, 1999.
12. Piperopoulos G, Lotz R, Wixforth A, Schmierer T, Zeller KP. *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.* 1997; **695**: 309.
13. Kusari S, Lamshöft M, Zühlke S, Spitteller M. *J. Nat. Prod.* 2008; **71**: 159.
14. Cohen PA, Towers GHN. *Phytochemistry* 1995; **40**: 911.
15. Mukherjee P, Fulton DB, Halder M, Han X, Armstrong DW, Petrich JW, Lobban CS. *J. Phys. Chem. B* 2006; **110**: 6359.
16. Marshall AG, Wang TCL, Ricca TL. *J. Am. Chem. Soc.* 1985; **107**: 7893.
17. Gauthier JW, Trautman TR, Jacobson DB. *Anal. Chim. Acta* 1991; **246**: 211.
18. Fletchner TW, Winnik B, Winnik W. *J. Mass Spectrom.* 1996; **31**: 377.
19. Tolonen A, Hohtola A, Jalonen J. *Phytochem. Anal.* 2003; **14**: 306.
20. Crnolatic I, Huygens A, van Aerschot A, Busson R, Rozenski J, de Witte PAM. *Bioorg. Med. Chem.* 2005; **13**: 6347.
21. Guedes RC, Eriksson LA. *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 2006; **178**: 41.
22. GeiBlmeir D, Falk H. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly* 2008; **139**: 1127.