

# Transfert de proton photoinduit à partir du premier état triplet de l'hypéricine en dispersion micellaire

Stéphane Dumas, Dominique Eloy et Pierre Jardon

Laboratoire d'Electrochimie Organique et de Photochimie Redox (CNRS UMR 5630), Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 9, France

Received (in Montpellier, France) 19th April 2000, Accepted 8th June 2000

Published on the Web 9th August 2000

L'hypéricine, un pigment naturel, possède une activité antitumorale et antivirale photoinduite. Cette activité pourrait être liée dans une certaine mesure à la capacité de ce pigment à produire un transfert de proton dans un état excité. Partant de cette idée une étude par spectroscopie laser de l'équilibre prototropique de l'hypéricine dans son premier état triplet a été entreprise. Le milieu dans lequel cette étude a été réalisée est une dispersion micellaire tamponnée de façon à simuler l'environnement d'une membrane cellulaire dans laquelle l'hypéricine est principalement localisée. Les expériences de photolyse-éclair dans l'échelle de temps de la microseconde indiquent que l'hypéricine dans son premier état triplet est un donneur de proton pour lequel l'équilibre acide-base ne peut pas être établi totalement pendant la durée de vie de l'état excité. Une analyse dynamique a donc dû être effectuée de façon à obtenir la valeur correcte:  $pK_a^* = 7.35$ . La constante d'acidité dans l'état triplet augmente fortement par rapport à celle dans l'état fondamental et la constante de vitesse de déprotonation est  $k_d = 1800 \text{ s}^{-1}$ . A  $\text{pH} \geq 10$  un transfert de proton photoinduit entre l'hypéricine dans l'état triplet et son dianion a été mis en évidence avec une constante de vitesse  $k_t = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; ainsi après une excitation lumineuse, un transfert de proton peut se produire très rapidement entre l'hypéricine et un accepteur de proton voisin. Ces résultats montrent qu'une réaction de transfert de proton doit être considérée comme un des processus responsables des propriétés photosensibilisantes de l'hypéricine.

**Photoinduced proton transfer from the first triplet state of hypericin in micellar dispersion.** Hypericin, a natural pigment, possesses light-induced antitumor and antiviral activities and it was suggested that these activities may be related, to some extent, to its ability to undergo a proton transfer reaction in its excited states. Thus a laser study of the prototropic equilibrium of triplet hypericin has been performed in a buffered micellar dispersion in order to provide a simplified model of the cellular membrane within which hypericin is thought to partition. Flash photolysis experiments on the microsecond timescale indicated that hypericin excited in the triplet state is a proton donor, but acid-base equilibrium cannot be completely established during the lifetime of the excited state. A dynamic analysis was therefore carried out in order to obtain the correct value:  $pK_a^* = 7.35$ . The acidity constant in the triplet state markedly increases compared to that in the ground state and the proton dissociation rate is  $k_d = 1800 \text{ s}^{-1}$ . At  $\text{pH} \geq 10$  a photoinduced proton transfer between the triplet hypericin and its dianion was observed with a rate constant  $k_t = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ; thus after excitation, a proton could be transferred very quickly from hypericin to a neighbouring proton acceptor. These results show that a proton transfer reaction in the triplet state has to be considered as one of the possible processes responsible for the photosensitizing properties of hypericin.

L'hypéricine et certains de ses dérivés sont des chromophores constitutifs de photorécepteurs du règne végétal et dans une moindre mesure du règne animal.<sup>1–3</sup> Au cours des dix dernières années ce composé naturel, par sa remarquable activité biologique photoinduite, a suscité un intérêt rapidement croissant. Une facette de cette activité est représentée par les manifestations de phototoxicité qu'il peut provoquer chez l'animal ou chez l'homme, appelées "hypéricisme",<sup>1</sup> qui sont connues depuis très longtemps. Les premières études concernant ses propriétés photophysiques ont été réalisées à la fin des années 80 dans notre laboratoire où nous avons montré qu'en solution ou en dispersion microhétérogène (micelles et liposomes) ce composé est susceptible de photosensibiliser la formation d'oxygène  $^1\Delta_g$  avec un bon rendement par transfert d'énergie à partir de son premier état triplet.<sup>4–7</sup> Compte tenu de sa très forte affinité pour les membranes et de sa faible toxicité à l'obscurité nous avons proposé son utilisation en photothérapie du cancer.<sup>8</sup>

Par la suite de nombreux essais sur des cultures de cellules normales ou malignes ont été effectués dans notre laboratoire<sup>9,10</sup> et par d'autres équipes<sup>3,11–16</sup> pour mettre en évidence les mécanismes de la phototoxicité de l'hypéricine et évaluer l'efficacité de son activité antitumorale qui s'avère souvent supérieure à celle des photosensibilisateurs utilisés jusqu'alors. Parallèlement d'autres auteurs ont fait état d'expériences démontrant que l'hypéricine et certains de ses dérivés possèdent des propriétés antivirales photoinduites et sont capables d'inactiver en particulier le virus de l'immunodéficience humaine.<sup>17–22</sup> Dans un autre registre, des travaux plus anciens signalent que des pigments analogues à l'hypéricine constituent des photorécepteurs du phototropisme de certains organismes monocellulaires comme *Stentor coeruleus* et *Blepharisma japonicum*.<sup>23,24</sup>

De l'ensemble des publications consacrées à l'activité biologique de l'hypéricine il ressort que la lumière est nécessaire pour que cette activité se manifeste, par contre la présence

d'oxygène ne semble pas toujours indispensable.<sup>25</sup> Dans la plupart des cas l'oxygène  $^1\Delta_g$  est impliqué dans les effets phototoxiques observés, cependant l'intervention d'autres espèces actives (anion superoxyde, radical-anion de l'hypéricine) est quelques fois mise en évidence.<sup>26–28</sup>

Nous avons pu montrer<sup>29</sup> que l'hypéricine dans son premier état triplet ( $^3\text{Hyp}^*$ ) est capable d'oxyder un donneur d'électrons dont le potentiel d'oxydation est inférieur à 0,33 V par rapport à une électrode au calomel saturée en KCl (ECS) dans le diméthylsulfoxyde avec une constante de vitesse d'extinction de l'état triplet  $k_e \geq 6,6 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et un rendement quantique de formation du radical-anion  $\text{Hyp}^{\cdot-}$  compris entre 0,32 et 0,48. De même  $^3\text{Hyp}^*$  peut réduire un accepteur d'électrons dont le potentiel de réduction est supérieur à  $-0,57 \text{ V/ECS}$  dans l'acétonitrile avec  $k_e \geq 1,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et un rendement quantique de formation du radical-cation  $\text{Hyp}^{\cdot+}$  compris entre 0,50 et 0,54. Par conséquent dans les conditions *in vitro* ou *in vivo* il est possible d'envisager la formation de  $\text{Hyp}^{\cdot-}$  ou  $\text{Hyp}^{\cdot+}$  par transfert d'électron photoinduit et éventuellement dans un deuxième temps la réduction de l'oxygène moléculaire selon la réaction  $\text{Hyp}^{\cdot-} + \text{O}_2 \rightarrow \text{Hyp} + \text{O}_2^{\cdot-}$  pour laquelle la variation d'enthalpie libre est négative.<sup>30</sup>

Un troisième mécanisme pourrait expliquer une partie de l'activité photobiologique de l'hypéricine: sa déprotonation photoinduite. Cette dernière éventualité est fondée essentiellement sur deux observations. La première concerne le phototropisme de *S. coeruleus* et de *B. japonicum* précédemment évoqué dont l'étude a permis à ses auteurs<sup>23,24</sup> de montrer que le mouvement de ces protozoaires serait provoqué par une diminution locale du pH au niveau des photorécepteurs. La deuxième découle d'une série d'expériences réalisée à l'aide d'une sonde moléculaire fluorescente en milieu liposomique. Celle-ci a permis d'établir que l'équilibre acide-base de la sonde est modifié dans le sens d'une acidification sous l'effet d'une excitation lumineuse lorsque les molécules d'hypéricine et de la sonde sont toutes deux incluses dans les vésicules.<sup>31,32</sup> La même constatation a été faite lorsque la dispersion de liposomes est remplacée par une culture de cellules.<sup>33</sup>

Parallèlement aux transferts intermoléculaires de proton, ainsi mis en évidence, dans lequel l'hypéricine joue le rôle de donneur, un transfert intramoléculaire de proton ou d'hydrogène se traduisant par une tautomérisation a aussi été envisagé pour expliquer les propriétés photophysiques et spectroscopiques de l'hypéricine dans divers milieux.<sup>34–37</sup> Récemment il a été montré que la tautomérisation de l'hypéricine dans son premier état excité singulet intervenait par l'intermédiaire d'un transfert intramoléculaire d'un atome d'hydrogène.<sup>38</sup> Enfin, l'intérêt accordé aux propriétés acide-base des états photoexcités de l'hypéricine prend aussi sa source dans le rôle actuellement attribué aux variations locales de pH sur certaines fonctions pharmacologiques comme l'activité antivirale<sup>39</sup> ou antitumorale.<sup>40</sup>

Nous avons donc entrepris récemment une étude des propriétés prototropiques de l'hypéricine dans un état électronique excité afin d'en préciser les paramètres cinétiques et thermodynamiques. Nous avons d'abord déterminé les propriétés spectroscopiques d'absorption et d'émission des espèces qui interviennent dans les équilibres acide-base dans le domaine  $0 \leq \text{pH} \leq 14$  et les constantes de ces équilibres dans l'état fondamental et le premier état excité singulet en milieu aqueux.<sup>41</sup> Ont été ainsi mises en évidence quatre espèces formant trois couples acide-base:  $\text{HypH}_3^+/\text{HypH}_2$ ;  $\text{HypH}_2/\text{HypH}^-$  et  $\text{HypH}^-/\text{Hyp}^{2-}$  dont les  $\text{pK}_a$  dans un état fondamental sont respectivement 1, 7 et 11 en milieu micellaire de Brij35. Dans le premier état singulet excité, les  $\text{pK}_a^*$  évalués selon la méthode de Förster<sup>42</sup> sont dans le même ordre 0,3, 7 et 8,3. D'une espèce à l'autre la déprotonation s'accompagne d'un effet bathochrome sur les spectres électroniques sauf pour le couple  $\text{HypH}_2/\text{HypH}^-$  dans lequel

les deux formes possèdent des propriétés électroniques très voisines<sup>30,43</sup> ce qui rend la détermination de la constante d'équilibre correspondante très délicate. En effet, si un accord assez général est maintenant établi sur les deux valeurs extrêmes des  $\text{pK}_a$  dans l'état fondamental (1 à 1,8 et 11 à 11,7 selon le milieu),<sup>23,41,44–47</sup> la valeur intermédiaire ( $\text{pK}_a = 7$ ) est encore discutée.<sup>46</sup> Une des conclusions de cette première étude<sup>41</sup> est que la déprotonation photoinduite de l'hypéricine neutre ou monoanionique dans un premier état excité singulet, conduisant à une acidification du milieu, est impossible, la désactivation de cet état étant beaucoup plus rapide que la déprotonation. Néanmoins un transfert intermoléculaire de proton pourrait intervenir dans la mesure où la molécule se trouve à proximité d'un site basique au moment de la photoexcitation. La question qui se pose maintenant est de savoir dans quelles conditions une déprotonation photoinduite de l'hypéricine dans son premier état triplet est un processus possible, en particulier dans un milieu microhétérogène simulant l'environnement de cette molécule au sein d'un organisme vivant.

L'objet de ce travail est de répondre à cette question et de préciser notamment les paramètres cinétiques des transferts photoinduits de protons susceptibles d'intervenir entre l'hypéricine et son environnement.

## Conditions expérimentales

### Produits

L'hypéricine a été synthétisée au laboratoire<sup>48</sup> et purifiée par chromatographie en phase liquide (Sephadex LH20) en utilisant le méthanol comme solvant.

L'affinité de l'hypéricine pour les membranes biologiques constitue une de ses propriétés remarquables<sup>5,6</sup> qui a été évaluée récemment dans le cas d'une bicouche lipidique de liposomes.<sup>49</sup> L'environnement choisi pour l'étude de ses propriétés acide-base a donc été celui d'une micelle de Brij35 qui simule de façon simplifiée un milieu membranaire. Les dispersions micellaires de Brij35 (Merck) ont été préparées selon une méthode déjà décrite<sup>41</sup> et la concentration du Brij35 était de  $5 \times 10^{-2} \text{ M}$ , ce qui correspondait à une concentration de micelles de  $1,25 \times 10^{-3} \text{ M}$ . La phase aqueuse étant constituée d'une solution tampon (Merck), le pH a été dans certains cas ajusté par addition d'acide chlorhydrique ou de soude. La concentration de l'hypéricine ( $5 \times 10^{-6} \text{ M}$ ) étant très petite devant celle des micelles, pratiquement une seule molécule se trouve encapsulée au sein d'une micelle.

Les échantillons ont été préparés à l'abri de la lumière puis dégazés soigneusement en effectuant plusieurs cycles congélation-vide-réchauffement-agitation jusqu'à ce que la pression résiduelle soit inférieure à  $10^{-2} \text{ Pa}$ .

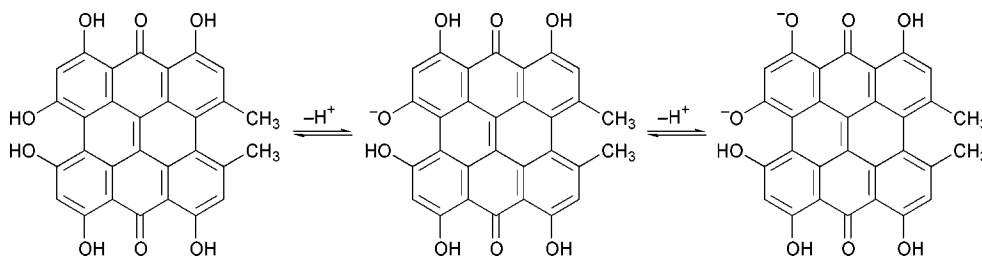
### Appareillage et méthode

Les spectres d'absorption ont été réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer Lambda 17. Les impulsions lumineuses nécessaires à l'observation des espèces transitoires ont été délivrées par un laser à colorant (coumarine 153) couplé à un laser à exciplexes Lambda-Physik EMG 100. La longueur d'onde d'excitation était de 550 nm et l'énergie d'une impulsion d'environ 10 mJ avec une durée à mi-hauteur de 10 ns.

L'absorbance différentielle des espèces transitoires a été mesurée à l'aide d'un montage classique.<sup>4</sup> Le traitement des signaux enregistrés sur un oscilloscope numérique Tektronix TDS 520A a permis de réaliser une analyse cinétique de l'évolution de l'absorption au cours du temps.

## Résultats

Nous avons mesuré les paramètres de l'absorption transitoire de l'hypéricine dans son premier état triplet et des autres



**Schéma 1** Formes acide/base de l'hypéricine ( $5 \leq \text{pH} \leq 11,5$ ) dans l'état fondamental. Les différentes formes tautomères possibles ne sont pas représentées.

espèces éventuellement formées à partir de cet état. Dans la dispersion micellaire où le pH de la phase aqueuse a été ajusté à une valeur variable entre 5 et 11,5, l'hypéricine est sous une forme neutre, monoanionique ou dianionique selon le pH.<sup>41</sup> La forme monoanionique correspond au départ d'un proton situé au voisinage de l'axe de symétrie  $C_2$  et la forme dianionique au départ d'un deuxième proton situé au voisinage d'un groupement carbonyle (Schéma 1).

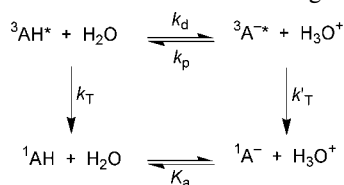
L'évolution du premier état triplet  $^3\text{AH}^*$  de l'hypéricine après une excitation est représentée, *a priori*, à l'aide du Schéma 2.<sup>50,51</sup> Des variantes de ce schéma seront envisagées par la suite dans la discussion pour tenir compte des autres réactions possibles.

Immédiatement après l'excitation lumineuse ( $t < 100 \mu\text{s}$ ) d'une dispersion désoxygénée d'hypéricine le spectre caractéristique de l'absorption triplet-triplet<sup>52</sup> de ce pigment a été observé dans tout le domaine de pH compris entre 5 et 11,5, sans changement qui traduirait la présence d'une autre espèce. A partir de  $\text{pH} = 10$  l'absorbance transitoire, à une longueur d'onde donnée, diminue jusqu'à être divisée par 2 à  $\text{pH} = 11,5$  et s'annule à  $\text{pH} = 13$ . Cette diminution correspond exactement à celle de la concentration de la forme monoanionique lorsque l'équilibre acide-base de l'état fondamental est déplacé vers la forme dianionique avec  $\text{p}K_a = 11,5$  dans les conditions de cette expérience. Par conséquent aucune absorption transitoire n'a pu être mise en évidence à partir de l'excitation directe de la forme dianionique de l'hypéricine. De même, en milieu aéré aucune variation d'absorption n'a pu être détectée entre 400 et 800 nm quelle que soit la valeur du pH. Le spectre d'absorption triplet-triplet présente deux maxima à 520 ( $\epsilon = 32\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) et 630 ( $\epsilon = 13\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) nm, qui sont les longueurs d'onde choisies pour l'observation des cinétiques.

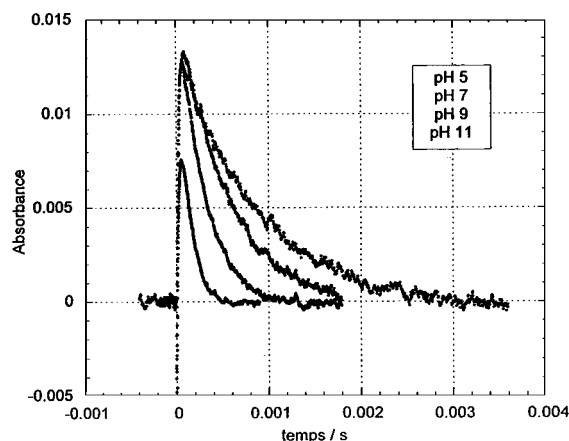
A 520 nm la vitesse de décroissance de l'absorbance différentielle augmente avec le pH (Fig. 1); à 630 nm la cinétique de décroissance est identique à la précédente jusqu'à  $\text{pH} = 7$  puis évolue de manière différente (Fig. 2).

Lorsque  $\text{pH} < 7$ , le spectre d'absorption transitoire décroît au cours du temps mais la distribution des absorbances en fonction de la longueur d'onde reste identique (Fig. 3 et 4).

Au delà de  $\text{pH} = 7$  l'augmentation de pH provoque un changement de cette distribution traduisant la formation d'une autre espèce transitoire dont la bande d'absorption est centrée à 630 nm. La Fig. 3 montre que l'absorption à 520 nm caractéristique de l'état triplet a décliné fortement 300  $\mu\text{s}$  après l'éclair d'excitation alors que la bande centrée vers 630 nm a changé de forme mais n'a pas globalement diminué. Dans le même temps l'absorbance différentielle négative à 596 nm,



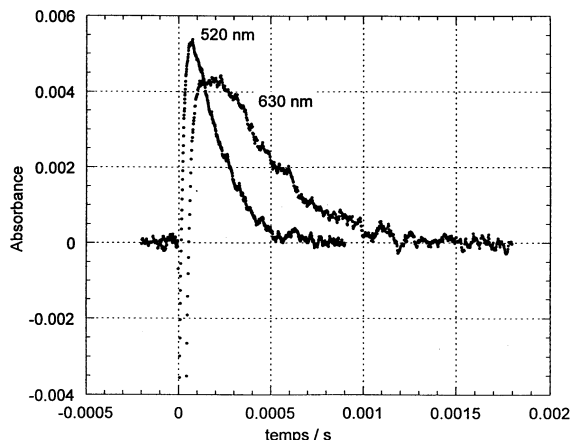
**Schéma 2** Processus de désactivation du premier état triplet de l'hypéricine mettant en évidence le rôle des réactions prototropiques



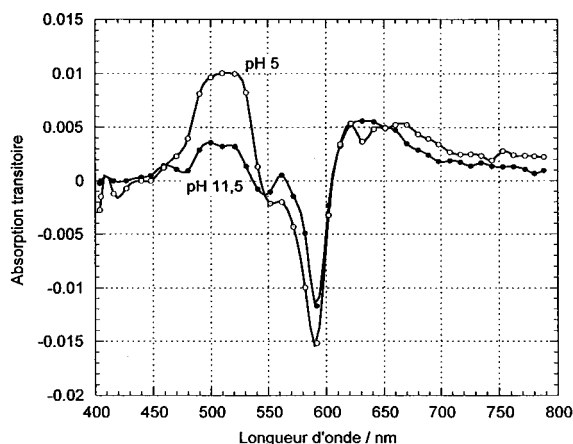
**Fig. 1** Cinétiques de l'absorbance différentielle transitoire d'une dispersion micellaire d'hypéricine mesurée à 520 nm pour diverses valeurs du pH.

longueur d'onde pour laquelle l'absorption de l'état fondamental est dominante, a peu varié indiquant que l'espèce transitoire formée prend naissance à partir de l'état triplet. Cette espèce pourrait donc être la forme basique  $^3\text{Hyp}^{2-*}$ . La Fig. 4 permet de comparer le spectre de  $^3\text{HypH}_2^*$  à  $\text{pH} = 5$  avec celui de  $^3\text{Hyp}^{2-*}$  à  $\text{pH} = 11,5$ ; en effet 600  $\mu\text{s}$  après l'éclair d'excitation le premier est encore parfaitement observable sans déformation notable jusqu'à  $\text{pH} = 7$  alors qu'il n'est déjà plus mesurable dans le milieu le plus basique où seul le second subsiste.

Les observations précédentes peuvent donc être le résultat d'une déprotonation photoinduite de l'hypéricine à  $\text{pH} > 7$  dont la réalité fera l'objet d'une argumentation plus détaillée dans la partie discussion. Dans ce domaine de pH la vitesse de

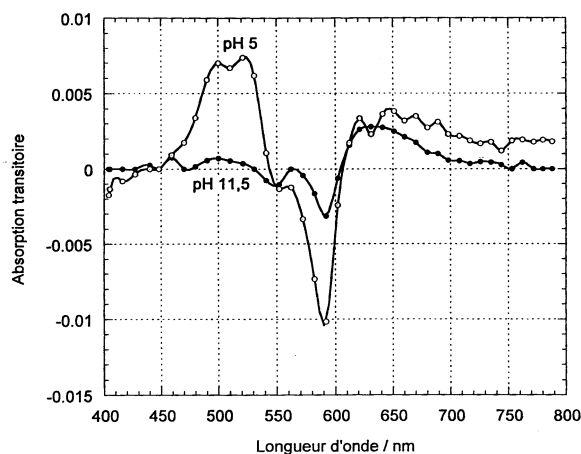


**Fig. 2** Cinétiques de l'absorbance différentielle transitoire d'une dispersion micellaire d'hypéricine à  $\text{pH} = 11,5$  observées à 520 et 630 nm.



**Fig. 3** Spectres d'absorption différentielle mesurés 300  $\mu$ s après l'excitation d'une dispersion micellaire d'hypericine pour deux valeurs du pH.

déprotonation ne peut pas être très supérieure à celle de la désactivation de l'état triplet par les autres voies (*vide infra*); c'est à dire l'équilibre acide-base entre espèces excitées n'a pas le temps de s'établir pendant la durée de vie de ces espèces. Une étude cinétique détaillée est donc nécessaire pour déterminer la constante  $K_a^*$  de l'équilibre acide-base de l'hypericine dans son premier état triplet et plus généralement pour évaluer les paramètres qui interviennent dans les processus figurant sur le Schéma 2.<sup>50,51</sup> Il faut souligner que les expériences doivent être effectuées sur des échantillons soigneusement désoxygénés et débarrassés des impuretés de façon à réduire autant que possible la vitesse de désactivation



**Fig. 4** Spectres d'absorption différentielle mesurés 600  $\mu$ s après l'excitation d'une dispersion micellaire d'hypericine pour deux valeurs du pH

des espèces excitées selon des voies autres que celle de la déprotonation.

Partant du Schéma 2 l'évolution de la concentration des espèces excitées après la formation de molécules d'hypericine dans le premier état triplet est représentée à l'aide des équations suivantes:<sup>50,51</sup>

$$x = x_0(A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}) \quad (1a)$$

$$y = x_0 \frac{k_d}{\sqrt{m}} (e^{-\beta t} - e^{-\alpha t}) \quad (1b)$$

avec  $x = [^3AH^*]$ ,  $y = [^3A^{*-}]$ ,  $\alpha = (a + a' + \sqrt{m})/2$ ,  $\beta = (a + a' - \sqrt{m})/2$ ,  $A = (a - a' + \sqrt{m})/2\sqrt{m}$ ,  $B = (a' - a + \sqrt{m})/2\sqrt{m}$ ,  $a = k_d + k_T$ ,  $a' = k'_p + k'_T$ ,  $m = (a - a')^2 + 4k_d \cdot k'_p$ ,  $k'_p = k_p \cdot [H_3O^+]$ . A l'instant initial  $t = 0$ , immédiatement après l'excitation dont la durée est très brève par rapport à la durée de vie de l'état triplet, les concentrations initiales sont respectivement  $x_0 = 6 \times 10^{-7}$  M et  $y_0 = 0$ .

A la longueur d'onde de 520 nm la forme basique excitée  $^3Hyp^{2-*}$  possède une absorbance négligeable devant celle de la forme acide  $^3HypH^*$  (Fig. 4). Par conséquent l'absorbance différentielle peut s'exprimer par  $\Delta A_{520} = \Delta \epsilon_A l x$  où  $\Delta \epsilon_A$  est la différence entre le coefficient d'absorption molaire dans l'état fondamental et celui dans le premier état triplet. Cette expression, compte tenu des relations (1), devient:

$$\Delta A_{520} = \Delta A_{520}^0 (A e^{-\alpha t} + B e^{-\beta t}) \quad (2)$$

A 630 nm les deux espèces excitées contribuent au spectre d'absorption transitoire; par contre l'absorbance de la forme acide dans l'état fondamental est nulle ( $\epsilon_A = 0$ ).

Dans le domaine de pH pour lequel la protonation du dianion est lente par rapport à la désactivation du dianion excité,  $k'_p \ll k'_T$ , une variation de la concentration  $z$  du dianion est alors observée ( $\epsilon_B = 16000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ):

$$z = k'_T x_0 \frac{k_d}{\sqrt{m}} \left( \frac{1}{\alpha} e^{-\alpha t} - \frac{1}{\beta} e^{-\beta t} \right) + C \quad (3)$$

L'absorbance différentielle s'écrit donc  $\Delta A_{630} = \epsilon_A^* l x + \epsilon_B^* l y + \epsilon_B l (z - z_0)$ . Avec les relations (1) et (2) cette expression devient:

$$\Delta A_{630} = \Delta A_{630}^0 (A' e^{-\alpha t} + B' e^{-\beta t}) + \Delta A_{630}^\infty \quad (4)$$

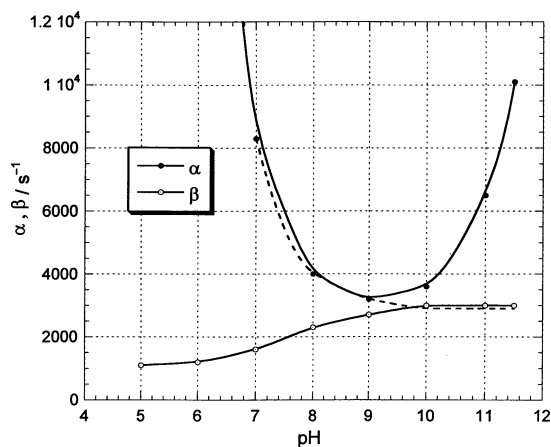
où  $\Delta A_{630}^\infty$  est la variation d'absorbance provoquée par la formation du dianion dont la durée de vie est grande par rapport à celle des espèces excitées. Lorsque la protonation du dianion dans l'état fondamental est rapide par rapport à la désactivation du dianion dans l'état excité, le terme  $\Delta A_{630}^\infty$  est nul.

Un très bon accord entre les relations (2) et (4) et les cinétiques expérimentales de l'absorbance différentielle à 520 et 630 nm est constaté dans le domaine  $5 \leq \text{pH} \leq 9$  avec les paramètres rassemblés dans le Tableau 1 qui correspondent aux constantes de vitesse indiquées. Au delà de  $\text{pH} = 9$ , le

**Tableau 1** Evolution en fonction du pH des paramètres cinétiques de l'absorption transitoire d'une dispersion micellaire d'hypericine<sup>a</sup>

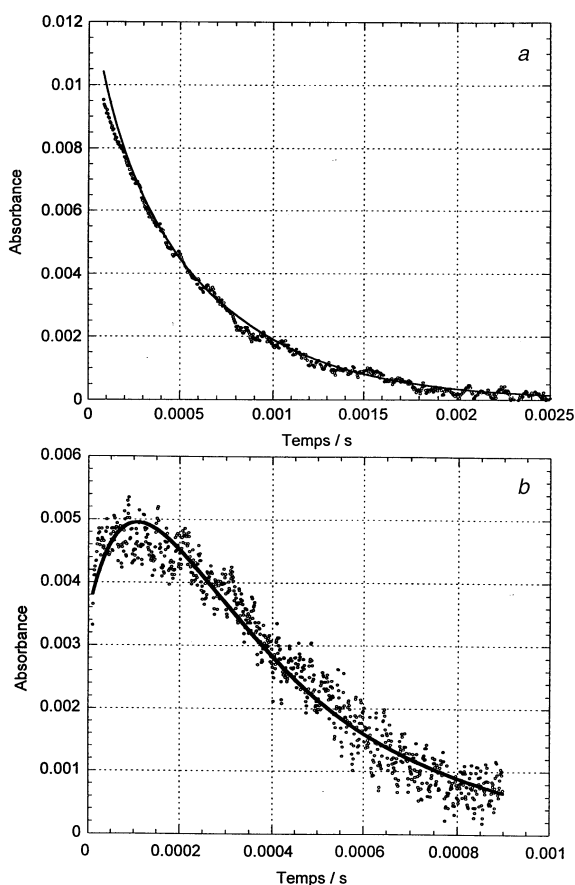
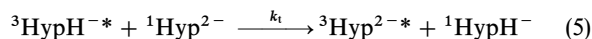
pH	$\alpha/\text{s}^{-1}$	$\beta/\text{s}^{-1}$	A	B	A'	B'
5	$4 \times 10^5$	1100	<0,1	1	<0,1	1
6	$4 \times 10^4$	1200	<0,1	1	<0,1	1
7	8300	1600	0,20	0,80	-0,3	1,3
8	4000	2300	0,36	0,64	-1,6	2,6
9	3200	2700	0,37	0,63	-6,1	7,1
10	3600	3000	1	<0,1	-7	8
11	6500	3000	1	<0,1	-2,1	3,1
11,5	10100	3000	1	<0,1	-1,5	2,5

<sup>a</sup> Les paramètres ci-dessus ont été calculés à partir des constantes de vitesse des processus indiqués sur le Schéma 2:  $k_T = 1100 \text{ s}^{-1}$ ;  $k'_T = 3000 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_d^0 = 1800 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_p = 4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  et  $k_i = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .



**Fig. 5** Variation des paramètres cinétiques  $\alpha$  et  $\beta$  (relation 1) en fonction du pH. En pointillé: évolution théorique de  $\alpha$  en l'absence de transfert de protons sur le dianion (réaction 5).

modèle cinétique représenté par le Schéma 2 avec les constantes de vitesse données prévoit un paramètre  $\alpha$  qui tendrait vers une valeur finie de  $2900 \text{ s}^{-1}$  (Fig. 5). L'expérience montre au contraire une augmentation rapide de  $\alpha$  (Tableau 1) lorsque le pH croît. Ce comportement est interprété (voir la discussion) à l'aide d'une réaction supplémentaire dont le rôle sur la désactivation de l'état triplet augmente en même temps que la concentration de  $^1\text{Hyp}^{2-}$  lors du déplacement de l'équilibre acide-base dans l'état fondamental ( $\text{p}K_a = 11,5$ ):



**Fig. 6** Courbes théoriques (relations 2 et 4) obtenues à l'aide des paramètres du Tableau 1 et points expérimentaux des cinétiques de l'absorbance transitoire d'une dispersion micellaire d'hypéricine: (a) pour  $\text{pH} = 7$  à  $520 \text{ nm}$ ; (b) pour  $\text{pH} = 11,5$  à  $630 \text{ nm}$ .

Cette réaction, ajoutée à celles du Schéma 2, se traduit par une augmentation de la constante de vitesse de déprotonation:

$$k_d = k_d^0 + k_t[\text{Hyp}^{2-}] \quad (6)$$

qui rend compte des valeurs expérimentales avec  $k_t = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ .

La réaction (5) ajoutée au Schéma 2 conduit à une variation de la concentration du dianion dans l'état fondamental:

$$z - z_0 = k_t z_0 x_0 \frac{e^{-\alpha t}}{\alpha} + k'_t x_0 \frac{k_d}{\sqrt{m}} \left( \frac{1}{\alpha} e^{-\alpha t} - \frac{1}{\beta} e^{-\beta t} \right) \quad (7)$$

qui remplace la relation (3). L'absorbance différentielle peut donc être exprimée à l'aide de la même expression (4) que précédemment avec:

$$A' = A - \frac{k_d}{\sqrt{m}} \frac{\Delta \epsilon_B}{\epsilon_A^*} \quad (8a)$$

$$B' = B + \frac{k_d}{\sqrt{m}} \frac{\Delta \epsilon_B}{\epsilon_A^*} \quad (8b)$$

où  $\Delta \epsilon_B = \epsilon_B^* - \epsilon_B$ . Ces relations permettent de calculer des valeurs limites de  $A'$  et  $B'$  lorsque le pH atteint sa valeur maximum mais dans tout le domaine considéré ( $\text{pH} \geq 9$ ) l'écart théorique entre les paramètres exacts et ces valeurs limites est inférieur à l'incertitude des mesures.

Dans le Tableau 1 sont rassemblés les paramètres cinétiques de l'évolution au cours du temps de l'absorption transitoire d'une dispersion micellaire d'hypéricine en fonction du pH, observée à  $520$  et  $630 \text{ nm}$  selon les relations (2) et (4). Ces paramètres ont été calculés à l'aide des relations (1) et (6) avec les constantes de vitesse portées sur le Tableau 1. Ces constantes ont été déterminées en considérant deux domaines de pH pour lesquels le comportement cinétique des espèces excitées est très différent. A  $\text{pH} \leq 6$  la décroissance de l'absorbance à toutes longueurs d'onde est pratiquement monoexponentielle avec une constante de vitesse  $\beta = k_T$ . A  $\text{pH} \geq 9$  la forme basique excitée  $^3\text{Hyp}^{2-*}$  apparaît en concentration notable et l'évolution de l'absorbance à  $630 \text{ nm}$  est biexponentielle. Le paramètre  $\beta$  pour les valeurs les plus élevées du pH correspond à la désactivation de la forme basique et tend vers la constante  $k'_T$ . Par exemple, à  $\text{pH} = 11,5$ , après la désactivation totale de la forme acide  $^3\text{HypH}^{-*}$  ( $t > 300 \mu\text{s}$ ), la décroissance de l'absorbance est monoexponentielle avec une constante de vitesse  $\beta = k'_T$ . Dans le même domaine de pH, l'évolution de l'absorbance observée à  $520 \text{ nm}$  est monoexponentielle avec une constante de vitesse  $\alpha = k_d + k_T$ . Ainsi pour les valeurs de pH extrêmes où la constante de vitesse de protonation  $k_p$  est soit beaucoup plus grande soit beaucoup plus petite que les autres constantes de vitesse, les valeurs de  $k_T$ ,  $k'_T$  et  $k_d$  ont pu être obtenues.

La constante  $k_p$  a été ensuite ajustée de façon à obtenir une évolution théorique de l'absorbance conforme à l'évolution expérimentale pour  $\text{pH} = 7$  ou  $8$  lorsque  $k_p$  a une valeur du même ordre que celles des autres constantes de vitesse. La valeur expérimentale de la constante de vitesse de protonation des espèces basiques,  $k_p = 4 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , est en bon accord avec les valeurs obtenues par différents auteurs en ce qui concerne par exemple des dérivés des 1- et 2-naphtol,<sup>53</sup> du naphthalène,<sup>54</sup> de l'acide benzoïque, de nitrophénols, de l'acétylacétone et de l'acide urique.<sup>55</sup>

Comme indiqué précédemment la simulation des courbes d'évolution de l'absorbance à l'aide des paramètres du Tableau 1 conduit à une très bonne concordance avec les courbes expérimentales (Fig. 6) aussi bien à  $520 \text{ nm}$  (relation 2) qu'à  $630 \text{ nm}$  (relation 4). Cet accord a été réalisé en choisissant une valeur du rapport  $\Delta \epsilon_B / \epsilon_A^* = 2 \pm 0,1$  (relations 8), ce qui permet de déduire que  $\epsilon_B^* = 42\,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## Discussion

Nous examinons ici les différentes hypothèses permettant d'interpréter la variation de la vitesse de désactivation du premier état triplet de l'hypéricine en fonction du pH.

### Rôle de l'équilibre $\text{HypH}_2/\text{HypH}^-$

Dans l'étude cinétique qui précède l'hypéricine dans l'état fondamental se trouve soit sous forme neutre soit sous forme monoanionique selon le pH. Ainsi la question se pose de savoir si les changements cinétiques observés ne pourraient pas être influencés ou même provoqués par l'évolution de l'équilibre acide-base  $\text{HypH}_2/\text{HypH}^-$ . L'analyse des résultats montre que le déplacement de cet équilibre ( $\text{p}K_a = 7$ ) en fonction du pH n'a aucune influence notable sur les propriétés prototypiques du premier état excité triplet. En effet les variations des paramètres cinétiques  $\alpha$  et  $\beta$  ne présentent aucune discontinuité pour la valeur particulière  $\text{pH} = 7$  (Fig. 5) et la vitesse de désactivation de l'état triplet qui augmente à partir de  $\text{pH} = 6$  continue de croître lorsque  $\text{pH} \geq 8$ , valeur au-delà de laquelle la forme neutre  $\text{HypH}_2$  a disparu. De plus le spectre d'absorption triplet-triplet enregistré immédiatement après l'éclair d'excitation ( $t \leq 100 \mu\text{s}$ ) reste identique dans tout le domaine de pH exploré de même que le rendement quantique de formation de l'état triplet. Ces observations confirment les études ayant établi que  $\text{HypH}_2$  et  $\text{HypH}^-$  possèdent en solution des propriétés électroniques extrêmement voisines,<sup>30,43</sup> si bien que les travaux de Altmann et Falk<sup>46</sup> concernant cette question amènent ces auteurs à considérer qu'en solution, dans le domaine  $3 < \text{pH} < 10$ , seule la forme monoanionique existe.

### Rôle des anions ou des protons

Une extinction du premier état triplet de l'hypéricine par les anions de la solution tampon mettant en jeu un transfert d'électron et la formation du radical-anion de l'hypéricine est envisageable.<sup>56</sup> Cependant, cette hypothèse est à écarter car l'absorption caractéristique du radical anion à  $735 \text{ nm}$ <sup>29</sup> n'a pas été observée et aucune corrélation entre les paramètres cinétiques de l'extinction et la concentration en anions de la solution tampon n'a pu être mise en évidence. Par exemple, à  $\text{pH} = 5$  [anions] =  $0,296 \text{ M}$  et à  $\text{pH} = 10$  pour lequel la durée de vie de l'état triplet est beaucoup plus courte [anions] =  $0,144 \text{ M}$ .

Pareillement une extinction par les ions  $\text{H}_3\text{O}^+$ <sup>57,58</sup> est très improbable pour deux raisons au moins: la première est que la concentration  $[\text{H}_3\text{O}^+]$  au delà de  $\text{pH} = 7$  est trop faible pour que l'extinction par ces ions entre en compétition avec les autres voies de désactivation de l'état triplet;<sup>58</sup> la deuxième est que la vitesse de désactivation du premier état triplet croît avec le pH, c'est à dire varie en sens inverse de ce qui est attendu pour ce processus d'extinction.

### Déprotonation photoinduite de l'hypéricine

L'accroissement de la vitesse d'extinction du premier état triplet de l'hypéricine lorsque le pH augmente ne peut donc être provoqué que par une déprotonation qui intervient majoritairement ou totalement à partir de la forme monoanionique de l'hypéricine  $\text{HypH}^-$  et concerne donc un site hydroxyle voisin d'un groupement carbonyle.<sup>41</sup> L'équilibre acide-base dans l'état triplet est caractérisé par la constante  $K_a^* = k_a^0/k_p$ , soit  $\text{p}K_a^* = 7,35 \pm 0,15$ . La constante de vitesse de la protonation  $k_p$  étant déterminée à partir d'une cinétique de désactivation observée à  $\text{pH} = 7$ , la valeur de  $\text{p}K_a^*$  est donc calculée dans le cas d'une phase aqueuse dont la force ionique est  $0,067 \text{ M}$ .

En outre la déprotonation photoinduite de l'hypéricine est adiabatique et respecte la règle de conservation du spin. Si ce

n'était pas le cas la déprotonation se produirait selon la réaction  $^3\text{HypH}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow ^1\text{Hyp}^{2-} + \text{H}_3\text{O}^+$  qui serait irréversible. Par conséquent, contrairement à ce qui est observé, la variation de pH n'aurait aucune influence sur la vitesse de désactivation de l'état triplet et modifierait par contre la constante de vitesse  $k_T$  qui correspondrait alors à la protonation du dianion.

Dans l'exposé des résultats, il a été indiqué que l'excitation directe de l'état fondamental  $^1\text{Hyp}^{2-}$  ne permettait pas de peupler le premier état triplet de ce dianion ( $\Phi_T < 0,01$ ), ainsi la déprotonation photoinduite de l'hypéricine semble être la seule voie de formation de cette espèce excitée dans les conditions expérimentales de ce travail. Par ailleurs le rendement quantique de fluorescence de la forme basique  $^1\text{Hyp}^{2-}$  est relativement faible ( $\Phi_F = 0,023^{41}$ ). Ces deux constatations montrent l'existence d'une voie de désactivation rapide du premier état singulet excité du dianion qui pourrait être un transfert intramoléculaire de proton ou d'hydrogène comme dans le cas de l'hypéricine neutre mais avec des conséquences différentes.<sup>34-36</sup>

### Extinction du premier état triplet du monoanion de l'hypéricine par son dianion dans l'état fondamental

L'accélération de la désactivation du monoanion dans le premier état triplet lorsque le pH dépasse la valeur 10 (Fig. 5) est interprété par l'intervention de la réaction (5). Celle-ci représente à la fois un transfert de proton et un transfert d'énergie qui sont ici thermodynamiquement équivalents. La voie non adiabatique de l'extinction  $^3\text{HypH}^- + ^1\text{Hyp}^{2-} \rightarrow ^1\text{HypH}^- + ^1\text{Hyp}^{2-}$  ne permet pas quant à elle de rendre compte des résultats des mesures qui montrent clairement la formation d'une espèce transitoire.

Ainsi nous avons montré que la cinétique de déprotonation du monoanion dans le premier état triplet obéit à la relation (6) avec une constante d'extinction par le dianion  $k_t = 3 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  dont la valeur est divisée par deux par rapport à la constante de diffusion en milieu aqueux ( $k_{\text{diff}} = 6,4 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ). Dans les conditions de nos expériences, une molécule d'hypéricine qui comporte des groupements hydrophiles et une partie hydrocarbonée hydrophobe occupe vraisemblablement une position excentrée dans une micelle hôte. Un transfert intermoléculaire de proton ou d'énergie interviendrait donc au cours d'un choc entre deux micelles occupées mais l'efficacité du transfert serait plus ou moins importante selon la position relative des deux molécules concernées. De la même manière nous avons expliqué auparavant<sup>52</sup> la plus faible efficacité de l'annihilation triplet-triplet en milieu micellaire ( $k_{\text{TT}} = 6,4 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) par rapport à un milieu homogène. Dans le cas présent ce dernier processus est négligeable compte tenu de la concentration de l'hypéricine dans l'état triplet ( $\leq 6 \times 10^{-7} \text{ M}$ ).

L'hypéricine dans le premier état triplet étant plus acide que dans l'état fondamental, l'enthalpie libre de la réaction (5) est négative:  $\Delta G^0 = -RT(\ln K_a^* - \ln K_a)$ . Un cycle de Förster<sup>42</sup> appliqué à ce système permet une évaluation de l'énergie du premier état triplet du dianion par rapport à son état fondamental (Schéma 3):  $\bar{\nu} - \bar{\nu}^* \approx 2,3kT(\text{p}K_a - \text{p}K_a^*)/hc \approx 2000 \text{ cm}^{-1}$ . Connaissant le nombre d'onde de la transition  $^3\text{HypH}^- \rightarrow ^1\text{HypH}^-$  ( $\bar{\nu} = 13250 \text{ cm}^{-1}$ <sup>36</sup>), celui de la tran-

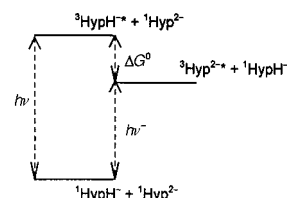


Schéma 3 Cycle de Förster appliqué à l'extinction du premier état triplet de l'hypéricine par son dianion à  $\text{pH} > 10$

sition  ${}^3\text{Hyp}^{2-*} \rightarrow {}^1\text{Hyp}^{2-}$ , qui n'a pas pu être mesuré, est donc approximativement  $\bar{\nu} = 11\,250\text{ cm}^{-1}$ .

## Conclusion

La déprotonation photoinduite de l'hypéricine a été souvent évoquée, au cours des cinq dernières années,<sup>31–33</sup> pour interpréter certaines de ses propriétés photobiologiques, en particulier son activité antivirale.

Pour la première fois les expériences décrites dans ce mémoire mettent en évidence cette déprotonation lorsque la molécule d'hypéricine est excitée dans son premier état triplet. Par rapport à l'état fondamental le passage au premier état excité triplet provoque une augmentation sensible de l'acidité:  $\text{p}K_a^* = 7,35$  relativement à  $\text{p}K_a = 11,5$ . Une constatation analogue avait été faite pour le premier état excité singulet:  $\text{p}K_a^* = 8,3$ .<sup>41</sup>

Cependant la vitesse de la déprotonation ( $k_d = 1800\text{ s}^{-1}$ ) devrait être en général plus faible que celle des autres voies de désactivation de l'état triplet en milieu biologique et il serait donc exagéré d'écrire que l'hypéricine provoque une acidification du milieu sous l'effet d'une excitation lumineuse comme cela a été quelque fois avancé.

Par contre l'observation d'un transfert intermoléculaire de proton entre l'hypéricine monoanionique dans l'état triplet et son dianion dans l'état fondamental qui a été caractérisé ici montre que l'hypéricine peut efficacement provoquer une protonation photoinduite d'un site basique placé à proximité. Une conclusion analogue a été tirée d'expériences récentes réalisées par l'équipe de Petrich<sup>31,32</sup> à l'aide de sondes moléculaires fluorescentes.

## Bibliographie

- 1 A. C. Giese, *Photochem. Photobiol. Rev.*, 1980, **5**, 229.
- 2 N. Duran et P. S. Song, *Photochem. Photobiol.*, 1986, **43**, 677.
- 3 Z. Diwu, *Photochem. Photobiol.*, 1995, **61**, 529.
- 4 P. Jardon, N. Lazorchak et R. Gautron, *J. Chim. Phys.*, 1987, **84**, 1141.
- 5 H. Racinet, P. Jardon et R. Gautron, *J. Chim. Phys.*, 1988, **85**, 971.
- 6 H. Bouirig, D. Eloy et P. Jardon, *J. Chim. Phys.*, 1992, **89**, 1391.
- 7 A. P. Darmanyan, L. Burel, D. Eloy et P. Jardon, *J. Chim. Phys.*, 1994, **91**, 1774.
- 8 (a) H. Racinet et P. Jardon, *XII IUPAC Symposium on Photochemistry*, Bologne, Italie, 1988, p. 171. (b) H. Racinet et P. Jardon, *Congrès de Recherche Dermatologique*, Grenoble, France, 1988, p. 58.
- 9 C. Hadjur, M. J. Richard, M. O. Parat, P. Jardon et A. Favier, *Photochem. Photobiol.*, 1996, **64**, 375.
- 10 C. Hadjur, M. J. Richard, M. O. Parat, A. Favier et P. Jardon, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1995, **27**, 139.
- 11 Z. Diwu et J. W. Lown, *Photochem. Photobiol.*, 1990, **52**, 609.
- 12 C. Thomas et R. S. Pardini, *Photochem. Photobiol.*, 1992, **55**, 831.
- 13 C. Thomas, R. S. MacGill, G. C. Miller et R. S. Pardini, *Photochem. Photobiol.*, 1992, **55**, 47.
- 14 P. Miskovsky, F. Sureau, L. Chinsky et P. Y. Turpin, *Photochem. Photobiol.*, 1995, **62**, 546.
- 15 A. L. Vandenberg, E. M. Delaey, A. M. Vantieghem, B. E. Himpens, W. J. Merlevede et P. A. de Witte, *Photochem. Photobiol.*, 1998, **67**, 119.
- 16 K. Das, A. V. Smirnov, J. Wen, P. Miskovsky et J. W. Petrich, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **69**, 633 et références incluses.
- 17 D. Meruelo, G. Lavie et D. Lavie, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1988, **85**, 5230.
- 18 G. Lavie, F. Valentine, B. Levin, Y. Mazur, G. Gallo, D. Lavie, D. Weiner et D. Meruelo, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1989, **86**, 5963.
- 19 D. Lavie, M. Revel, D. Rotman and V. VandeVelde, *Brevet Européen n° 256452*, 1987.
- 20 I. Lopez-Bazzocchi, J. B. Hudson et G. H. N. Towers, *Photochem. Photobiol.*, 1991, **54**, 95.
- 21 G. A. Kraus, W. Zhang, M. J. Fehr, J. W. Petrich, Y. Wannemuehler et S. Carpenter, *Chem. Rev.*, 1996, **96**, 523.
- 22 J. Lenard, A. Rabson et R. Vanderloef, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 158.
- 23 E. B. Walker, T. Y. Lee et P. S. Song, *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, **587**, 129.
- 24 A. C. Giese, *The Biology of a Light Sensitive Protozoa*, Stanford University Press, Stanford, CA, 1973.
- 25 M. J. Fehr, S. L. Carpenter et J. W. Petrich, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 1994, **4**, 1339.
- 26 L. Weiner et Y. Mazur, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 2*, 1992, 1439.
- 27 C. Hadjur, A. Jeunet et P. Jardon, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1994, **26**, 67.
- 28 C. Hadjur et P. Jardon, *J. Photochem. Photobiol. B*, 1995, **29**, 147.
- 29 A. P. Darmanyan, W. S. Jenks, D. Eloy et P. Jardon, *J. Phys. Chem.*, 1999, **103**, 3323.
- 30 L. Burel, P. Jardon et J.-C. Lepretre, *New J. Chem.*, 1997, **21**, 399.
- 31 M. J. Fehr, M. A. McCloskey et J. W. Petrich, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 1833.
- 32 M. J. Fehr, S. L. Carpenter, Y. Wannemuehler et J. W. Petrich, *Biochemistry*, 1995, **34**, 15845.
- 33 F. Sureau, P. Miskovsky, L. Chinsky et P. Y. Turpin, *J. Am. Chem. Soc.*, 1996, **118**, 9484.
- 34 K. Das, E. Dertz, J. Paterson, W. Zhang, G. A. Kraus et J. W. Petrich, *J. Phys. Chem. B*, 1998, **102**, 1479 et références incluses.
- 35 S. M. Arabei, J. P. Galaup et P. Jardon, *Chem. Phys. Lett.*, 1995, **232**, 127.
- 36 S. M. Arabei, J. P. Galaup et P. Jardon, *Chem. Phys. Lett.*, 1997, **270**, 31.
- 37 S. M. Arabei, T. A. Pavich, J. P. Galaup et P. Jardon, *Chem. Phys. Lett.*, 1999, **306**, 303.
- 38 A. V. Smirnov, K. Das, D. S. English, Z. Wan, G. A. Kraus et J. W. Petrich, *J. Phys. Chem.*, 1999, **103**, 7949.
- 39 L. H. Pinto, L. J. Holsinger et R. A. Lamb, *Cell*, 1992, **69**, 517.
- 40 K. J. Newell, P. Wood, I. Stratford et I. Tannock, *Br. J. Cancer*, 1992, **66**, 311.
- 41 D. Eloy, A. Le Pellec et P. Jardon, *J. Chim. Phys.*, 1996, **93**, 442.
- 42 T. Förster, *Z. Elektrochem.*, 1950, **50**, 42 et 531.
- 43 F. Gerson, G. Gescheidt, P. Häring, Y. Mazur, D. Freeman, H. Spreitzer et J. Daub, *J. Am. Chem. Soc.*, 1995, **117**, 11861.
- 44 D. Freeman, F. Frolov, E. Kapinus, D. Lavie, G. Lavie, D. Meruelo et Y. Mazur, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1994, 891.
- 45 T. Yamazaki, N. Ohta, I. Yamazaki et P. S. Song, *J. Phys. Chem.*, 1993, **97**, 7870.
- 46 R. Altmann et H. Falk, *Monatsh. Chem.*, 1997, **128**, 571.
- 47 M. Mylrajan, P. Hildebrandt et Y. Mazur, *J. Mol. Struct.*, 1997, **407**, 5.
- 48 H. Falk, J. Meyer et M. Oberreiter, *Monatsh. Chem.*, 1993, **124**, 339.
- 49 B. Ehrenberg, J. L. Anderson et C. S. Foote, *Photochem. Photobiol.*, 1998, **68**, 135.
- 50 A. Weller, *Z. Physik. Chem.*, 1958, **15**, 438.
- 51 D. M. Rayner et P. A. H. Wyatt, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 1*, 1974, **70**, 945.
- 52 P. Jardon et R. Gautron, *J. Chim. Phys.*, 1989, **86**, 2173.
- 53 J. L. Rosenberg et I. Brinn, *J. Phys. Chem.*, 1972, **76**, 3559.
- 54 A. R. Watkins, *Z. Phys. Chem. (Munich)*, 1971, **75**, 327.
- 55 M. Eigen, W. Kruse, G. Maass et L. De Maeyer, *Prog. React. Kinet.*, 1964, **2**, 285.
- 56 H. Shizuka, N. Nakamura et T. Morita, *J. Phys. Chem.*, 1980, **84**, 989.
- 57 K. Tsutsumi et H. Shizuka, *Chem. Phys. Lett.*, 1977, **52**, 485.
- 58 H. Shizuka, *Acc. Chem. Res.*, 1985, **18**, 141.