

ÉTUDE DE L'INHIBITION DE LA FLUORESCENCE DE DIVERSES AMINO-9 ACRIDINES PAR LES ACIDES AMINÉS

ALAIN MARTY, JEAN VIGO et PIERRE VIALLET

Laboratoire de Chimie Physique, Université de Perpignan, Avenue de Villeneuve, 66025 Perpignan (France)

(Reçu le 24 novembre 1980; révisé le 3 mars 1981)

Résumé

L'addition de tryptophane ou d'histidine à des solutions aqueuses ou hydroalcooliques de diverses amino-9 acridines provoque une diminution de l'intensité de fluorescence de ces fluorophores.

Pour les aminoacridines dont la durée de vie de fluorescence est suffisamment longue, l'extinction de la fluorescence se produit à la fois par un processus dynamique et par un processus statique lorsque l'inhibiteur est le tryptophane. L'extinction de fluorescence se produit uniquement par un processus dynamique lorsque l'inhibiteur est l'histidine.

Pour les aminoacridines dont la durée de vie de fluorescence est courte, l'inhibition de la fluorescence se produit uniquement par un processus statique.

Il semble que, dans le cadre de cette étude, le phénol puisse représenter la tyrosine. Cet acide aminé aurait alors un comportement analogue à celui du tryptophane.

Les processus statiques sont interprétés sous forme de complexation dans l'état fondamental. Les processus dynamiques sont contrôlés par diffusion.

Summary

The addition of tryptophan or histidine to aqueous or water-alcohol solutions of some substituted 9-aminoacridines results in a decrease in the intensity of the fluorescence of these fluorophores.

Depending on the lifetime of the fluorescence of the acridines, the quenching process by tryptophan is either a static process alone or, when the lifetime is sufficiently long, a mixture of static and dynamic processes. A dynamic process alone is involved when histidine is used as a quencher. As long as phenol can be supposed to mimic tyrosine, this amino acid seems to have the same kind of effect as tryptophan.

The dynamic processes are found to be diffusion controlled and the static processes are interpreted in terms of complexation in the ground state.

1. Introduction

Les techniques de spectrofluorimétrie sont souvent utilisées pour étudier les interactions entre molécules fluorescentes et macromolécules biologiques telles que protéines ou acides nucléiques.

C'est ainsi que d'intéressantes propriétés d'ordre biologique présentées par des dérivés de l'acridine (proflavine, acridine orange ou amino-9 acridine) ont été mises en évidence, en particulier leur aptitude à former des interactions spécifiques avec l'acide désoxyribonucléique et quelques nucléotides [1 - 4].

Récemment plusieurs études ont eu pour thème les interactions entre certaines macromolécules biologiques ou certains composants cellulaires et la (*N,N*-diéthylamino-4' méthyl-1' *n*-butylamino)-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (communément appelée atébrine) ou des composés voisins, en raison de l'intérêt biologique de ce type de substances [5 - 8].

Dans un travail précédent [9, 10] nous avons montré que l'acridine, l'acridine-9-amino et l'acridine-9-amino-2-méthoxy-6-chloro (qui peut être considéré comme un modèle simplifié de l'atébrine) s'associent à la sérum albumine humaine pour former un complexe de type 1:1.

Pour ces trois acridines, qui toutes possèdent un groupement amino en position 9, l'ensemble des résultats relatifs à cette association présente de fortes analogies.

Dans le but d'obtenir des renseignements sur le site actif de la protéine et sur le rôle joué par les différents substituants du cycle acridine, nous avons entrepris une étude systématique des interactions entre les divers acides aminés et l'ensemble des molécules représentées sur la Fig. 1.

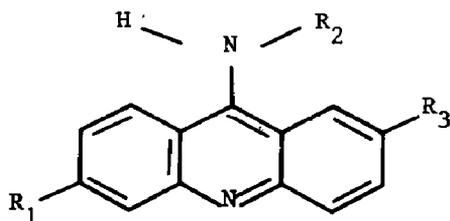


Fig. 1. Dérivés de l'acridine: amino-9 acridine (9 AA), $R_1 = H$, $R_2 = H$, $R_3 = H$; amino-9 chloro-6 acridine (ACA), $R_1 = Cl$, $R_2 = H$, $R_3 = H$; amino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (ACMA), $R_1 = Cl$, $R_2 = H$, $R_3 = OCH_3$; *n*-éthylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (ECMA), $R_1 = Cl$, $R_2 = C_2H_5$, $R_3 = OCH_3$; *n*-butylamino-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (BCMA), $R_1 = Cl$, $R_2 = (CH_2)_3CH_3$, $R_3 = OCH_3$; (*N,N*-diéthylamino-4' méthyl-1' *n*-butylamino)-9 méthoxy-2 chloro-6 acridine (atébrine), $R_1 = Cl$, $R_2 = CH(CH_3)(CH_2)_3N(C_2H_5)_2$, $R_3 = OCH_3$.

2. Partie expérimentale

Les différents acides aminés essayés comme inhibiteurs de fluorescence (D,L-alanine, L-arginine, L-cystéine, D-glutamine, D,L-lysine, D,L-phénylalanine, D,L-proline, D,L-histidine, D,L-tryptophane) ainsi que l'indole, le

7-azaindole, l'imidazole et le phénol sont tous des produits commerciaux et ont été utilisés sans purification supplémentaire.

La 9 AA et l'atébrine sont également des produits commerciaux (Fluka et Sigma respectivement). Les autres produits fluorescents ont été synthétisés et purifiés au Laboratoire du Docteur Pierre Jacquignon (Institut des Substances Naturelles, Gif sur Yvette).

Lorsque les deux substances en présence sont suffisamment solubles dans l'eau, nous travaillons en solution purement aqueuse tamponnée à pH 7. Dans le cas où l'un des deux composés n'est pas soluble dans l'eau, nous utilisons des solutions hydroalcooliques également tamponnées à pH 7 (10% ou 20% d'éthanol selon le cas).

La solution tampon pH 7 utilisée (commercialisée par Merck) est composée d'un mélange de phosphate de potassium et de phosphate de sodium.

La molarité des solutions est de l'ordre de 10^{-5} - 5×10^{-5} mol l⁻¹. Pour de telles concentrations en produit, l'intensité de fluorescence est directement proportionnelle à la concentration.

Les spectres de fluorescence ont été enregistrés à l'aide d'un spectrofluorimètre Safas 1800 dont le bloc d'excitation est constitué par une lampe xénon haute pression Osram XBO 450 W associée à un monochromateur à réseau; la stabilité de la lampe est contrôlée en cours de manipulations. Pour chaque produit, la longueur d'onde d'excitation (entre 430 et 400 nm) est choisie dans la première bande du spectre d'excitation (bande de plus forte intensité).

Pour les mesures de durée de vie, la fluorescence est excitée par un laser à azote (Avco 3000) et envoyée sur un photomultiplicateur (IP 28 de RCA) relié à un oscillographe à échantillonnage couplé avec un enregistreur UV rapide.

Les mesures de durée de vie et d'intensité de fluorescence sont effectuées à la température ambiante (25 °C) sur les mêmes solutions saturées en oxygène.

3. Méthode

Si, à une solution de l'un des produits étudiés, on ajoute des quantités croissantes de certains acides aminés, en conservant constante la concentration en produit, on constate une diminution de l'intensité de la fluorescence sans modification du spectre.

La Fig. 2 illustre l'effet de l'addition de tryptophane à une solution d'ACA.

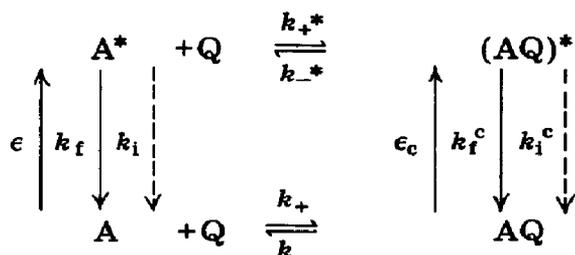
Au pH auquel nous travaillons (pH 7) tous les composés étudiés sont sous forme de monocation [11, 12]. Comme, d'une part, nous utilisons des solutions tamponnées et comme, d'autre part, l'addition d'acide aminé provoque uniquement une extinction de la fluorescence sans aucun déplacement du spectre, cette addition ne peut provoquer une simple réaction de protonation ou de déprotonation de la molécule considérée.



Fig. 2. Inhibition de la fluorescence d'une solution d'ACA (10^{-5} M; solvant, 10% éthanol-90% eau) par l'histidine. La longueur d'onde d'excitation est $\lambda = 400$ nm.

En effet, dans le cas de la 9 AA et de l'ACA, les spectres de fluorescence émis par les formes protonées et déprotonées se situent à des longueurs d'onde bien distinctes [10, 13]. Dans le cas des autres molécules l'intensité de fluorescence de la forme déprotonée est, dans nos conditions expérimentales, supérieure à celle de la forme protonée. Dans tous les cas les deux spectres de fluorescence, forme acide et forme basique, sont excités à 400 nm.

Si l'action de l'acide aminé peut être exprimée en terme d'association moléculaire, l'inhibition de la fluorescence des diverses molécules peut être examinée sur la base du processus suivant:



L'acide aminé Q peut réagir avec A (molécule fluorescente) pour former le complexe AQ dans l'état électronique fondamental; cet acide aminé peut aussi réagir avec la molécule A^* dans son premier état singulet

excité pour former le complexe AQ^* dans l'état excité. A ces complexes respectifs peuvent être associées les constantes de stabilité:

$$K_g = \frac{k_+}{k_-}$$

et

$$K_e = \frac{k_+^*}{k_-^*}$$

Dans le schéma ci-dessus ϵ et ϵ_e représentent les coefficients d'extinction molaire de la molécule A et du complexe AQ , k_f et k_f^c les constantes de désactivation par fluorescence et k_i et k_i^c les constantes de désactivation non radiatives des espèces excitées A^* et AQ^* .

Dans les conditions expérimentales choisies l'acide aminé Q n'est pas excité. Le spectre d'absorption ne subit aucune modification même en présence d'un fort excès d'acide aminé; par conséquent $\epsilon = \epsilon_e$ quelle que soit la longueur d'onde excitatrice.

Les mesures de durée de vie montrent que la décroissance de la fluorescence reste monoexponentielle quelle que soit la quantité d'acide aminé ajoutée. Comme d'autre part, le spectre de fluorescence ne subit aucun déplacement; il semble que le rendement quantique de la molécule liée soit dans tous les cas nul ou négligeable par rapport à celui de la molécule libre. Dans un tel cas de forte inhibition plusieurs auteurs [14, 15] ont montré que la variation de l'intensité de fluorescence pouvait s'exprimer en fonction de la concentration [Q] en acide aminé par la relation

$$\frac{I_Q}{I_0} = \frac{\alpha}{1 + k_+^* \tau_0 [Q]}$$

I_Q et I_0 étant respectivement l'intensité de la fluorescence mesurée en présence et en absence d'inhibiteur et $\alpha = [A]/[A]_0$ représentant la fraction de molécules A non complexées.

Deux cas doivent alors être considérés.

(1) Il n'y a pas d'interaction dans l'état fondamental, donc $\alpha = 1$ quelle que soit la concentration en acide aminé. L'extinction de la fluorescence vérifie la loi de Stern-Volmer [16]:

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + k_+^* \tau_0 [Q]$$

(2) Il se produit une interaction dans l'état fondamental, comme

$$\alpha = \frac{1}{1 + K_g [Q]}$$

On a donc

$$\frac{I_0}{I_Q} = (1 + K_g [Q])(1 + k_+^* \tau_0 [Q])$$

et la loi de Stern-Volmer n'est vérifiée que si $k_+^* = 0$ alors

$$\frac{I_0}{I_Q} = 1 + K_g[Q]$$

Pour obtenir la valeur de la constante k_+^* nous avons mesuré la durée de vie de chaque produit en absence (τ_0) et en présence (τ_Q) d'inhibiteur. Comme

$$\tau_0 = \frac{1}{k_f + k_i}$$

et

$$\tau_Q = \frac{1}{k_f + k_i + k_+^*[Q]}$$

il existe donc une relation linéaire entre τ_0/τ_Q et $[Q]$:

$$\frac{\tau_0}{\tau_Q} = 1 + k_+^*\tau_0[Q]$$

Pour déterminer le processus intervenant lors de l'inhibition de la fluorescence des dérivés de l'amino-9 acridine par les acides aminés, processus statique, dynamique ou les deux à la fois, nous avons confronté nos résultats expérimentaux aux quatre relations précédentes.

4. Résultats

4.1. Interaction des aminoacridines avec l'histidine

Sur la Fig. 3 est représentée la variation de l'intensité de la fluorescence d'une solution d'ACA en fonction de la quantité d'histidine ajoutée. Dans ce cas la loi de Stern-Volmer est vérifiée. L'inhibition de la fluorescence est donc provoquée par un processus unique soit dans l'état fondamental, soit dans l'état excité ($k_+^* = 0$ ou $\alpha = 1$), et la pente (35 l mol^{-1}) de la droite $I_0/I_Q = f([Q])$ est égale soit à K_g , soit à $k_+^*\tau_0$.

Sur la même Fig. 3 est également représentée la variation de la durée de vie de la fluorescence de l'ACA en fonction de la quantité d'histidine ajoutée. On déduit la valeur $k_+^*\tau_0 = 35 \text{ l mol}^{-1}$ du graphe $\tau_0/\tau_Q = f([Q])$. L'inhibition de la fluorescence est donc uniquement due à un processus dynamique dans l'état excité ($\alpha = 1$).

La mesure de la durée de vie de fluorescence en absence d'histidine ($\tau_0 = 15 \text{ ns}$) permet d'atteindre la constante de vitesse k_+^* ($k_+^* = 2,3 \times 10^9 \text{ l mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$).

Les résultats obtenus de façon analogue pour les différents produits étudiés sont rassemblés dans le Tableau 1.

4.2. Interaction des aminoacridines avec le tryptophane

La Fig. 4 représente la variation de l'intensité de fluorescence d'une solution d'ACA en fonction de la quantité de tryptophane ajoutée. La non

TABLEAU 1

	Indole		7-Azaindole		Tryptophane		Imidazole		Histidine		Phénol	
	$k_+ \times 10^{-9}$	K_g										
9 AA	5,3	20	4,8	20	5,3	35	2,1	0	3,1	0	4,5	15
ACA	4,5	30	4,1	30	3,9	45	2,2	0	2,3	0	3,6	15
ACMA	4,0	30	4,2	20	4,6	60	0,5	0	1,4	0	3,8	10
ECMA	0	85	0	50	0	85	0	0	0	0	0	25
BCMA	0	75	0	60	0	80	0	0	0	0	0	35
Atébrine	0	40	0	25	0	70	0	0	0	0	0	25

Les constantes k_+ et K_g sont exprimées respectivement en $l \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$ et $l \text{ mol}^{-1}$. L'incertitude sur chaque valeur est d'environ 10%.

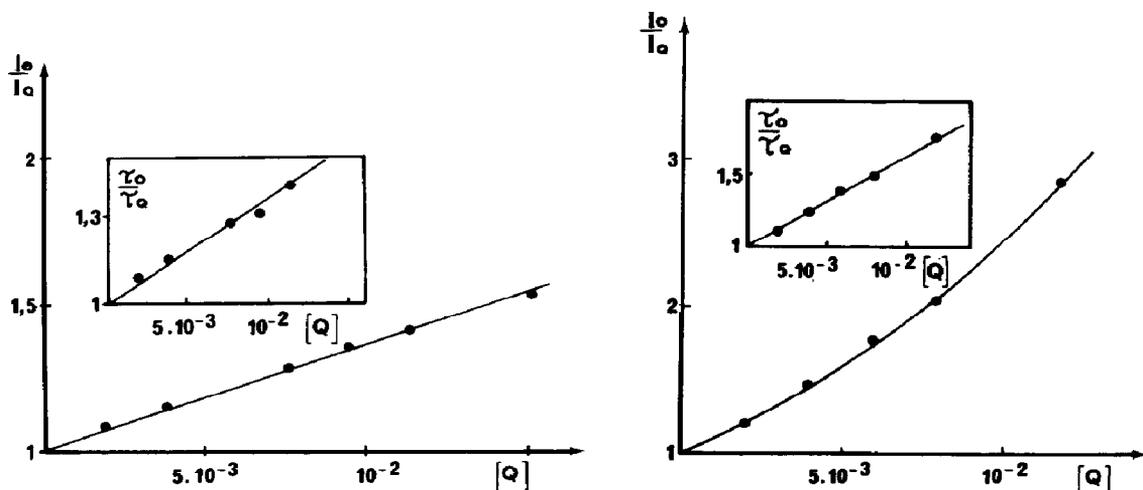


Fig. 3. Graphes représentant les variations de l'intensité et de la durée de vie de fluorescence de l'ACA en fonction de la concentration en histidine (mol l^{-1}). La concentration en ACA est de 10^{-5} M (solvant, 10% éthanol-90% eau). La longueur d'onde d'excitation est $\lambda = 400$ nm; l'intensité de fluorescence est mesurée à $\lambda = 455$ nm.

Fig. 4. Graphes représentant les variations de l'intensité et de la durée de vie de fluorescence de l'ACA en fonction de la concentration en tryptophane (mol l^{-1}). La concentration en ACA est de $1,2 \times 10^{-5}$ M (solvant, 10% éthanol-90% eau). La longueur d'onde d'excitation est $\lambda = 400$ nm; l'intensité de fluorescence est mesurée à $\lambda = 455$ nm.

linéarité du graphe $I_0/I_Q = f([Q])$ indique que l'inhibition de la fluorescence se produit à partir de deux processus: un dans l'état fondamental et un dans l'état excité ($\alpha < 1$ et $k_+^* \neq 0$).

Comme d'une part

$$\frac{I_0}{I_Q} = (1 + K_g[Q])(1 + k_+^*\tau_0[Q])$$

et d'autre part

$$\frac{\tau_0}{\tau_Q} = 1 + k_+^*\tau_0[Q]$$

il vient

$$\frac{I_0}{I_Q} \frac{\tau_Q}{\tau_0} = 1 + K_g[Q]$$

Le graphe représentant la fonction $I_0\tau_Q/I_Q\tau_0 = f([Q])$ doit être une droite de pente K_g . La Fig. 5 montre la bonne linéarité des résultats expérimentaux ($K_g = 45 \text{ l mol}^{-1}$).

La même méthode nous a permis d'obtenir les résultats indiqués dans le Tableau 1 concernant les interactions entre le tryptophane, la 9 AA et l'ACMA.

L'extinction de la fluorescence des autres produits par le tryptophane vérifie la loi de Stern-Volmer (Fig. 6). Parallèlement, nous n'avons détecté

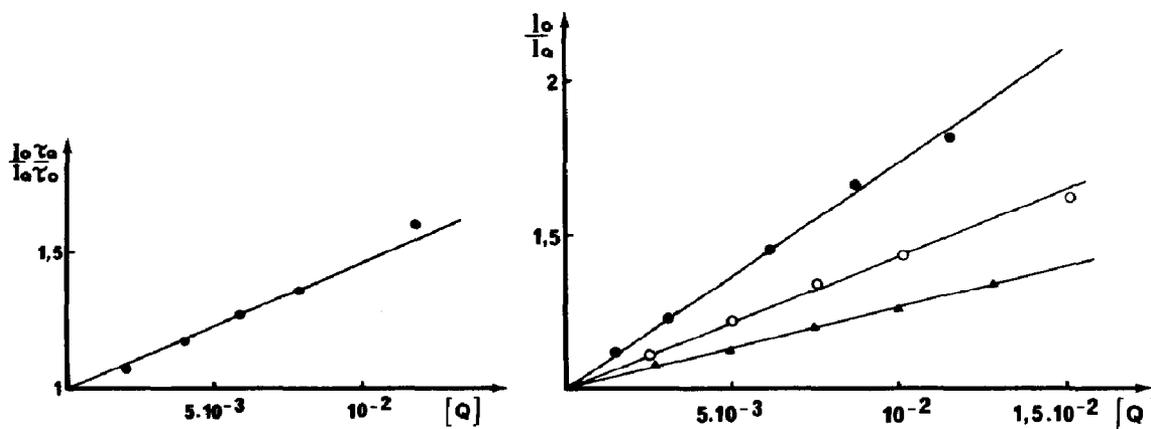


Fig. 5. Variation de la fonction $I_0\tau_Q/I_0\tau_0$ lorsqu'on ajoute des quantités croissantes de tryptophane (mol l^{-1}) à une solution d'ACA de concentration $1,2 \times 10^{-5}$ M (solvant, 10% éthanol-90% eau).

Fig. 6. Variation selon la loi de Stern-Volmer de l'intensité de fluorescence d'une solution d'atébrine (5×10^{-5} M) en fonction de la concentration en inhibiteur (mol l^{-1}): \circ , indole; \blacktriangle , 7-azaindole; \bullet , tryptophane. La longueur d'onde d'excitation est $\lambda = 420$ nm; l'intensité de fluorescence est mesurée à $\lambda = 500$ nm.

aucune variation de la durée de vie mais pour des mesures aussi courtes ($\tau \approx 4$ ns) nous approchons des limites de l'appareillage utilisé. Toutefois la linéarité du graphe $I_0/I_Q = f([Q])$ montre que même si un processus d'inhibition intervenait dans l'état excité son effet serait négligeable devant celui intervenant dans l'état fondamental.

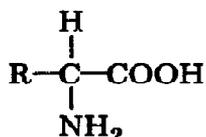
5. Discussion

Différents chercheurs ont montré que la fluorescence de plusieurs composés aromatiques (naphtalènes et indoles par exemple) subissait une extinction en présence de molécules aussi diverses que des cétones aromatiques [17], le diacétyl [18], la *N,N*-diméthylformamide [19] et diverses diènes [20] ou amines [21].

Ce sont ces résultats et la volonté d'obtenir un large éventail de renseignements sur les interactions aminoacridines-acides aminés qui nous ont conduit à étudier l'influence de tous les acides aminés suffisamment solubles dans l'eau sur la fluorescence de chacune des acridines.

L'alanine, l'arginine, la cystéine, la glutamine, la lysine, la phénylalanine et la proline sont sans effet sur la fluorescence des dérivés de l'amino-9 acridine. Seuls l'histidine et le tryptophane ont un rôle d'inhibiteur pour la fluorescence de l'ensemble ou d'une partie des composés étudiés.

Par conséquent, les techniques de spectrofluorimétrie ne permettent de mettre en évidence aucune interaction entre un acide aminé



et les divers aminoacridines lorsque le groupement R est constitué par

- une chaîne aliphatique comprenant ou non un ou plusieurs hétéroatomes;

- un cycle aromatique ne comprenant pas d'hétéroatome;
- un cycle non aromatique comprenant un hétéroatome d'azote.

Par contre, ces mêmes techniques permettent de mettre en évidence une interaction se produisant dans l'état excité et (ou) dans l'état fondamental lorsque le substituant R de l'acide aminé comprend un hétérocycle aromatique.

Il semble donc que ce soit la présence de cet hétérocycle type indole dans le cas du tryptophane ou type imidazole dans le cas de l'histidine qui soit à l'origine du phénomène observé.

Aussi avons-nous étudié la fluorescence de l'ensemble des aminoacridines en présence d'indole, de 7-azaindole et d'imidazole. Les résultats figurent dans le Tableau 1 et sont analogues à ceux observés pour le tryptophane d'une part, pour l'histidine d'autre part.

Ainsi, avec l'imidazole nous observons comme dans le cas de l'histidine uniquement une interaction avec l'état excité de la 9 AA, de l'ACA et de l'ACMA. Le fait qu'une telle interaction ne se produise pas avec les autres aminoacridines peut être rapproché de la faible durée de vie de la fluorescence de ces molécules.

Avec l'indole et le 7-azaindole nous observons, comme dans le cas du tryptophane, une interaction dans l'état fondamental et une interaction dans l'état excité de la 9 AA, de l'ACA et de l'ACMA et uniquement une interaction dans l'état fondamental avec les autres aminoacridines.

La tyrosine, pour laquelle le groupement R est composé d'un cycle benzénique substitué par un OH, n'est pas suffisamment soluble pour que son effet sur la fluorescence des produits puisse être étudié directement. Aussi après avoir vérifié que l'indole et l'imidazole ont respectivement un comportement tout à fait analogue à celui du tryptophane et de l'histidine avons-nous étudié l'influence du phénol sur la fluorescence des dérivés de l'acridine afin d'en déduire le type d'interaction qu'ils pourraient donner avec la tyrosine.

Les résultats figurant au Tableau 1 font apparaître dans le cas du phénol (et donc dans le cas de la tyrosine) une interaction avec l'état fondamental et l'état excité de la 9 AA, de l'ACA et de l'ACMA et uniquement une interaction avec l'état fondamental des autres acridines.

L'ensemble des résultats expérimentaux met en évidence le rôle particulier joué par le tryptophane et la tyrosine vis-à-vis des composés étudiés puisque c'est uniquement avec ces deux acides aminés que ces molécules s'associent dans l'état fondamental.

Il est à noter que lors d'une étude par spectroscopie d'absorption Fujimori [22] a mis en évidence la formation de complexe entre le tryptophane d'une part, l'acridine et divers ptéridines d'autre part. Les constantes de stabilité de ces complexes sont du même ordre de grandeur que celles obtenues au cours de cette étude.

La lecture du Tableau 1 montre que les différents substituants des diverses amino-9 acridines ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans les interactions de ces produits avec les acides aminés car l'absence d'interaction dans l'état excité des composés type atébrine peut n'être qu'une conséquence de la faible durée de vie des molécules.

Les différentes valeurs obtenues pour la constante k_+^* sont toujours de l'ordre de grandeur de la constante de vitesse d'une réaction contrôlée par diffusion.

Or la constante de vitesse k_+^* d'une telle réaction est liée à la viscosité du milieu par la relation

$$k_+^* = \frac{8RT}{3000\eta} p$$

η étant la viscosité du solvant, R la constante du gaz parfait, T la température absolue et p mesurant l'efficacité d'une collision.

Nous avons mesuré la constante k_+^* , pour les systèmes 9 AA-phénol et 9 AA-tryptophane, dans des solutions de différentes concentrations en sucrose. La Fig. 7 montre que dans ces deux cas la constante k_+^* varie de façon linéaire avec l'inverse de la viscosité. C'est donc la preuve que les interactions acides aminés-molécules étudiées dans l'état excité se produisent selon un processus contrôlé par diffusion. La droite $k_+^* = f(1/\eta)$ permet d'atteindre l'efficacité d'une collision soit $p \approx 0,6$ dans notre cas.

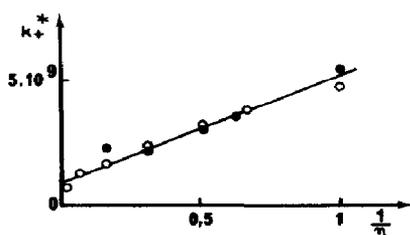


Fig. 7. Variation de la constante k_+^* ($l \text{ mol}^{-1}$) en fonction de l'inverse de la viscosité (cP^{-1}) dans le cas des interactions 9 AA-tryptophane (●) et 9 AA-phénol (○).

6. Conclusions

Parmi tous les acides aminés seuls le tryptophane, l'histidine et semble-t-il la tyrosine ont un rôle d'inhibiteur sur la fluorescence des diverses amino-acridines étudiées.

L'inhibition de la fluorescence de la 9 AA, de l'ACA et de l'ACMA par l'histidine se produit par un processus dynamique tandis qu'elle se produit à la fois par un processus dynamique et par un processus statique lorsque l'inhibiteur est le tryptophane ou la tyrosine.

L'inhibition de la fluorescence des autres aminoacridines, qui ont une faible durée de vie de fluorescence, se produit uniquement par un processus statique.

L'influence de la viscosité sur l'extinction de la fluorescence nous a permis de montrer que les processus dynamiques sont contrôlés par diffusion.

L'inhibition de la fluorescence par processus statique a été interprétée sous forme de complexation. A cet égard les résultats relatifs au tryptophane et à la tyrosine semblent présenter un intérêt tout particulier puisque c'est uniquement avec ces deux acides aminés que les acridines étudiées forment un complexe dans l'état fondamental. Il est possible que ce type d'interaction intervienne lors d'interactions spécifiques entre ces mêmes produits et certaines protéines.

Références

- 1 H. L. Booij, M. I. Cleton-Soeteman et E. A. C. Van Oortmerssen, *Ann. Histochem.*, **21** (1976) 203.
- 2 Y. Kubota et R. F. Steiner, *Biophys. Chem.*, **6** (1977) 279.
- 3 Y. Kubota, K. Hirano et Y. Motoda, *Chem. Lett.*, (1978) 123.
- 4 Y. Kubota et Y. Motoda, *Chem. Lett.*, (1979) 1375.
- 5 J. Limon, R. K. Selander et A. de la Chapelle, *Exp. Cell. Res.*, **104** (1977) 449.
- 6 G. Duportail, Y. Mauss et J. Chambron, *Biopolymers*, **16** (1977) 1397.
- 7 G. Bottiroli, G. Prenna, A. Nadreoni, C. A. Sacchi et O. Svelto, *Photochem. Photobiol.*, **29** (1979) 23.
- 8 Z. Gromet-Elhanan, *FEBS Lett.*, **13** (1971) 124.
- 9 A. Marty et P. Viallet, *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, **288** (1979) 1427.
- 10 A. Marty et P. Viallet, *C.R. Acad. Sci., Sér. D*, **288** (1979) 1715.
- 11 A. Albert, *J. Chem. Soc.*, (1965) 4653.
- 12 J. L. Irvin et E. M. Irvin, *J. Am. Chem. Soc.*, **72** (1950) 2743.
- 13 A. C. Capomacchia, J. Casper et S. G. Schulman, *J. Pharm. Sci.*, **63** (1974) 1272.
- 14 W. M. Vaughan et G. Weber, *Biochemistry*, **9** (1970) 464.
- 15 M. G. Badea et S. Georghiou, *Photochem. Photobiol.*, **24** (1976) 417.
- 16 O. Stern et M. Volmer, *Z. Phys.*, **20** (1919) 183.
- 17 D. Busch, L. Dahm, B. Siwicke et R. W. Ricci, *Tetrahedron Lett.*, **51** (1977) 4489.
- 18 J. C. André, M. Niclause et W. R. Ware, *Chem. Phys.*, **28** (1978) 371.
- 19 P. M. Froehlich, D. Gantt et V. Paramasigamani, *Photochem. Photobiol.*, **26** (1977) 639.
- 20 D. A. Labianca, G. N. Taylor et G. S. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.*, **94** (1972) 3679.
- 21 S. P. Van et G. S. Hammond, *J. Am. Chem. Soc.*, **100** (1978) 3895.
- 22 E. Fujimori, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **45** (1959) 133.