

ANNEE 2005

N°

15 AVR. 2005

THESE

pour le

DIPLÔME D'ETAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Aurélie FURIGA

Présentée et soutenue publiquement le 4 février 2005

**INFLUENCE DES CONDITIONS DE CONSERVATION
ET D'UTILISATION SUR L'EFFICACITE
DE L'ACIDE DELTA-AMINOLEVULINIQUE (ALA)
UTILISE EN PHOTOCHEMIOOTHERAPIE**

Président : M. Jean-François BIARD, Professeur de Pharmacognosie

Membres du Jury : M. Thierry PATRICE, Professeur de Physiologie - Anatomie
Mme Béatrice RICHARD, MCU en Sciences Biologiques

INTRODUCTION	1
GENERALITES	3
I - La thérapie photodynamique (PDT)	3
I.1 - Définition et principe	3
I.2 - Les différents photosensibilisants	5
I.2.1 - Les photosensibilisants de première génération	7
I.2.1.1 - Les porphyrines	7
I.2.1.2 - L'hématoporphyrine dérivée	7
I.2.1.3 - Le Photofrin®	8
I.2.2 - Les photosensibilisants de seconde génération	10
I.2.2.1 - L'acide delta-aminolévulinique (ALA)	10
I.2.2.2 - Les pro-drogues	11
I.2.2.3 - Les chlorines	12
I.2.2.4 - Les phtalocyanines	15
I.2.2.5 - Les texaphyrines	15
I.2.2.6 - Les dérivés de la bactériochlorophylle a	16
I.2.3 - Les photosensibilisants non porphyriques	16
I.2.3.1 - Les quinones	16
I.2.3.2 - Les xanthènes	18
I.2.3.3 - Les cyanines	19
I.2.3.4 - Les colorants cationiques	20
I.3 - Les réactions photochimiques	21
I.3.1 - Réactions de type I	21
I.3.2 - Réactions de type II	22
I.3.3 - Réactions de type III	22
II - Aspects cellulaires de la PDT des cancers	23
II.1 - PDT et mort cellulaire	23
II.1.1 - L'apoptose	23
II.1.2 - La nécrose	23
II.2 - PDT et cibles cellulaires	24

III - Les applications cliniques de la PDT	26
III.1 - Les applications non anticancéreuses	26
III.1.1 - La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)	26
III.1.2 - Les kératoses actiniques	26
III.2 - Les applications en cancérologie	27
III.2.1 - Le photodiagnostic	27
III.2.2 - Les applications thérapeutiques	28
IV - Aspects physiques de la PDT	29
IV.1 - La lumière	29
IV.2 - Les transitions électroniques	30
IV.2.1 - L'absorption	30
IV.2.2 - L'émission spontanée	31
IV.2.3 - L'émission stimulée	31
IV.3 - La production d'oxygène singulet	33
IV.4 - L'émission de fluorescence	34
 OBJET DE LA THESE	 36
I - Le cycle de biosynthèse de l'hème	36
I.1 - La biosynthèse de l'hème	37
I.2 - Régulation du cycle de biosynthèse	38
I.3 - Régulation du métabolisme du fer	39
I.4 - Désordres de la biosynthèse de l'hème	40
II - Avantages de l'ALA-PDT et applications cliniques	40
II.1 - Sélectivité de l'ALA envers les cellules tumorales	40
II.2 - Bonne tolérance	41
II.3 - Différentes voies d'administration	42
II.4 - Applications cliniques de l'ALA-PDT	43
III - Facteurs influant sur la stabilité de l'ALA en solution : hétérogénéité des résultats	44

MATERIELS ET METHODES	47
I - Matériels	47
I.1 - Lignée cellulaire utilisée	47
I.2 - Le photosensibilisant : l'ALA	47
I.3 - Les solvants de dissolution	48
I.4 - Appareillage	49
I.4.1 - La diode laser	49
I.4.2 - Le photomètre d'absorption	50
I.4.3 - Le système de l'imagerie	51
II - Méthodes	53
II.1 - Analyse du pH des solutions	53
II.2 - Entretien des cellules	53
II.2.1 - Culture des cellules C6	53
II.2.2 - Trypsination	53
II.3 - Influence des différents facteurs sur l'intensité de fluorescence de la PpIX	55
II.3.1 - Implantation des cellules	55
II.3.2 - Conditionnement des solvants	55
II.3.3 - Préparation des solutions d'ALA et incubation	56
II.3.4 - Etudes de fluorescence	56
II.4 - Détermination de la phototoxicité : études des différents paramètres	57
II.4.1 - Implantation des cellules	57
II.4.2 - Conditionnement des solvants	57
II.4.3 - Préparation des solutions d'ALA	57
II.4.4 - Incubation avec les cellules	58
II.4.5 - Irradiation	58
II.4.6 - Mesure de la viabilité cellulaire	59
II.5 - Etudes de phototoxicité : rapport 1/40	60
II.5.1 - Implantation des cellules	60
II.5.2 - Préparation des différentes conditions	60
II.5.3 - Préparation des solutions d'ALA	61
II.5.4 - Incubation avec les cellules	61
II.5.5 - Irradiation et détermination du pourcentage de survie	61

RESULTATS	62
I - Analyse du pH des solutions	62
II - Etudes de fluorescence de la PpIX	63
II.1 - Influence de la concentration en ALA sur la fluorescence de la PpIX	63
II.2 - Influence de la température sur la fluorescence induite par l'ALA	64
II.3 - Influence du temps de conservation des solutions d'ALA	65
II.4 - Influence du solvant de dilution de l'ALA	66
III - Etudes de phototoxicité de l'ALA	68
III.1 - Influence du solvant de dilution de l'ALA sur sa phototoxicité	68
III.2 - Influence de la température de conservation des solutions d'ALA	69
III.3 - Influence du temps de conservation des solutions d'ALA	71
III.4 - Influence de tous les facteurs étudiés sur la phototoxicité induite par l'ALA	73
IV - Etudes de phototoxicité : rapport 1/40	74
IV.1 - Influence du solvant de dilution de l'ALA sur sa phototoxicité	74
IV.2 - Influence de la température de conservation des solutions d'ALA	75
IV.3 - Influence du temps de conservation des solutions d'ALA	77
IV.4 - Influence de tous les facteurs étudiés sur la phototoxicité induite par l'ALA	81
 DISCUSSION	 82
 CONCLUSION	 104
 BIBLIOGRAPHIE	 106
 ANNEXES	 116
Annexe 1 : Tableau : Indications et molécules en cours d'essais cliniques ou ayant l'AMM dans le domaine de la PDT	116
Annexe 2 : Publication	118

INTRODUCTION

En ce début de 21^{ème} siècle, le cancer reste un problème de santé publique majeur provoquant un quart de la totalité des décès observés. Ces dernières années ont été marquées par d'importants travaux de recherche et de développements thérapeutiques. Grâce à la mise en place de protocoles multidisciplinaires associant la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie ou l'hormonothérapie, certains types de cancers ont pu être partiellement guéris. Malheureusement, les traitements actuels restent encore trop souvent impuissants. C'est pourquoi de nouvelles voies thérapeutiques sont apparues, comme la thérapie génique, la radiothérapie interne et la photochimiothérapie (ou PDT pour PhotoDynamic Therapy).

Actuellement, la thérapie photodynamique est utilisée avec succès aussi bien pour le traitement de certains cancers tels que les cancers de la tête et du cou ou les tumeurs oesophagiennes que pour le traitement de maladies non-cancéreuses comme les kératoses actiniques.

La photochimiothérapie est basée sur l'action combinée d'un médicament non toxique administré par voie locale ou générale chez un patient et de la lumière visible délivrée localement au niveau de la tumeur à l'aide de fibres optiques. Le rayonnement va activer la substance sensible fixée préférentiellement sur les cellules cancéreuses et provoquer la mort des cellules tumorales en libérant des espèces radicalaires toxiques qui vont ensuite altérer des cibles cellulaires vitales pour la tumeur.

Les photosensibilisants peuvent également être utilisés pour la détection des tumeurs grâce à leur capacité à émettre une fluorescence détectable lorsqu'ils sont excités à une longueur d'onde adaptée ; c'est le photodiagnostic (ou PDD).

L'acide δ -aminolévulinique (ALA) est le précurseur métabolique d'un photosensibilisant naturel endogène, la protoporphyrine IX (PpIX). L'administration exogène d'ALA surpasse le contrôle négatif exercé par l'hème. Kennedy *et coll.*, en 1990, ont été les premiers à utiliser l'ALA en application topique pour le traitement de tumeurs superficielles de la peau. Depuis, l'ALA-PDT est expérimentée dans de nombreux essais cliniques pour le traitement de diverses pathologies.

En 1999, la société DUSA Pharmaceuticals a reçu une autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) pour l'utilisation de l'acide delta-aminolévulinique sous sa forme commerciale Levulan[®] (ALA 20%) pour le traitement des kératoses actiniques, lésions précancéreuses de la peau causées par une exposition excessive au soleil et susceptibles d'évoluer vers les cancers de la peau. Le Levulan[®] a ensuite reçu une A.M.M. (Autorisation

de Mise sur le Marché) aux USA pour le traitement des kératoses actiniques (février 2000, commercialisé par Schering-Plough).

La principale limite de cette thérapeutique, surtout par voie locale, est la faible pénétration de l'ALA au travers de la peau. Le développement d'une forme injectable n'a pas totalement aboli cette limite puisqu'un autre problème est apparu : l'instabilité de l'ALA en solution. En effet, L'ALA subit en solution une réaction de dégradation spontanée dont les caractéristiques varient en fonction de certaines conditions (pH, température...). Mais les facteurs influençant cette instabilité sont très peu étudiés actuellement. Pourtant, cette réaction de dégradation est certainement responsable de la diminution de l'efficacité de l'ALA et de l'hétérogénéité des résultats observés lors de certains essais expérimentaux et cliniques.

L'objectif de ce travail est donc d'étudier l'influence de différents facteurs sur cette instabilité afin de limiter la dégradation de l'ALA en solution et de développer une forme efficace, stable et stérile utilisable chez l'homme.

Pour cela, la stabilité de l'ALA sera étudiée en faisant varier :

- la concentration (0-200 µg/ml),
- le solvant de dissolution (tampon imidazole pH 7,4, tampon tris-maléate pH 7,4, tampon diméthylaminoéthylamine pH 7,4, eau pour préparation injectable, PBS et RPMI),
- la température de conservation (4°C, 21°C et 37°C) et
- le temps entre la préparation des solutions d'ALA et leur incubation avec les cellules (0, 20 et 60 minutes).

Pour la première fois, la stabilité de l'ALA sera évaluée en employant des cultures cellulaires et en utilisant comme marqueur d'efficacité l'intensité de fluorescence de la PpIX induite par l'ALA et le pourcentage de survie des cellules après incubation avec l'ALA et irradiation par une diode laser. Les cellules C6 ont été sélectionnées en vue d'une application clinique pour le traitement des tumeurs cérébrales et leur photodiagnostic.

GÉNÉRALITÉS

I - La thérapie photodynamique (PDT)

I.1 - Définition et principe

La thérapie photodynamique, également appelée la photochimiothérapie ou PDT, est une méthode de traitement ou de détection des cancers basée sur l'utilisation conjointe de la lumière (laser principalement), et d'un médicament appelé "photosensibilisant". Dans un premier temps, ce photosensibilisant est administré par voie orale, intraveineuse ou de façon topique. Celui-ci est alors retenu préférentiellement dans les tissus à indice mitotique élevé. Les photosensibilisants ne sont pas toxiques par eux-mêmes. Ils deviennent cytotoxiques après activation par la lumière entraînant de ce fait la destruction localisée des tissus tumoraux.

Depuis des siècles, les propriétés bénéfiques de la lumière du soleil ont été reconnues. Des études anthropologiques ont indiqué que dans l'Egypte ancienne, l'Inde et la Chine, des extraits de plantes contenant des psoralènes ont été utilisés pour traiter des patients présentant des lésions cutanées comme le vitiligo ou le psoriasis (Ochsner-Bruderer, 1994). De manière étonnante, l'effet curatif de ces extraits de plantes était seulement induit après une exposition à la lumière solaire.

Au début du XX^{ème} siècle, Raab a observé que des bactéries, incubées préalablement avec de l'acridine orange, étaient rapidement tuées par la lumière visible en présence d'oxygène (Raab, 1990). Peu après en 1903, von Tappeiner et Jesionek sont probablement les premiers à utiliser la PDT en oncologie. Ils ont publié un article décrivant les résultats obtenus après utilisation de la photochimiothérapie sur des tumeurs de la peau avec une solution d'éosine à 5% en application topique suivie d'une exposition solaire. Ils ont obtenu une régression d'un épithélioma malpighien du visage avec un bon résultat cosmétique chez une femme de 70 ans. Il est à noter que ce type de photosensibilisants (éosine, acridine orange) n'est plus utilisé du fait de sa toxicité et de son effet cancérigène (von Tappeiner et Jesionek, 1903). Un an plus tard, von Tappeiner et Jodlbauer ont créé le terme d'action photodynamique pour distinguer ce phénomène de la photosensibilisation des plaques photographiques (von Tappeiner et Jesionek, 1904).

Depuis 1911, des porphyrines comme l'hématoporphyrine ont été administrées par voie systémique et ont montré une bonne captation dans différentes tumeurs et un effet photodynamique suffisant après irradiation. Après les premières expériences de 1911 utilisant l'hématoporphyrine (Hausman, 1911), l'utilisation de photosensibilisants basés sur les

porphyrines a connu un intérêt croissant. En 1913, Meyer-Betz s'injecta lui-même de l'hématoporphyrine et fut le premier auteur à décrire la photosensibilisation cutanée résultante (oedèmes sévères de la peau et érythèmes) (Meyer-Betz, 1913).

Policard a ensuite attribué la fluorescence rouge induite par la lumière à une accumulation naturelle de photosensibilisants dans les tumeurs humaines (Policard, 1924). Auler et Banzer ont confirmé ces observations et suggéré l'utilisation de porphyrines pour la détection précoce des maladies (Auler et Banzer, 1942).

Les premières études de photodiagnostic (PDD) ont été rapportées par Gregorie *et coll.* en 1968 permettant de démontrer l'utilisation de photosensibilisants pour la détection de lésions malignes. Celui-ci a réalisé une étude portant sur la détection par fluorescence de tumeurs malignes après injection intraveineuse d'hématoporphyrine (HpD). Cette étude a été réalisée sur 226 patients montrant une corrélation de fluorescence de 75-85% avec les biopsies d'épithéliomas malpighiens et d'adénocarcinomes, mais aussi 23% de faux positifs dans 53 lésions bénignes. Cette étude a permis de montrer que cette technique pouvait être utilisée pour la détection de lésions malignes.

Ce n'est qu'en 1967 que fut rapportée par Lipson *et coll.* la première utilisation de l'hématoporphyrine dérivée (HpD) en photochimiothérapie. La venue sur le marché de lasers dans les années 70 a donné un nouvel élan à la PDT, quand Dougherty *et coll.*, Diamond *et coll.* et Kelly *et coll.* ont rapporté l'utilisation d'HpD et de lumière laser pour une destruction sélective de la tumeur.

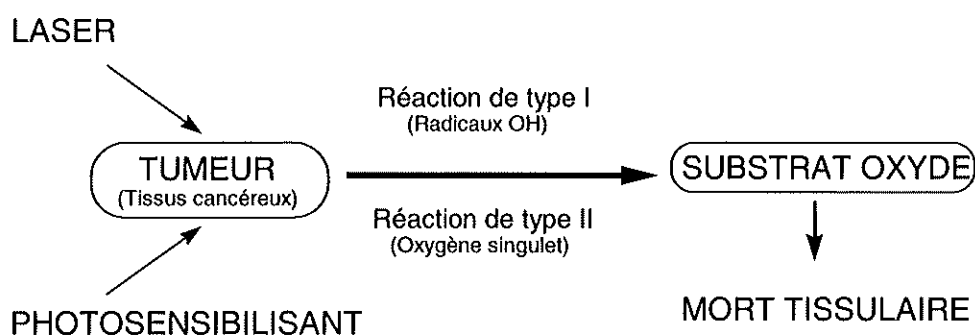


Figure 1 : Principe de la Photochimiothérapie (PDT)

Le principe de ce traitement consiste à "illuminer" la tumeur préalablement traitée par une substance sensible à l'aide d'un laser utilisé à une puissance n'induisant pas d'effet thermique, et à une longueur d'onde adaptée au spectre d'absorption lumineuse du photosensibilisant. Injectée au patient, la substance photosensible se fixe et est retenue plus ou

moins préférentiellement sur les cellules tumorales. Le laser, émettant une longueur d'onde précise, éclaire la zone concernée à l'aide d'une fibre optique. Cette irradiation va déclencher une série de transitions énergétiques aboutissant à la production, au sein du tissu irradié qui a fixé le photosensibilisant, d'espèces radicalaires toxiques qui vont oxyder et détruire le tissu (Davies *et coll.*, 1986 ; Goldstein *et coll.*, 1972).

1.2 - Les différents photosensibilisants

Le photosensibilisant idéal n'existe pas. Cependant, il existe plusieurs propriétés physicochimiques et pharmacologiques qui rendent le photosensibilisant le plus efficace possible pour l'utilisation photochimique (Jori *et coll.*, 1996) :

- physicochimiques :

- haute pureté chimique (substances pures et simples à reproduire)
- grand coefficient d'extinction molaire dans le rouge ou le proche infra-rouge
- faible tendance à l'agrégation dans un milieu aqueux

- photophysiques :

- longue durée de vie de l'état triplet
- fort rendement de génération de l'oxygène singulet et/ou de transfert d'électrons aux molécules du substrat

- pharmacologiques :

- ciblage efficace et sélectif vers les tissus tumoraux
- clairance rapide du sérum et des tissus sains
- faible toxicité systémique et cutanée

- photothérapeutiques :

- phototoxicité préférentielle au niveau des cellules cancéreuses
- absence d'effets secondaires
- absence de potentiel mutagène

Les qualités majeures qu'un photosensibilisant doit posséder sont sa captation et/ou sa rétention sélective dans les tissus cancéreux, et son efficacité qui est directement liée à son absorbance, son mode d'action (type I ou II) et sa localisation tumorale (Moan, 1990).

La lumière utilisée pour exciter le photosensibilisant pénètre le tissu plus ou moins profondément selon la longueur d'onde (figure 2). Les nouveaux photosensibilisants qui apparaissent ont donc tendance à présenter une plus forte absorption dans le proche infra-rouge (750-850 nm) pour favoriser l'absorption en profondeur de la lumière (Dilkes *et coll.*, 1995).

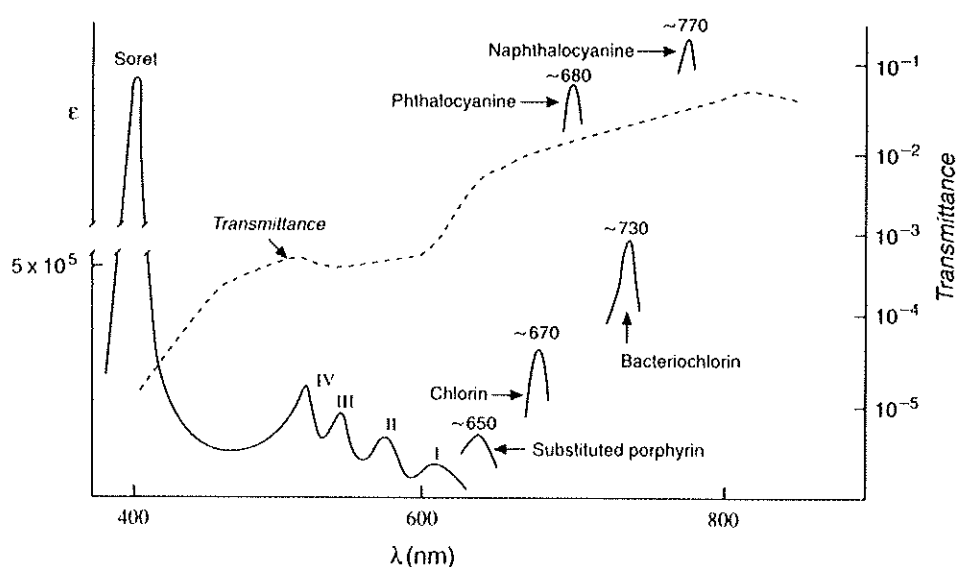


Figure 2 : Représentation relative de l'absorption des photosensibilisants et de la quantité de lumière traversant un tissu humain d'1 cm d'épaisseur (Bonnett, 1999).

Le premier photosensibilisant utilisé a été un dérivé porphyrinique, l'hématoporphyrine dérivée (HpD) qui est devenue, sous une forme purifiée, le Photofrin[®]. L'autorisation de mise sur le marché (A.M.M.), obtenue en France (avril 1996) après les Etats-Unis (1995) et le Japon (1994), a encouragé la synthèse et le développement de photosensibilisants de deuxième génération.

I.2.1 - Les photosensibilisants de 1^{ère} génération

La première génération de photosensibilisants est basée sur des porphyrines.

I.2.1.1 - Les porphyrines

Les porphyrines sont un groupe de composés hétéroaromatiques caractérisés par un noyau tétrapyrrolique constitué de quatre hétérocycles pentagonaux pyrroles identiques reliés par quatre ponts méthényles (le noyau porphine) (figure 3). Même si ce noyau porphine peut être oxydé ou réduit, il montre en général une stabilité considérable. Il est caractérisé par un spectre d'absorption possédant une bande d'absorption caractéristique autour de 400 nm (bande de Soret), et généralement quatre bandes plus lointaines aux alentours de 500-600 nm. Ces porphyrines sont essentielles puisqu'elles constituent l'hémoglobine, la myoglobine, la vitamine B12 et d'autres enzymes et coenzymes chez l'espèce animale (Kessel, 1984).

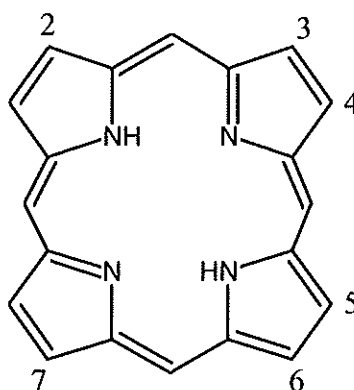


Figure 3 : Noyau porphine

I.2.1.2 - L'hématoporphyrine dérivée

L'hématoporphyrine dérivée est préparée à partir d'hémine porcine en traitant un chlorhydrate d'hématoporphyrine avec de l'acide acétique en présence de traces d'acide sulfurique utilisé en tant que catalyseur (Gomer et Dougherty, 1979). Ce mélange est ensuite filtré, neutralisé puis séché. L'étape finale de la préparation de l'HpD impliquant la solubilisation du produit dans une solution alcaline diluée (pH ajusté à 7,4) entraîne une grande variété de réactions inattendues avec formation de dimères et même d'oligomères de degrés supérieurs ($n < 7$).

L'HpD absorbe la lumière entre 350 nm et 630 nm. Sa structure de base, représentée figure 4, comporte un noyau porphine substitué par :

- 4 radicaux méthyles (CH_3) en positions 1, 3, 5 et 8,
- 2 radicaux propanoyles ($\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$) en positions 6 et 7,
- 2 radicaux hydroxyéthyles (CHOH-CH_3) en positions 2 et 4.

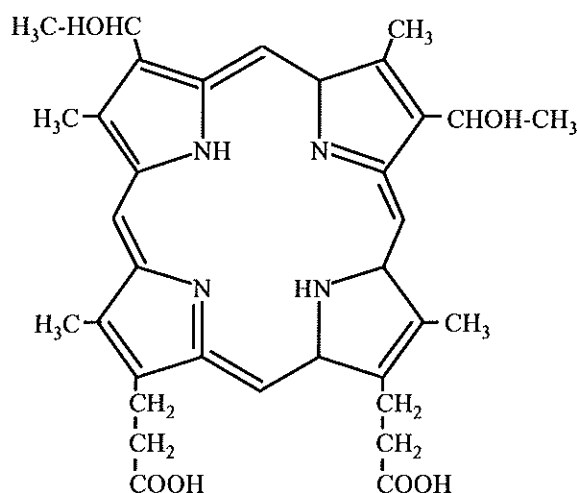


Figure 4 : Structure chimique de l'hématoporphyrine dérivée

L'HpD est donc un composé compliqué, hétérogène et faiblement reproductible. Cependant, les qualités de localisation tumorale de l'HpD ont clairement été démontrées (Gregorie *et coll.*, 1968). C'est en 1982 que Hayata *et coll.* ont rapporté les premiers essais cliniques avec l'HpD pour le traitement du cancer du poumon.

1.2.1.3 - Le Photofrin[®]

Le Photofrin[®] (Porfimer Sodium), un mélange purifié d'HpD, est le seul photosensibilisant ayant reçu une A.M.M. en France (avril 1996) pour deux applications cliniques (Buskard *et coll.*, 1994) (rechutes des cancers bronchiques et cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional antérieur). Le Photofrin[®] contient principalement la fraction active de l'HpD (Byrne *et coll.*, 1990 ; Dougherty *et coll.*, 1987), cependant ses nombreux composants sont caractérisés par différentes propriétés spectroscopiques, pharmacocinétiques et pharmacologiques. Le Photofrin[®] est principalement constitué de monomères, incluant l'hématoporphyrine, les deux isomères de l'hydroxy-éthyl-

vinyl-deutéroporphyrine et la protoporphyrine IX, de dimères d'hématoporphyrine avec une liaison éther, ester ou carbone-carbone (figure 5) et de très grands oligomères.

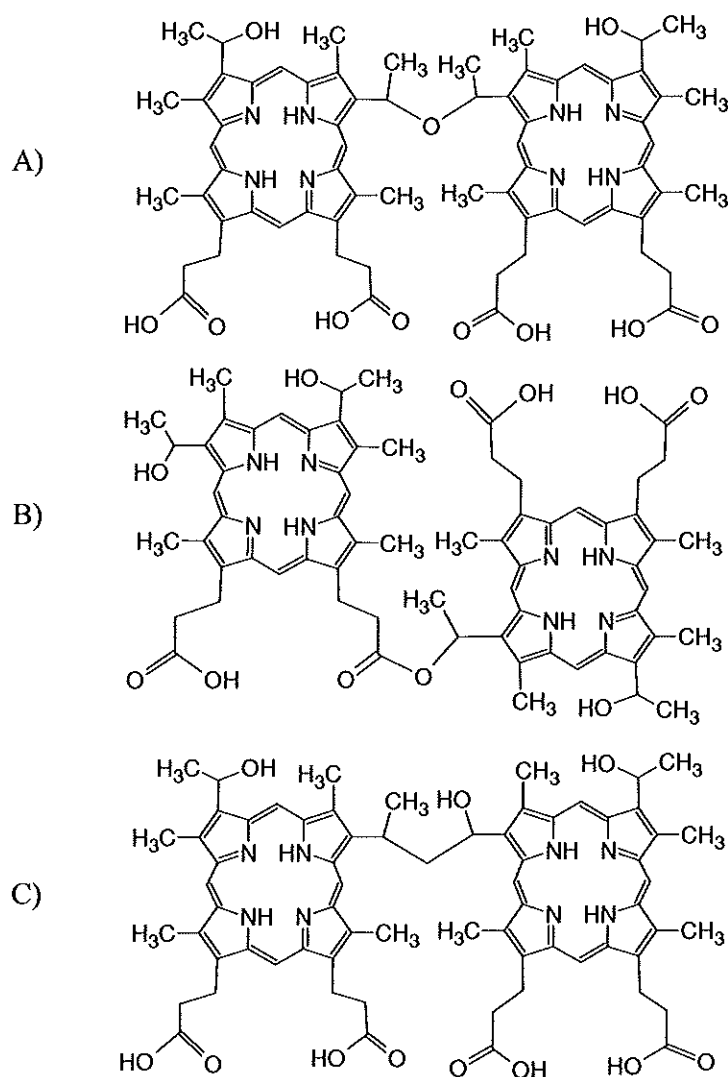


Figure 5 : Dimères du Photofrin - dihématoporphyrine avec une liaison A) éther , B) ester, C) carbone-carbone

Les photosensibilisants de première génération présentent quelques inconvénients :

- ils ont une faible absorption vers le proche infra-rouge,
- ce sont des mélanges de produits dont la structure complexe n'est pas toujours définie,
- leur sélectivité tumorale n'est pas optimale,
- ils provoquent une photosensibilisation de la peau importante et durable.

Aussi, afin de remédier aux problèmes liés à l'utilisation de ces photosensibilisants dits de première génération, de nouveaux candidats pour la PDT appelés photosensibilisants de seconde génération ont été synthétisés et sont en cours d'évaluation.

I.2.2 - Les photosensibilisants de seconde génération

I.2.2.1 - L'acide delta-aminolévulinique

L'ALA n'est pas un photosensibilisant à proprement parler mais une prodrogue transformée par action enzymatique en agent photosensible, la protoporphyrine IX (PpIX) (figure 6). En effet, la synthèse d'ALA constitue la première étape de la biosynthèse de l'hème, l'avant-dernière étape étant la formation de la PpIX, un photosensibilisant efficace. La dernière étape, la formation de l'hème, correspondant à l'incorporation de fer dans la PpIX. Celle-ci se déroule dans la mitochondrie sous l'action d'une enzyme, la ferrochélatase. L'addition d'ALA exogène permet la formation endogène de PpIX du fait de la capacité limitée de la ferrochélatase à transformer la PpIX en hème (Peng *et coll.*, 1997a). La biosynthèse de l'hème et la formation de PpIX sera expliquée plus en détail au chapitre "Objet de la thèse".

L'ALA est hydrophile et ne pénètre donc pas facilement la peau intacte, les membranes cellulaires ou encore les barrières biologiques. Bien que la PpIX n'ait qu'une faible bande d'absorption à 630 nm, l'ALA est utilisé avec succès, aussi bien pour le traitement des cellules basales de carcinome de la peau et d'adénocarcinome gastro-intestinal, que pour le diagnostic de tumeurs (Stummer *et coll.*, 1998a). L'ALA est particulièrement efficace en dermatologie, pour le traitement et le diagnostic des tissus cutanés néoplasiques (Szeimies *et coll.*, 1996a, 1996b).

Le Levulan[®] (nom commercial de l'ALA) a reçu une A.M.M. aux USA pour le traitement des kératoses actiniques (février 2000, commercialisé par Schering-Plough). Cette molécule qui n'est pas brevetée en Europe va être développée par Schering AG par l'intermédiaire d'une société allemande Medac.

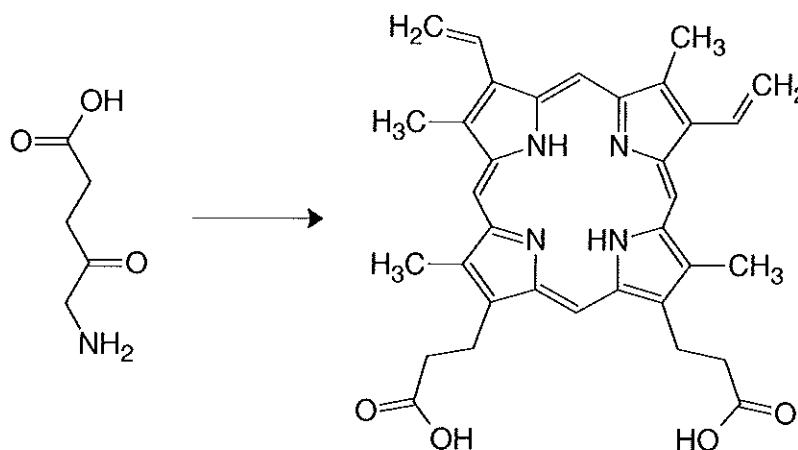


Figure 6 : Molécule d'acide delta-aminolévulinique (ALA) et de protoporphyrine IX (PpIX)

I.2.2.2 - Les pro-drogues

Un des inconvénients de l'ALA est sa faible capacité à diffuser à travers les membranes biologiques du fait de sa faible lipophilicité. Il a donc été envisagé d'utiliser des dérivés d'ALA. Il est attendu de ces pro-drogues qu'elles aient de meilleures propriétés de diffusion grâce à une lipophilicité accrue, et qu'elles soient converties en ALA après une transformation spontanée ou enzymatique. Pour tenter d'y parvenir, de nombreux dérivés d'ALA ont été synthétisés et testés avec comme critères leurs conditions de pénétration dans les cellules et leurs capacités à induire la formation de PpIX (Klock *et coll.*, 1998).

Plusieurs dérivés ont été testés en utilisant aussi bien des modifications du site amide que du site acide carboxylique. Etant connu que l'accroissement du nombre d'atomes de carbone des chaînes carbonées augmentait la lipophilicité d'une molécule, plusieurs composés esters ont été étudiés. Dans cette classe de composés, des esters à longue chaîne carbonée (C6-C8) et particulièrement l'ALA hexylester (hALA) et l'ALA méthylester (mALA) (figure 7) se sont montrés efficaces dans la biosynthèse de la PpIX (Cosserat-Gerardin *et coll.*, 2000 ; Luksiene *et coll.*, 2001).

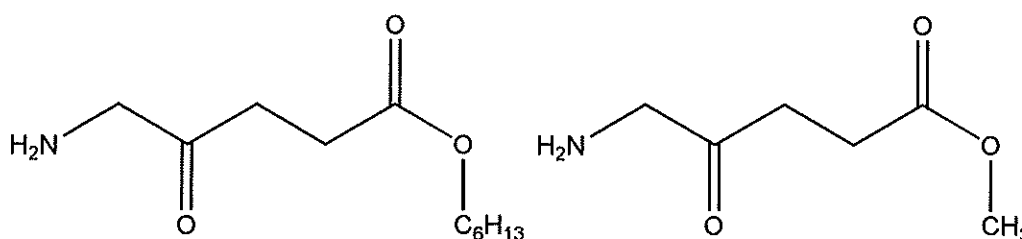


Figure 7 : Structure de l'hexylester d'ALA et du méthylester d'ALA

L'ALA méthylester, commercialisé sous le nom de Metvix[®] par la société Photocure, a reçu en 2002 une A.M.M. pour le traitement des états précancéreux de la peau et des kératoses actiniques. Le Metvix[®] est distribué par les laboratoires Galderma-L'Oréal.

1.2.2.3 - Les chlorines

A la différence des porphyrines, les chlorines ont une bande de forte absorption dans le rouge (entre 640 et 700 nm) (Spikes *et coll.*, 1990). Les photosensibilisants de type chlorine peuvent avoir deux origines différentes : elles peuvent provenir d'une modification de la chlorophylle a, ou d'une synthèse chimique.

a- La chlorine e6

Un exemple de chlorine issue d'une modification de la chlorophylle a est la chlorine e6 (Ce6) appelée parfois phytochlorine. Ce photosensibilisant hydrophile est essentiellement monomérique dans une solution de tampon phosphate. Dans un même tampon à pH 7,4, elle a un pic de Soret principal à 402 nm et un fort pic dans le rouge à approximativement 654 nm, sa fluorescence est maximale à 675 nm avec une durée de vie approximative de 5.3 ns (Röder *et coll.*, 1987) (figure 8).

La Ce6 est localisée dans les lysosomes où elle induit des dommages après illumination. Les dérivés de la Ce6, incluant la mono-L-aspartyl chlorine e6 (ACe6), la diaspartyl Ce6, la monoseryl Ce6 ainsi que d'autres dérivés aminoacides, sont plus lipophiles et donc mieux retenus par les tumeurs et induisent une meilleure destruction tumorale que la Ce6 elle-même.

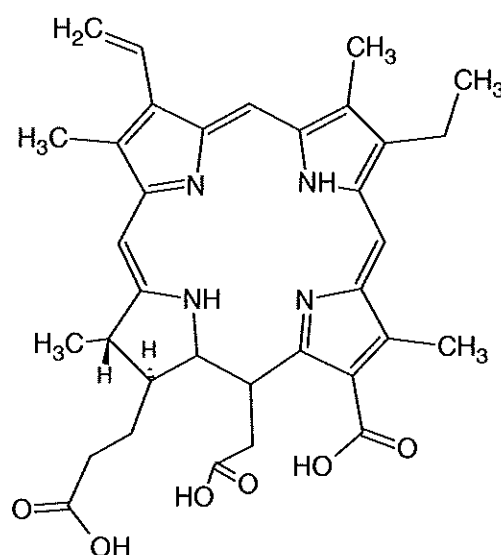


Figure 8 : Chlorine e6

b- Les purpurines

Les purpurines ont une forte bande d'absorption dans le rouge, région du spectre entre 630 et 715 nm (Spikes, 1990). Les purpurines sont à base libre ou complexées avec un métal (argent, nickel, étain, zinc). Seules les métallo-purpurines avec de l'étain (Sn) ou du zinc (Zn) sont efficaces. Le principal représentant de cette classe est la purlytine SnET_2 (figure 9).

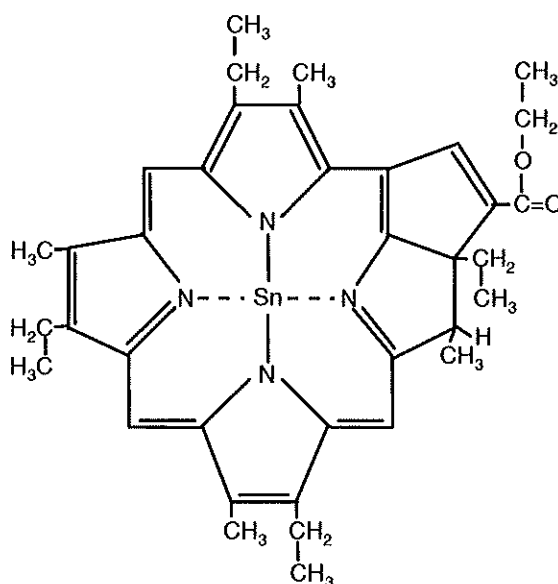


Figure 9 : La purlytine SnET_2

c- La benzoporphyrine (BPD)

Cette chlorine est synthétisée à partir de la protoporphyrine. Elle peut exister sous forme monoacide ou diacide mais la forme monoacide est considérablement plus active (Pass, 1993). Sa lipophilicité facilite son association avec la membrane cellulaire (Kessel, 1989).

L'avantage principal de la BPD est la présence de son pic d'absorption maximale à 690 nm favorisant la pénétration tissulaire de la lumière. La benzoporphyrine dérivée monoacide A existe sous la forme de deux isomères qui diffèrent par la position de leur groupement ester (figure 10).

Il a été démontré que ces deux isomères possèdent la même efficacité en tant qu'agents photosensibles (Richter *et coll.*, 1992).

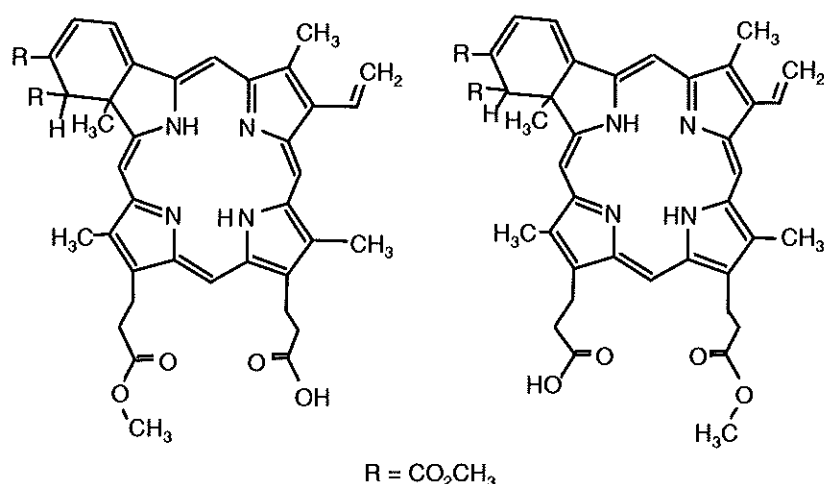


Figure 10 : Isomères de la benzoporphyrine monoacide A

La BPD (Visudyne[®]) a reçu une A.M.M. aux USA en 1999 et en France en 2000 pour une application ophtalmologique, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). En effet, la localisation vasculaire du sensibilisant immédiatement après injection permet, associée à une irradiation lumineuse à 690 nm, de traiter cette maladie.

d- La méta-tétrahydroxyphényl chlorine (m-THPC)

La m-THPC (figure 11) est un agent photosensibilisant très puissant à de très faibles concentrations et doses de lumière. Cette molécule n'étant pas hydrosoluble, une formulation spécifique est donc nécessaire pour obtenir une drogue injectable. La m-THPC possède une forte absorption dans le rouge (maximum à 652 nm) (Bonnett *et coll.*, 1989).

La m-THPC (Foscan[®]) a reçu une A.M.M. aux USA en 2001 pour le traitement premier des cancers ORL et est commercialisée par Biolitec.

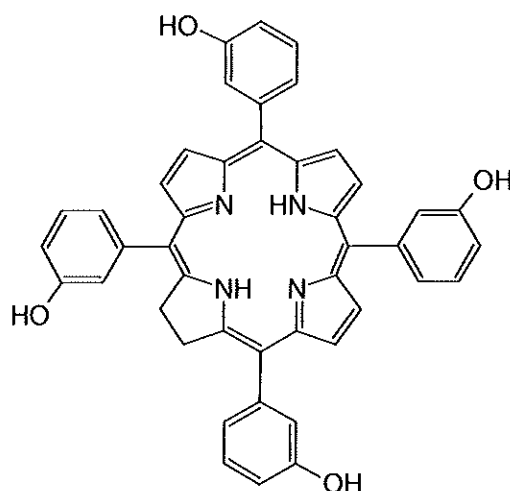


Figure 11 : La méta-tétrahydroxyphényl chlorine

I.2.2.4 - Les phtalocyanines

Les phtalocyanines (figure 12) sont des porphyrines synthétiques où les groupements pyrroles sont condensés avec un groupement benzénique, et avec un pont azoté à la place d'un pont méthine. Elles sont souvent complexées par l'aluminium ou le zinc et à des groupements sulfates ce qui augmente leur phototoxicité (Dougherty *et coll.*, 1987). Les phtalocyanines possèdent une absorption maximale entre 675 et 700 nm (Stummer *et coll.*, 1998b).

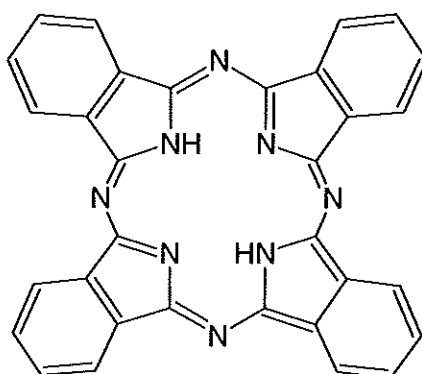


Figure 12 : La phtalocyanine

I.2.2.5 - Les texaphyrines

Le photosensibilisant principal de la classe des dérivés des texaphyrines est la Lutétium Texaphyrine (Lu-Tex) (figure 13). C'est un nouveau photosensibilisant absorbant dans le proche IR (Kostenich *et coll.*, 1997). La Lu-Tex est un produit pur, soluble dans l'eau, avec une large bande d'absorption centrée sur 732 nm (Young *et coll.*, 1996).

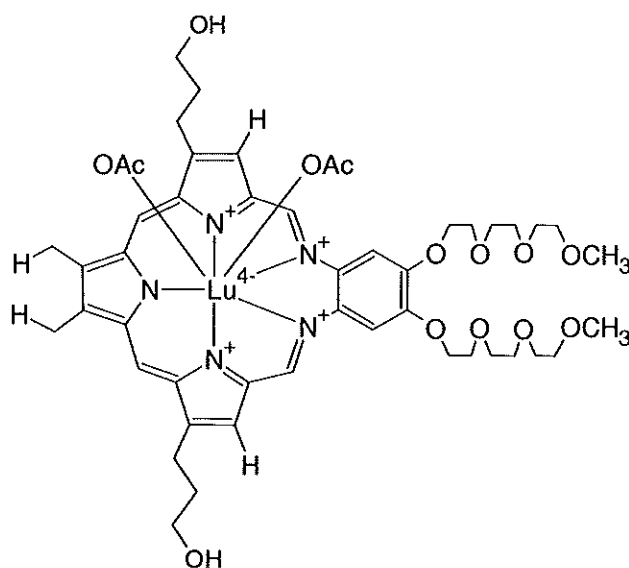


Figure 13 : La lutétium texaphyrine

1.2.2.6 - Les dérivés de la bactériochlorophylle a

La bactériochlorophylle a (figure 14) est un pigment naturel avec une bande d'absorption vers 780 nm. A ces longueurs d'ondes, la profondeur de pénétration de la lumière est approximativement trois fois plus importante que celle atteinte à 630 nm, longueur d'onde généralement utilisée en PDT clinique avec le Photofrin® (Amato, 1993).

Parmi les dérivés de la bactériochlorophylle a, existent le WST01 et le WST09 dont la synthèse a été initiée à l'Institut Weizmann à Réhovot en Israël à partir de bactéries photosynthétiques *Rhodovulum sulphidophilum* lyophilisées.

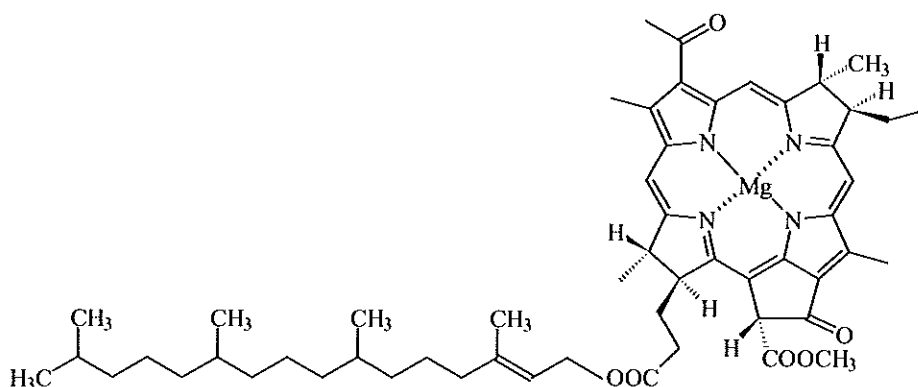


Figure 14 : La bactériochlorophylle a

I.2.3 - Les photosensibilisants non porphyriques

1.2.3.1 - Les quinones

a- Les anthraquinones

Les anthraquinones (figure 15) sont largement utilisées comme colorants, antibiotiques, capteurs d'énergie solaire et photosensibilisants.

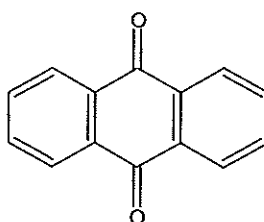


Figure 15 : Structure commune aux anthraquinones

Les anthraquinones sont également impliquées dans de nombreux processus biologiques comme la respiration, la photosynthèse et le transport d'énergie. Leurs propriétés photobiologiques dépendent de nombreux facteurs comme la nature, le nombre, la position des substituants, les liaisons hydrogène intra- et intermoléculaires, le solvant, la concentration...

Les propriétés photophysiques et photochimiques des anthraquinones sont influencées par leurs substituants, en particulier les groupes amino et hydroxy, et ces substituants peuvent faire chuter leur rendement quantique de formation d'états triplets.

b- Les perylenequinones

Bien que les champignons soient considérés comme les sources les plus riches de perylenequinones (figure 16), il est possible de les obtenir de certains sols ou insectes. De manière générale, elles possèdent trois bandes d'absorption dans le visible et un spectre de fluorescence avec un pic principal et un épaulement. Elles sont des générateurs efficaces d'oxygène singulet avec un rendement comparable à celui des porphyrines.

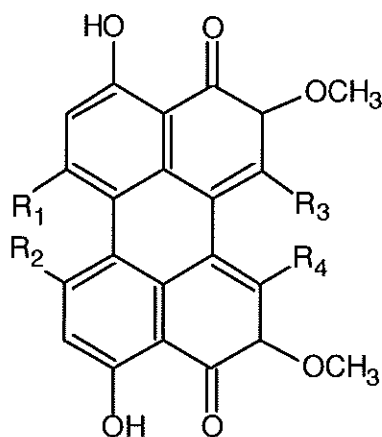


Figure 16 : Structure commune aux perylenequinones

c- L'hypericine

L'hypericine (figure 17) est connue comme agent photosensible depuis une trentaine d'années (Rose, 1965), mais c'est récemment que son utilisation anticancéreuse et antivirale a été étudiée (Hudson *et coll.*, 1991a, 1991b).

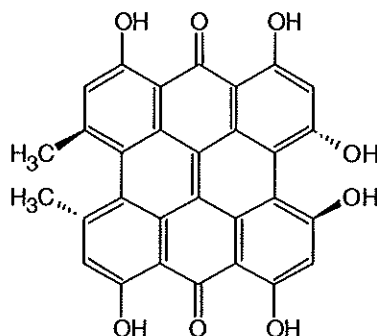


Figure 17 : Structure de l'hypericine

I.2.3.2 - *Les xanthènes*

Les colorants xanthènes peuvent être divisés en deux groupes principaux : les dérivés diphenylméthane (les pyronines) et les dérivés triphenylméthane (principalement les phthaléines). Parmi les phthaléines existent la fluorescéine (groupe hydroxy), la rhodamine (groupe amino) et les composés mixtes (hydroxy et amino).

a- La fluorescéine

Il y a quelques années, les propriétés spectrales, photophysiques et photochimiques, (spécialement la production d'oxygène singulet) de la fluorescéine (figure 18) et de ses dérivés comme le Rose Bengale, l'éosine et l'érythrosine ont été largement étudiées (Neckers, 1989 ; Gollnick *et coll.*, 1992). Les fluorescéines, et particulièrement le Rose Bengale, ont largement été étudiées pour la photo-inactivation de micro-organismes (bactéries ou levures) (Banks *et coll.*, 1985).

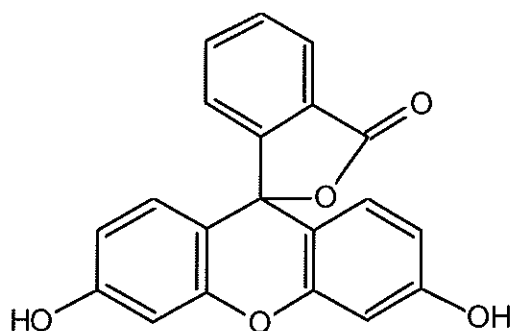


Figure 18 : Structure de la fluorescéine

b- Les rhodamines

Les rhodamines sont utilisées comme colorants pour les lasers et comme agents photothérapeutiques potentiels. La plus importante est la rhodamine 123 (figure 19), elle possède un maximum d'absorption à 500 nm avec un épaulement à 475 nm. Son émission de fluorescence maximale se situe à environ 530 nm avec un rendement quantique de fluorescence important (égal à 0,9) mais son efficacité phototoxique est contestée. La rhodamine 123 est une molécule lipophile avec une charge positive délocalisée qui favorise son accumulation dans les mitochondries. C'est pourquoi elle est habituellement utilisée pour marquer les mitochondries des cellules vivantes.

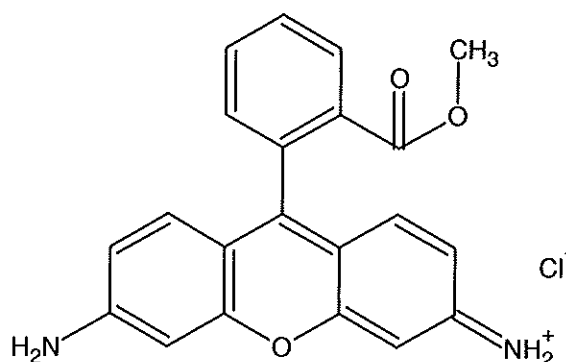


Figure 19 : Structure de la rhodamine

I.2.3.3 - *Les cyanines*

Développées à l'origine pour les émulsions photographiques, les cyanines sont depuis le milieu des années 70 reconnues comme agents diagnostiques et photothérapeutiques. C'est leur grande affinité pour les cellules cancéreuses qui explique leur intérêt dans la PDT des tumeurs.

a- La mérocyanine 540

L'affinité et la phototoxicité sélective de la mérocyanine 540 (MC540) pour différents types de cellules normales ou néoplasiques et de virus ont été exploitées pour la purge sélective de cellules de leucémie ou de lymphome dans le cadre de la greffe de moelle autologue. Sa phototoxicité est relativement importante par comparaison avec d'autres agents

comme l'HpD. Cependant son absorption dans les courtes longueurs d'ondes limite ses applications aux tumeurs superficielles (figure 20).

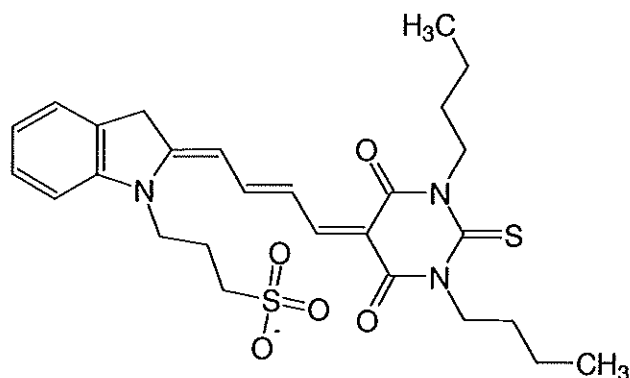


Figure 20 : Structure de la mérocyanine 540

b- Autres cyanines

A la différence de la MC540, la plupart des cyanines utilisées en PDT sont des composés qui pénètrent facilement la membrane. Les kryptocyanines ont une haute sélectivité tumorale, une forte absorption dans le rouge, une toxicité minimale dans l'obscurité, une faible photosensibilité de la peau et un seul mode d'action : de nombreuses propriétés qui en font des agents photochimiques intéressants.

Les colorants chalcogenapyrylium induisent des dommages mitochondriaux en présence de lumière ou non. Malgré leur instabilité photochimique et leur toxicité substantielle dans l'obscurité, leur sélective efficacité photochimique envers les cellules tumorales peut être un atout en PDT.

I.2.3.4 - Les colorants cationiques

Nous pouvons citer plusieurs colorants dont les propriétés photochimiques ont été reportées : les colorants phénoxanine, phénothiazine (comme le bleu de méthylène) et l'acridine. Les colorants thiazine et l'acridine ont été les premiers agents utilisés en PDT antivirale.

I.3 - Les réactions photochimiques

La cytotoxicité par PDT a principalement lieu grâce à deux réactions photooxydatives (figure 21). La photooxydation de type I implique une réaction directe du sensibilisant excité avec le substrat par un mécanisme impliquant l'hydrogène ou un transfert d'électron pour former des radicaux transitoires qui vont réagir avec l'oxygène. Dans la réaction de type II, il y a transfert d'énergie de l'état triplet du photosensibilisant à l'oxygène moléculaire pour produire de l'oxygène singulet et réagir ensuite avec les substrats susceptibles d'oxyder.

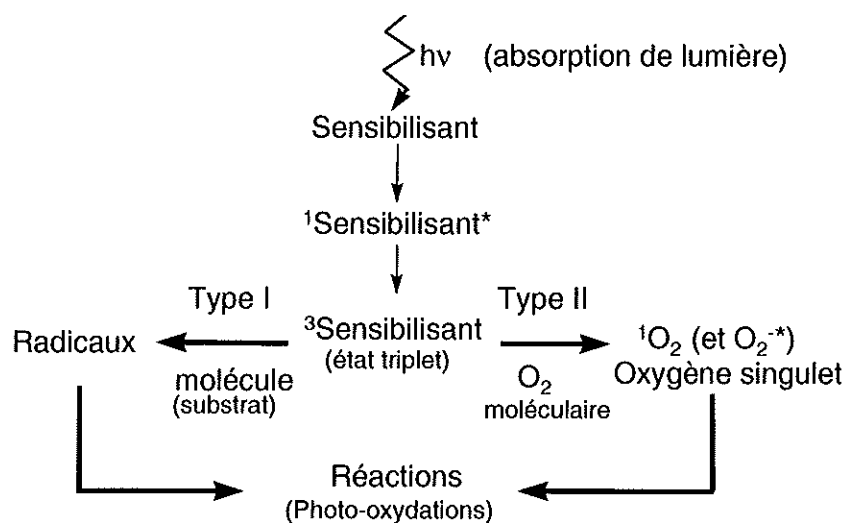
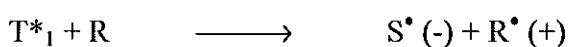


Figure 21 : Réactions photochimiques résultant de l'état triplet du sensibilisant

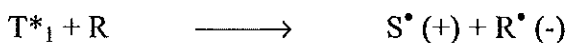
I.3.1 - Réactions de type I

Le photosensibilisant réagit à l'état triplet avec une molécule voisine, soit par arrachement d'un atome d'hydrogène, soit par transfert d'un électron, ou avec un substrat oxydant. Ces interactions conduisent à la formation de radicaux libres ou d'ions radicaux.

Réaction avec une molécule voisine :



Réaction avec un substrat oxydant :

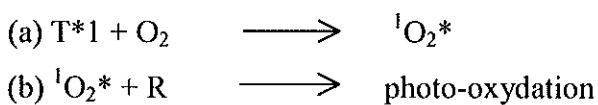


Les radicaux libres ou ions radicaux réagissent instantanément avec l'oxygène et génèrent une variété d'intermédiaires de l'oxygène hautement réactifs, comme le radical anion superoxyde $O_2^{\bullet -}$ ou hydroxyle $OH^{\bullet}$ (-).

Le rôle des radicaux libres est connu depuis 1940 du fait de leur implication importante dans les dommages créés par les radiations ionisantes. De plus, en 1968, Gollnick a postulé que l'effet tumoricide de la PDT pouvait être initié par des réactions radicalaires (Gollnick *et coll.*, 1968).

I.3.2 - Réactions de type II

C'est le mécanisme le plus couramment observé. Dans ce cas, l'énergie du photosensibilisant excité est transmise à l'oxygène présent *in situ* qui passe alors à un état excité sous forme d'oxygène singulet hautement réactif. Au cours de cette réaction, l'oxygène passe de son état fondamental triplet à son état excité singulet (a). Par la suite, cet oxygène peut engendrer des réactions de photo-oxydation (b).



C'est dès 1976 que Weishaupt et ses collaborateurs postulèrent que cet oxygène singulet était l'agent cytotoxique responsable de la photoactivation des cellules tumorales (Weishaupt *et coll.*, 1976). L'interaction de l'oxygène singulet avec les cibles intracellulaires conduit par conséquent à des dommages au niveau des membranes cellulaires, des mitochondries et des lysosomes qui induisent la nécrose de la tumeur.

En général, la photochimie de type I est favorisée sous des conditions anaérobies, alors que de fortes concentrations en oxygène peuvent forcer une réaction de type radicalaire typique en une réaction de type II. Par conséquent, le mécanisme de mort cellulaire nécrotique dépend au moins partiellement de la disponibilité de l'oxygène au(x) site(s) de traitement.

I.3.3 - Réactions de type III

Ils englobent toutes les réactions qui entraînent la photoaltération de biomolécules en l'absence d'oxygène. Pour ce faire, des conditions particulières sont requises : un système anaérobie ou une concentration saturée en réactifs (Laustriat *et coll.*, 1986).

II - Aspects cellulaires de la PDT des cancers

II.1 - PDT et mort cellulaire

La mort cellulaire induite par PDT est un processus complexe impliquant deux mécanismes principaux : l'apoptose et la nécrose.

II.1.1 - L'apoptose

L'apoptose, aussi appelée "mort cellulaire programmée" est un processus essentiel au maintien du renouvellement tissulaire, de la taille et de la forme des tissus dans les processus physiologiques mais aussi pathologiques (Vaux *et coll.*, 1999). L'apoptose est définie par des caractéristiques morphologiques précises comme le rétrécissement cellulaire accompagné de la condensation nucléaire et de la boursouffure de la membrane plasmique. L'activation d'endonucléases durant le processus d'apoptose génère le clivage de la chromatine en fractions oligonucléosomales ou multiples de 180-200 pb (Waring *et coll.*, 1991). Ces fragments nucléaires sont localisés dans des fragments cytoplasmiques de forme circulaire ou ovoïde appelés corps apoptotiques. Ces corps apoptotiques restent dans un premier temps en suspension dans le milieu cellulaire pour finalement entamer un processus dégénératif appelé nécrose secondaire et entraînant une perturbation des organites puis la rupture membranaire (Sheridan *et coll.*, 1981).

II.1.2 - La nécrose

Les principales caractéristiques morphologiques de la nécrose sont le gonflement de la cellule puis sa rupture, la perte de la chromatine ainsi que des noyaux très sombres et de petite taille. La nécrose survient uniquement en réponse à une forme pathologique de lésion cellulaire, provoquant généralement une réponse inflammatoire au niveau tissulaire (Masson, 1999).

II.2 - PDT et cibles cellulaires

La localisation subcellulaire des photosensibilisants (lysosomes, mitochondries, et/ou membranes cellulaires) dépend essentiellement de leur nature et de la lignée cellulaire étudiée (Oleinick et Evans, 1998 ; Kessel, 1997). Les sites intracellulaires de photodestruction ne correspondent pas nécessairement aux sites de fixation du photosensibilisant dans la cellule mais plutôt aux paramètres de PDT utilisés, comme la concentration en photosensibilisant, la durée de l'incubation mais aussi la durée de l'irradiation et la puissance délivrée par le laser (Boyle, 1996). Les principales altérations sont schématisées figure 22, et touchent les organites cellulaires suivants :

➤ Les mitochondries : elles subissent une inactivation des divers constituants de la chaîne respiratoire (cytochrome C oxydase, succinodéshydrogénase, etc...) ainsi qu'une augmentation de leur volume.

➤ Les lysosomes : ils subissent une peroxydation de leur membrane conduisant à la libération des hydrolases acides lysosomiales dans le cytoplasme de la cellule alors endommagée.

➤ La membrane plasmique : elle change d'un point de vue morphologique (boursoufflement superficielle), chimique et fonctionnel (altération des systèmes de transport d'ions par exemple) (Masson, 1999).

➤ Les acides nucléiques :

Il a été reconnu que la PDT pouvait être génotoxique et endommager les acides nucléiques (Villanueva *et coll.*, 1993 ; Evensen et Moan, 1982). Aussi, la guanine (base purique) est la cible majeure détruite par photooxydation lorsque le photosensibilisant franchit l'enveloppe nucléaire. Des recombinaisons entre brins d'ADN tout comme des pertes de fragments d'ADN, des associations avec des protéines ou la condensation de chromatine ont été observées.

➤ Les acides aminés, peptides et protéines :

Les acides aminés, tels que la méthionine, l'histidine, le tryptophane, la tyrosine et la cystéine, sont sensibles à la photooxydation et leur destruction a pour conséquence la désactivation d'enzymes. Il va y avoir des pontages inter-protéines, des changements de conformation conduisant à l'altération structurale et fonctionnelle de protéines de structure ou d'enzymes (Oleinick *et coll.*, 1998).

➤ Les microtubules :

Un arrêt du cycle cellulaire en métaphase, la réduction du nombre de microtubules et la destruction de leur structure ont été observés lors de traitements par PDT (Winkelman *et coll.*, 1993 ; Stockert *et coll.*, 1996).

➤ Les lipides :

Les acides gras insaturés et le cholestérol sont altérés par l'oxygène singulet $^1\text{O}_2^*$ au niveau des doubles liaisons. Il y a alors synthèse d'hydropéroxydes allyliques. L'une des conséquences les plus précoces de l'irradiation des cellules est une inhibition de la synthèse des phospholipides due à l'altération des enzymes contrôlant cette synthèse.

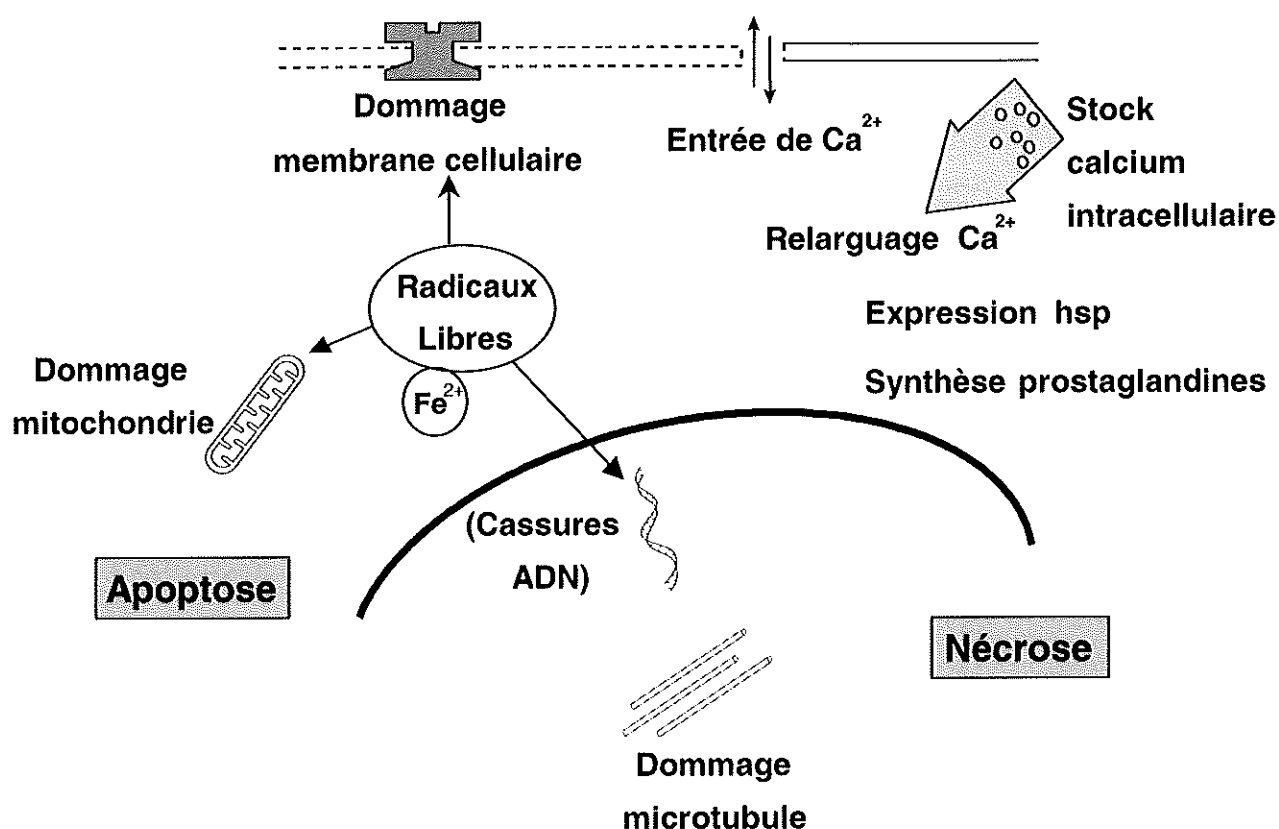


Figure 22 : Principales cibles des espèces oxydantes produites par PDT

III - Les applications cliniques de la PDT

III.1 - Les applications non anticancéreuses

III.1.1 - La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA)

Il s'agit d'une altération du fond de l'oeil atteignant principalement les personnes de plus de 65 ans, qui se traduit par une baisse progressive de la vision aboutissant à une perte de la vision centrale. Ces patients ne deviennent pas aveugles mais perdent tout le champ de vision utile pour la lecture, la conduite, la vision fine. Ainsi ils gardent généralement une autonomie avec possibilité de se déplacer, de se promener, mais ne peuvent plus lire, regarder la télévision ou conduire. On estime que 12% de la population entre 65 ans et 75 ans présente une dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), et ce nombre augmente chaque jour. En France, il s'agit de la première cause de malvoyance.

La visudyne® (verteporfine), mise au point par les laboratoires Ciba Vision en collaboration avec la société QLT (Vancouver, Canada) spécialisée en laser pour PDT, a reçu une A.M.M. aux USA en novembre 1999 et en 2000 pour la France pour le traitement de la DMLA. La localisation vasculaire du sensibilisant immédiatement après injection permet, associé à une irradiation lumineuse à 690 nm, de traiter cette maladie.

III.1.2 - Les kératoses actiniques

Les kératoses actiniques sont un état précancéreux causé habituellement par une exposition solaire, leur développement en carcinome malpighien apparaît dans environ 20% des cas. Selon les meilleures estimations, une personne sur six développera une kératose actinique au cours de sa vie. Du fait des altérations de la couche d'ozone liées à la pollution atmosphérique, on estime qu'un australien sur deux de race blanche a un épithélioma cutané à 50 ans. Si le pronostic est généralement favorable, l'incidence économique est cependant majeure.

Le Levulan® (acide delta-aminolévulinique) a reçu une A.M.M. aux USA (février 2000, commercialisé par Schering-Plough) pour le traitement des kératoses actiniques. Cette

molécule qui n'est pas protégée en Europe va être développée par Schering AG en partenariat avec la société allemande Medac.

Le Metvix[®] (ALA methylester), commercialisé par la société Photocure, a reçu en 2002 une A.M.M. pour le traitement des états précancéreux de la peau et des kératoses actiniques. Le Metvix[®] est distribué par les laboratoires Galderma-L'Oréal.

III.2 - Les applications en Cancérologie

III.2.1 - Le photodiagnostic

La propriété de fluorescence des agents photosensibles peut être utilisée pour effectuer une photodétection de cancers non visibles en lumière normale et ceci au temps diagnostic ou en per-opératoire (résection de tumeurs assistée par fluorescence). Le Levulan[®] est actuellement en essais cliniques pour ces 2 applications : pour la photodétection du cancer de la vessie et pendant la résection de tumeurs malignes du cerveau. Il sera donc possible de détecter des cancers infra-cliniques de la vessie en endoscopie. De plus, le neurochirurgien aura la possibilité de détruire le tissu tumoral aussi complètement que possible pendant l'intervention.

D'autre part, le Levulan[®] en application topique donne également de très bons résultats pour la détection par fluorescence et le traitement des tumeurs superficielles de la peau telles que les carcinomes baso-cellulaires (figure 23).

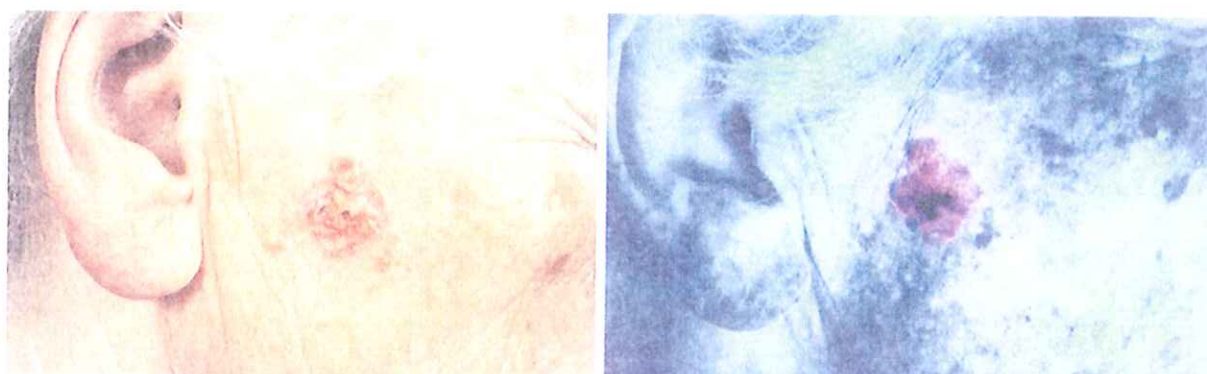


Figure 23 : Carcinome baso-cellulaire (à gauche). Fluorescence de la PpIX après application topique d'ALA (20%) et irradiation avec une lumière de Wood à 370-405 nm (à droite).

III.2.2 - Les applications thérapeutiques

Le Photofrin[®] (SANOFI-Winthrop) est le premier photosensibilisant à avoir été commercialisé. Ce dernier a reçu entre 1993 et 1998 plusieurs A.M.M. dans différents pays : au Canada pour le traitement des cancers de la vessie, aux Pays-Bas et en France pour le traitement des cancers avancés de l'oesophage et du poumon, en Allemagne pour le cancer précoce du poumon, au Japon pour les cancers précoces du poumon, de l'oesophage, les cancers gastriques et les cancers cervicaux, et aux Etats Unis pour le cancer avancé de l'oesophage. D'autres études avec le Photofrin[®] sont en cours pour des traitements curatifs (cancer de l'oesophage de Barrett, cancer de la tête et du cou, cancer superficiel de la vessie...) mais aussi palliatifs (tumeurs du cerveau, cancers de la tête et du cou, tumeurs intrathoraciques, tumeurs intrapéritonéales...)

La m-THPC (Foscan[®]) a reçu en 2001 aux USA l'A.M.M. pour le traitement premier des cancers ORL et est en essais cliniques aux USA et en Europe pour les cancers de la tête et du cou. D'autres photosensibilisants sont également en essais cliniques. Par exemple, la benzoporphyrine dérivée monoacide A (BPD-MA ou Visudyne[®]) est en phase I/II pour le traitement des cancers de la peau et la N-aspartyl chlorine (NPe6) est en essais au Japon pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules.

Les principaux photosensibilisants en phase d'évaluation clinique ainsi que leurs principales caractéristiques sont rappelés dans le tableau de l'annexe 1.

Les indications en France sont très restrictives par rapport aux USA et au reste de l'Europe et sont limitées à des traitements palliatifs. La PDT est particulièrement importante pour ces applications endoscopiques. Son développement est donc lié à celui du photodiagnostic endoscopique. Notons que 50% des cancers diagnostiqués le sont aujourd'hui par endoscopie.

IV - Aspects physiques de la PDT

L'interaction de la lumière avec la matière est à la base de nombreuses techniques d'analyse non destructives parmi lesquelles les méthodologies qui utilisent le phénomène d'émission de fluorescence suscitent actuellement un vif intérêt dans de nombreux domaines de la recherche scientifique.

IV.1 - La lumière

La nature de la lumière a été dès l'antiquité un sujet de préoccupation pour les philosophes. La lumière aurait été formée de corpuscules, appelés simulacres, qui seraient émis par les objets lumineux et qui se propageraient en ligne droite à très grande vitesse. Au XVII^{ème} siècle, Newton parvient à expliquer les phénomènes de réflexion, de réfraction et d'absorption et à démontrer que la lumière blanche est composée de lumières simples colorées. A la même époque, Huyghens émet l'hypothèse d'une lumière qui serait formée d'ondes se propageant dans un milieu invisible : l'éther.

C'est à la fin du XIX^{ème} siècle que les propriétés de la lumière furent analysées de façon rationnelle grâce aux travaux du scientifique danois Finsen. Celui-ci utilisa un filtre en quartz muni d'un système de refroidissement à eau lui permettant de sélectionner les ultraviolets de la lumière solaire ou de la lumière produite par un arc électrique. C'est au cours de ce siècle que nous avons appris ce qu'était la lumière. Celle-ci correspond à la portion visible du spectre électromagnétique, c'est-à-dire les longueurs d'onde comprises entre 400 nm et 780 nm (tableau 1).

Couleurs	Longueurs d'onde (nm)	Fréquences (THz)
rouge	780-622	384-482
orange	622-597	482-503
jaune	597-577	503-520
vert	577-492	520-610
bleu	492-455	610-659
violet	455-390	659-769

Tableau 1 : Correspondance entre les couleurs et les longueurs d'onde du spectre électromagnétique

Pour comprendre l'interaction de la lumière avec la matière, il fut nécessaire de la considérer comme composée de paquets d'énergie appelés "quanta". Plus tard, ces quanta se comportant comme des particules prendront le nom de photons (Lewis, 1926). L'énergie par photon est reliée à la longueur d'onde (λ) et à la fréquence (ν) par :

$$E = h\nu = hc/\lambda \quad \text{avec } h \text{ la constante de Planck.}$$

Les échanges entre la matière et le rayonnement lumineux vont être la source de transitions électroniques au sein de la matière.

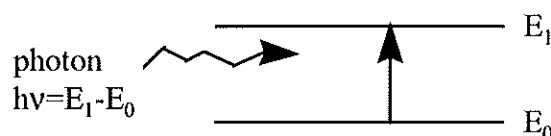
IV.2 - Les transitions électroniques

La matière est constituée d'atomes. Un atome est lui-même constitué d'un noyau autour duquel gravitent les électrons. A chaque position des électrons correspond une énergie déterminée de l'atome (niveau d'énergie). Lorsque les électrons sont le plus près possible du noyau, alors l'atome est stable et a une énergie minimale. L'atome peut aussi être excité (un électron est sur une orbitale externe), ou ionisé (un ou plusieurs électrons ont alors quitté l'atome) ce qui augmente son niveau d'énergie.

La matière peut interagir avec la lumière et l'atome peut donc passer d'un niveau d'énergie à l'autre par trois mécanismes différents : l'absorption, l'émission spontanée et l'émission stimulée.

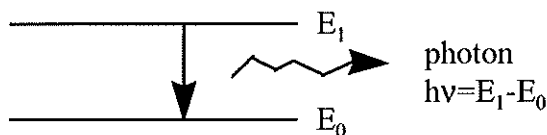
IV.2.1 - L'absorption

Une particule peut absorber un photon de diverses sources extérieures et passer dans un état d'énergie supérieur.



IV.2.2 - L'émission spontanée

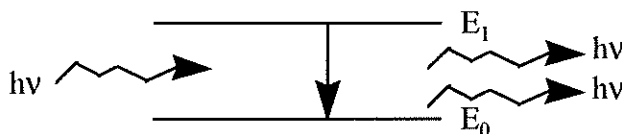
Une particule dans un état d'énergie excité peut céder de l'énergie sous forme d'un photon lumineux.



Cette émission s'effectue à une fréquence déterminée mais dans une direction et à une phase totalement aléatoires. S'il s'agit de photons, on parlera d'émission de fluorescence.

IV.2.3 - L'émission stimulée

Un photon interagissant avec un atome excité peut provoquer l'émission d'un deuxième photon qui a la même direction et la même fréquence que le photon incident.



Les photons émis par émission stimulée sont en phase avec les photons d'excitation. Ils se propagent dans la même direction, ont la même polarisation et la même énergie. Ainsi, l'émission stimulée est une source de lumière cohérente dont rien ne permet de distinguer l'onde induite de l'onde inductrice puisque tous les paramètres qui les définissent (fréquence, phase, polarisation,...) sont identiques.

L'émission stimulée est à la base du fonctionnement d'un LASER.

Après absorption d'énergie lumineuse, certaines molécules, comme les photosensibilisants, ont la propriété d'émettre dans toutes les directions de l'espace des radiations lumineuses de longueur d'onde différente (plus courte) de celle de la lumière excitatrice. De tels phénomènes sont connus sous le nom de photoluminescence, terme regroupant la phosphorescence et la fluorescence.

Le photosensibilisant dans son état singulet excité peut perdre son énergie et retomber dans son état fondamental de plusieurs manières décrites dans le diagramme de Jablonski (figure 24).

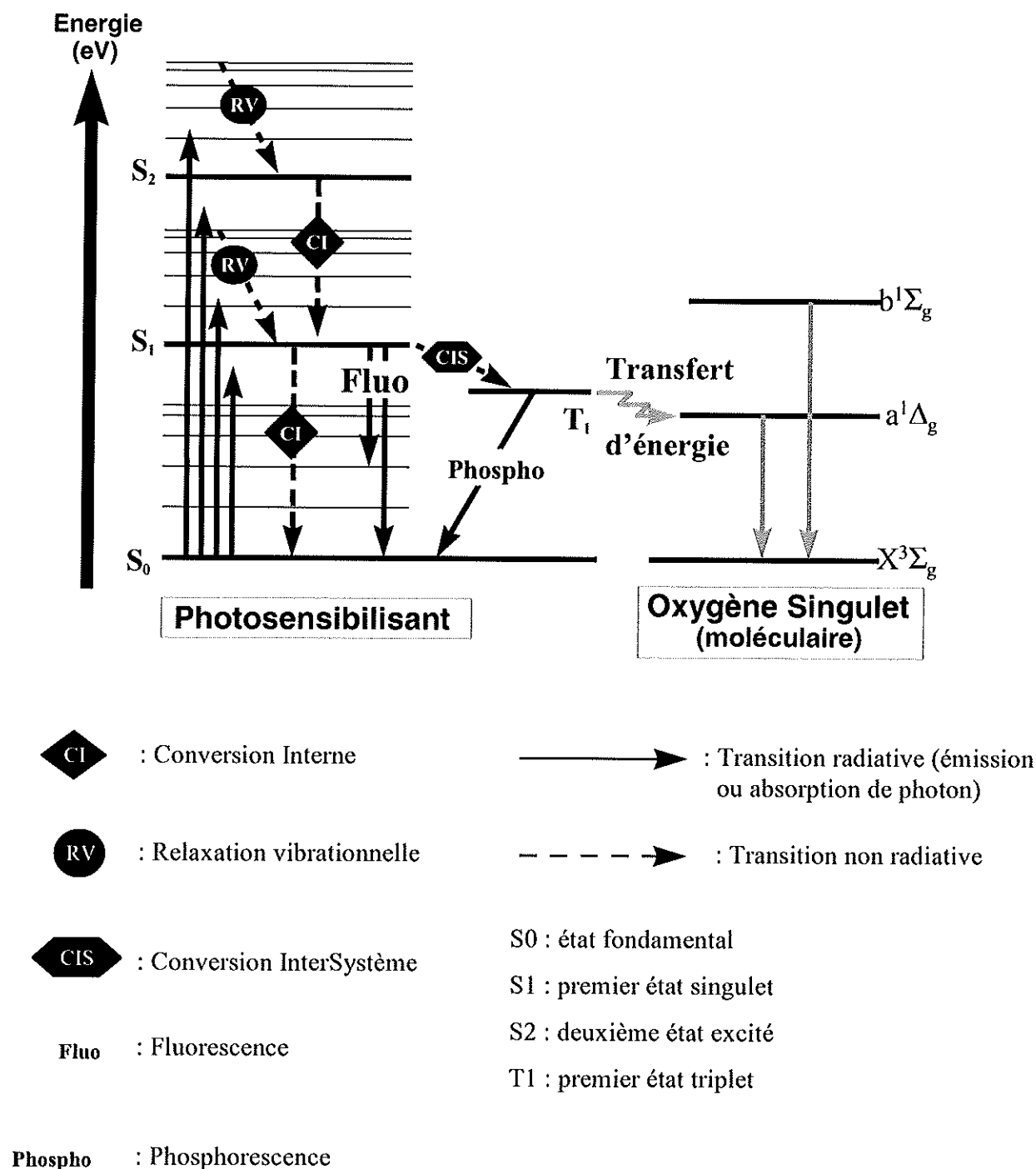


Figure 24 : Diagramme de Jablonski

Le photosensibilisant dans son état singulet excité peut perdre son énergie :

- soit en émettant une radiation de fluorescence,
- soit en dissipant son énergie sous forme de chaleur (conversion interne),
- soit en se faisant "éteindre" par contact avec une autre molécule (phénomène de Quenching),
- soit en subissant une dissociation intramoléculaire donnant des radicaux.

Le changement d'état d'une molécule est souvent accompagné de l'excitation d'un état vibrationnel. Cet état se désactive par relaxation thermique, et la molécule se retrouve dans un état vibrationnel (de l'état excité) de moindre énergie. C'est le processus de relaxation vibrationnelle d'une durée inférieure à 10^{-13} seconde.

Le photosensibilisant peut également passer dans un état triplet excité par conversion intersystème (au moins deux électrons périphériques sont en rotations parallèles). Ce processus de désactivation, favorisé par un faible écart énergétique entre l'état singulet excité et l'état triplet qui lui est juste inférieur et une augmentation de la durée de vie de l'état singulet excité, rentre en compétition avec l'émission de fluorescence. La transition radiative alors observée entre l'état triplet et l'état fondamental est connue sous le terme de phosphorescence.

Le photosensibilisant dans son état triplet excité par conversion intersystème peut également donner par transfert d'énergie les réactions de type I et II décrites auparavant. Dans les réactions de type I, les sensibilisants excités interagissent directement avec le substrat et/ou les molécules du solvant pour produire des espèces radicalaires. La majorité de ces radicaux réagissent instantanément avec l'oxygène et génèrent une variété d'intermédiaires de l'oxygène hautement réactifs, comme l' $O_2^{\bullet}$ et l' $OH^{\bullet}$, c'est à dire des composés connus pour oxyder une variété de biomolécules. Dans les réactions de type II, les sensibilisants excités transfèrent de l'énergie à l'oxygène moléculaire qui passe alors à son état excité singulet hautement réactif.

IV.3 - La production d'oxygène singulet

Weishaupt *et coll.* ont postulé en 1976 que le photosensibilisant à l'état triplet excité pouvait interagir avec l'oxygène moléculaire et générer de l'oxygène singulet (1O_2). Cette réaction est très rapide et est la plus répandue dans le phénomène de désexcitation de l'état triplet.

L'état fondamental de la molécule d'oxygène est l'état triplet. Cette molécule est constituée de deux atomes d'oxygène reliés entre eux par une liaison covalente.

Comme l'état excité du photosensibilisant a une durée de vie très courte, il transmet son énergie à l'oxygène moléculaire pour créer l'oxygène singulet, une forme toxique de l'oxygène. Moins efficacement, le photosensibilisant peut aussi transférer un électron à l'oxygène, produisant ainsi une molécule de photosensibilisant oxydée et un ion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce phénomène de transfert d'électron est cependant très rare, moins de 1 sur 100 des phénomènes de désactivation de l'état triplet avec l'oxygène.

L'interaction de l'oxygène singulet avec les cibles intracellulaires (membranes cellulaires, mitochondries, lysosomes ou noyaux) induit la destruction du tissu tumoral.

IV.4 - L'émission de fluorescence

Dans le cas où un quantum d'énergie serait absorbé par un atome ou une molécule, celui-ci est porté à un niveau énergétique plus élevé que le niveau de départ. Ce niveau excité est instable et l'énergie acquise doit être éliminée (Hecht, 1987 ; Harris *et coll.*, 1988).

Dans le cas de l'atome, et pour le passage au niveau énergétique immédiatement inférieur, il y a réémission d'un photon, mais dans celui d'une molécule, l'énergie acquise peut être dissipée par un certain nombre de mécanismes : transformation en chaleur, vibrations des atomes constituant la molécule. Il n'y a donc pas normalement de lumière réémise.

Cependant, dans certaines molécules, où la présence de cycles entrave les mouvements et donc la déperdition de l'énergie, une partie de celle-ci est émise sous forme de radiation lumineuse pour permettre le retour de la molécule à son niveau d'énergie initial. C'est le phénomène de fluorescence où la radiation émise a une fréquence plus faible que la radiation absorbée. Ceci est compréhensible puisque l'énergie réémise sous forme d'un photon est plus faible que l'énergie absorbée (loi de Stokes). C'est ainsi que de nombreux composés organiques, irradiés en lumière ultraviolette, fluorescent dans le domaine du visible.

Cette capacité à émettre de la lumière après absorption lumineuse caractérise les photosensibilisants (sauf exception). En effet, ces substances pouvant induire une toxicité au niveau tissulaire après absorption lumineuse peuvent également être détectées par fluorimétrie. La fluorescence émise est utilisée pour son dosage au niveau cellulaire et pour déterminer sa biodistribution cellulaire ou tissulaire.

La spectrométrie de fluorescence étudie l'émission de lumière par des molécules excitées au moyen d'un faisceau lumineux (absorption photonique). Ses applications sont de plus en plus nombreuses notamment pour l'analyse de médicaments, de substances naturelles et de métabolites. L'étude de la fluorescence comporte :

- un aspect qualitatif avec l'étude des pics de fluorescence (position, forme),
- un aspect quantitatif avec l'étude de l'intensité de fluorescence et de la capacité de la molécule à réémettre les photons absorbés (rendement quantique de fluorescence), ainsi que la vitesse à laquelle la décroissance de fluorescence est observée.

La fluorescence est un processus radiatif qui entre en compétition avec des processus non radiatifs tels que la conversion interne (transformation de l'énergie en chaleur), la conversion intersystème (phosphorescence) ou encore la réaction photochimique. Pour qu'une molécule soit fluorescente, plusieurs caractéristiques sont nécessaires :

- la probabilité d'absorption doit être grande,
- l'énergie de transition électronique doit être faible pour éviter la photodissociation,
- l'électron qui subit la transition ne doit pas se trouver dans une orbitale trop impliquée dans une liaison sinon la photodissociation est possible,
- la molécule ne doit pas contenir d'atomes ou de groupements qui favorisent les processus non radiatifs.

Lorsque ces conditions sont remplies, la fluorescence d'une molécule est observable à condition que le milieu ne renferme pas d'inhibiteur de la fluorescence. Enfin, la molécule que l'on cherche à exciter peut elle-même être "quenchée" c'est-à-dire que sa fluorescence peut être inhibée à certaines concentrations.

OBJET DE LA THÈSE

Dans ce travail, nous étudierons l'influence de différents facteurs sur la stabilité de l'ALA en solution à travers une analyse à la fois indirecte pour ce qui est de l'ALA lui-même et directe pour ce qui concerne son efficacité. Nous ferons varier la concentration en ALA (concentrations finales de 0, 20, 50, 100 et 200 µg/ml), la température de stockage des différentes solutions (4°C, 21°C et 37°C), la nature des solvants de dilution (tampon imidazole pH 7,4, tampon tris-maléate pH 7,4, tampon diméthylaminoéthylamine pH 7,4, PBS, RPMI et eau pour préparation injectable) ainsi que le temps entre la préparation des différentes dilutions d'ALA et leur incubation avec les cellules.

L'objectif de notre étude est de quantifier la dégradation de l'ALA, ou sa perte d'efficacité, afin de pouvoir développer une forme utilisable en biologie ou en clinique où l'ALA sera le moins instable possible. Pour cela, la stabilité de l'ALA en solution sera évaluée en utilisant des cultures cellulaires et en suivant d'une part la capacité de l'ALA à synthétiser la PpIX par des mesures de fluorescence, puis nous analyserons la phototoxicité de l'ALA en mesurant le pourcentage de cellules survivantes après deux heures d'incubation avec l'ALA et irradiation par une diode laser. Les cellules C6 ont été sélectionnées en vue d'une application éventuelle pour le traitement des tumeurs cérébrales et leur photodiagnostic.

Il nous faut donc au préalable définir plus précisément la synthèse de la protoporphyrine IX au cours de la biosynthèse de l'hème, les avantages de l'ALA-PDT et ses applications cliniques ainsi que l'influence que sont susceptibles d'avoir la concentration, la température, le temps et les solvants de dilution sur la stabilité de l'ALA en solution.

I - Le cycle de biosynthèse de l'hème

L'hème, un pigment tétrapyrrolique contenant du fer, est un constituant des protéines liant l'oxygène et le coenzyme de différentes oxydoréductases dans la chaîne respiratoire (cytochromes), dans la photosynthèse ainsi que dans les mono-oxygénases et les peroxydases. La vie cellulaire et le corps tout entier sont donc crucialement dépendant de la biosynthèse et du métabolisme des porphyrines. La plupart des types cellulaires du corps humain, à l'exception des globules rouges matures, possèdent l'équipement enzymatique nécessaire permettant la synthèse de l'hème mais cette synthèse est quantitativement plus importante dans la moelle hématopoïétique et le foie. C'est l'action limitante de la ferrochélatase qui permet d'obtenir une accumulation de PpIX après addition d'ALA exogène.

I.1 - La biosynthèse de l'hème

Le cycle de la biosynthèse de l'hème consiste en 8 étapes catalysées par une enzyme et localisées entre la mitochondrie et les compartiments cytosoliques de la cellule. L'étape initiale de la biosynthèse de l'hème est la formation d'ALA (figure 25).

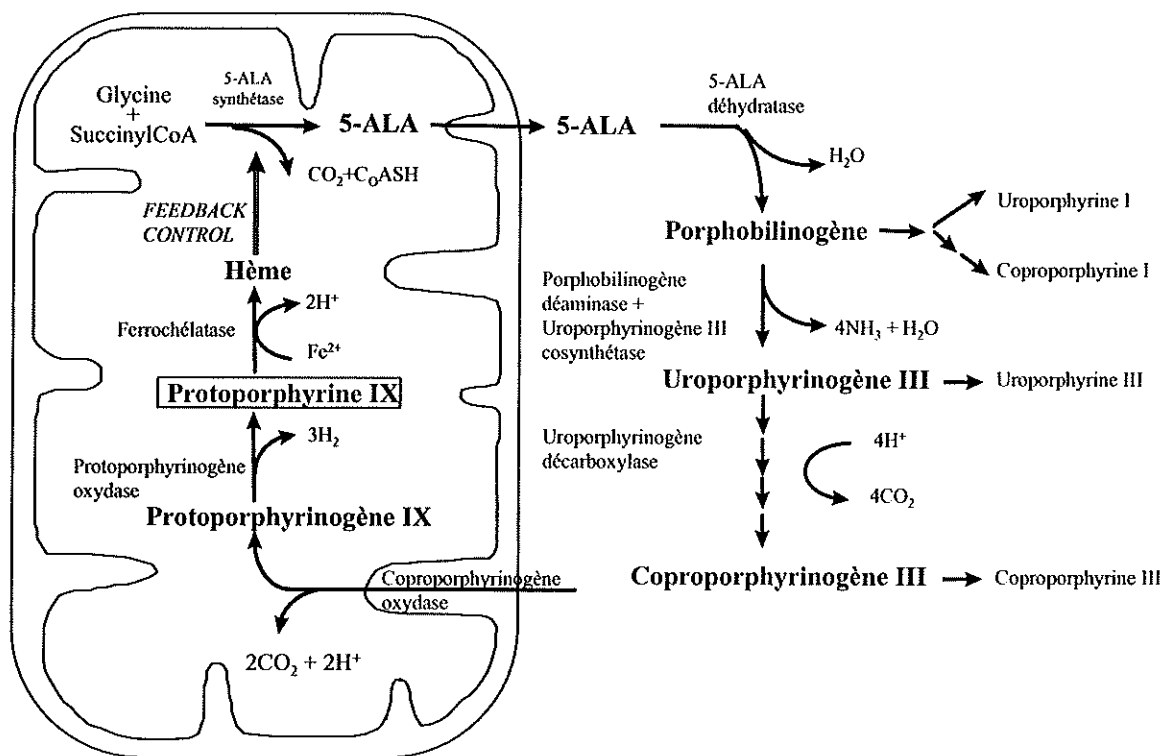


Figure 25 : Biosynthèse de l'hème

Pour les mammifères et les bactéries photosynthétiques, l'ALA est formé de glycine et de succinyl-CoA par l'enzyme ALA synthétase (Peng *et coll.*, 1997b). Cette enzyme est localisée dans la matrice de la membrane mitochondriale interne et est faiblement associée à cette membrane (Scotto *et coll.*, 1983). L'enzyme a une fonction régulatrice principale du cycle.

L'enzyme suivante, l'ALA déhydratase (ALAD) est localisée dans le cytosol et induit la condensation de 2 molécules d'ALA pour produire la porphobilinogène (PBG) avec l'élimination de 2 molécules d'eau.

L'action combinée de la PBG déaminase (PBGD) et de l'uroporphyrinogène III cosynthétase condensent 4 molécules de PBG et cyclisent la chaîne tétrapyrrole pour former l'uroporphyrinogène III. Les deux enzymes sont localisées dans le cytosol et l'action de la

PBGD est une étape taux limitante. Une série de décarboxylations et d'oxydations prennent place avant que le fer ne soit inséré dans l'anneau tétrapyrrolique. Cette première partie du processus se déroule dans le cytosol sous l'action de l'uroporphyrinogène décarboxylase. Cette enzyme enlève 4 groupes carboxyles d'acide acétique de l'uroporphyrinogène pour former la coproporphyrinogène tétracarboxylique. Au niveau de l'uroporphyrinogène III, les chemins de formation des différentes classes de tétrapyrroles divergent.

La coproporphyrinogène III, pour être utilisée dans la synthèse de l'hème, est maintenant exposée à la coproporphyrinogène oxydase, laquelle est située dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie (Grandchamp *et coll.*, 1978). L'enzyme décarboxyle et oxyde les chaînes propioniques d'anneaux A et B en groupes vinyles et la protoporphyrinogène IX est formée.

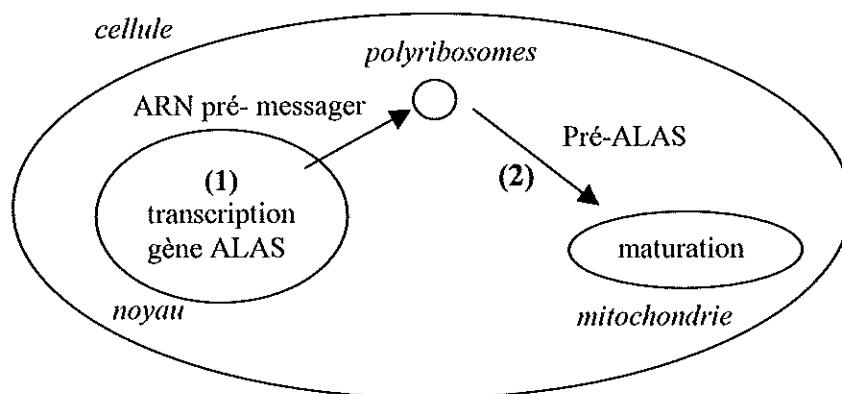
L'étape finale de la synthèse de PpIX est l'oxydation du noyau tétrapyrrole par retrait de 6 hydrogènes de la protoporphyrinogène IX, catalysée par la protoporphyrinogène oxydase. L'enzyme est enfouie dans la membrane mitochondriale interne avec ses sites actifs sur la matrice de la membrane (Ferreira *et coll.*, 1988). C'est une enzyme oxygène dépendante avec une haute spécificité pour le substrat. La protoporphyrinogène IX peut s'oxyder spontanément en PpIX, mais ceci est moins probable dans la mitochondrie où la protoporphyrinogène IX est plutôt exposée à un environnement anaérobie et réducteur.

La structure tétrapyrrolique est maintenant prête pour l'incorporation du fer, laquelle est catalysée par la ferrochélatase. La ferrochélatase est localisée dans la membrane interne mitochondriale.

I.2 - Régulation du cycle de biosynthèse

Le cycle est en partie régulé par la disponibilité du substrat et l'inhibition rétrocontrôle de l'ALA synthétase (ALAS). La régulation s'explique en effet majoritairement par cette enzyme, les autres enzymes intervenant dans la biosynthèse étant en concentration non limitée dans la cellule. C'est plus précisément sur la synthèse de l'ALA synthétase que s'effectue la régulation. Au niveau du noyau se déroule la transcription du gène de l'ALA synthétase conduisant à l'obtention d'un ARN pré-messager. Ce dernier passe alors dans le cytoplasme où s'effectue la synthèse du précurseur de l'ALAS sur les polyribosomes libres. Elle est synthétisée en dehors de la mitochondrie sur les polyribosomes libres du cytoplasme quoique fonctionnant dans la matrice mitochondriale. Cette pré-ALAS pénètre ensuite dans la mitochondrie pour subir une maturation vers l'ALAS.

L'intervention dans le processus de régulation s'effectue probablement de deux manières. Premièrement, en bloquant la transcription du gène de l'ALAS, on obtient par cascade un ralentissement de la synthèse de l'ALAS (1). Il est également probable que l'hème empêche la maturation. Ce processus est moins connu mais il pourrait s'établir une liaison hème-pré-ALAS qui empêcherait le transport dans la mitochondrie (2).



Régulation par l'hème libre par :

- blocage de la transcription (1)
- blocage du transport (2)

Figure 26 : Régulation de l'ALA synthétase

I.3 - Régulation du métabolisme du fer

Comme le fer est un substrat dans la formation de l'hème, sa disponibilité/régulation a un impact sur l'accumulation de PpIX et d'autres porphyrines intermédiaires.

Le fer a de nombreux effets sur la biosynthèse, il régule l'expression de la ferritine, du récepteur à la transferrine et d'une isoenzyme de l'ALAS post-transcriptionnelle (Peng *et coll.*, 1997b). Il induit l'ALAS et l'hème oxygénase, une enzyme taux limitante. Il peut également inhiber le cytochrome mitochondrial et microsomal et catalyser l'oxydation des porphyrinogènes. Le fer libre qui peut exister en quantité accrue lors de surcharges générales ou localisées génère des radicaux hydroxyles $\text{OH}^\bullet$ très réactifs et nocifs pour l'organisme à partir de l'espèce peu réactive H_2O_2 par une réaction appelée réaction de Fenton. Le fer ne peut donner cette réaction que lorsqu'il est libre. La ferritine intracellulaire liant le fer possède donc un rôle de défense de l'organisme contre la formation de radicaux libres par ces réactions de Fenton.

I.4 - Désordres de la biosynthèse de l'hème

Cette régulation modifiée dans les cellules cancéreuses peut être plus fortement altérée par d'autres maladies comme les porphyries. Les porphyries sont une famille de maladies non héréditaires, chacune étant associée à une déficience partielle d'une ou plusieurs des sept enzymes régulatrices. On peut en répertorier huit caractérisées par des symptômes différents allant de la très grande fragilité de la peau à l'exposition lumineuse se manifestant par des brûlures, des démangeaisons, des oedèmes ou des vésicules...à des dysfonctionnements neuroviscéraux caractérisés par des douleurs abdominales sévères, des neuropathies et des dérangements psychiatriques, toujours associées à une importante accumulation et excrétion urinaire d'ALA et de PBG.

Une augmentation modérée de l'excrétion urinaire de porphyrines ou de précurseurs peut être détectée dans plusieurs autres maladies, en particulier les anémies (déficience en fer), les désordres hépatobiliaires, les empoisonnements chimiques (plomb) et certaines tumeurs hépatiques.

II - Avantages de l'ALA-PDT et applications cliniques

Lors de ces dernières années, de nombreux traitements basés sur la thérapie photodynamique ont été développés pour lutter contre des pathologies graves telles que le cancer. Cependant, les photosensibilisants utilisés pour la PDT peuvent causer une toxicité cutanée prolongée. Des intérêts croissants se sont donc développés récemment pour développer la PDT utilisant des photosensibilisants qui, comme l'ALA, permettent la synthèse d'un photosensibilisant endogène naturel. De nombreux avantages sont alors apparus pour l'utilisation de l'ALA induisant la PpIX.

II.1 - Sélectivité de l'ALA envers les cellules tumorales

La plupart des types cellulaires du corps humain, à l'exception des globules rouges matures, sont pourvus du mécanisme de synthèse de l'hème. Ce cycle est régulé par des enzymes qui peuvent avoir une activité limitée. Aussi l'administration exogène d'ALA entraîne une accumulation de différentes porphyrines à des étapes intermédiaires du cycle. Il s'avère que dans la plupart des lignées cellulaires, la principale porphyrine qui s'accumule

après administration exogène d'ALA est la PpIX. Dans certains cas, d'autres porphyrines intermédiaires peuvent être observées.

La PpIX induite par l'ALA paraît s'accumuler plus fortement dans les cellules malignes et pré malignes que dans les cellules non malignes dont elles dérivent. Ceci a été démontré, entre-autres, dans des leucocytes de patients sains ou leucémiques ainsi que dans des tissus du cancer du sein pour lesquels la synthèse de porphyrine était en moyenne vingt fois plus importante que dans les tissus mammaires normaux (étude sur 7 patients). De même, l'activité enzymatique de l'ALAD, la PBGD et l'uroporphyrinogène décarboxylase augmente en conséquence. Kondo et ses collaborateurs ont montré que, en général, l'activité enzymatique de la biosynthèse de l'hème, c'est-à-dire l'activité de l'ALAS et de la ferrochélatase, sont plus faibles dans les lignées cellulaires tumorales que dans les saines, alors que l'activité de l'ALAD et le PBGD sont plus intenses dans les cellules malignes, même si les activités de ces quatre enzymes varient fortement d'une lignée à l'autre (Kondo *et coll.*, 1999).

Parmi les enzymes catalysant les étapes entre l'ALA et l'hème, le PBGD a la plus faible activité endogène. L'activité de la PBGD peut être une étape taux limitant dans la formation de porphyrines par l'ALA. Cependant, son activité est plus forte et se régénère plus dans les cellules ou tissus malins que dans les cellules ou tissus sains (Peng *et coll.*, 1997b). Ceci peut mener à une accumulation sélective des porphyrines dans une tumeur si l'activité de la ferrochélatase est faible dans la tumeur. Comme déjà noté, la ferrochélatase convertit la PpIX photochimiquement active en hème photochimiquement inactif par l'incorporation d'un ion ferreux dans le macrocycle de la PpIX. L'ALA-PDT est donc fonction de l'activité de la ferrochélatase, qui est heureusement faible dans les tissus néoplasiques.

II.2 - Bonne tolérance

L'ALA est un composé petit et soluble dans l'eau, mais instable en solution. Il est librement dissous dans l'eau du plasma et est transporté dans le corps entier. Environ un tiers de l'ALA est excrété dans les urines après les premières heures suivant l'injection, avec également d'appréciables quantités de PBG après administration systémique d'ALA chez l'homme et le rat.

Après administration systémique, l'ALA est entièrement éliminé de l'organisme en 24 heures ce qui limite les risques de phototoxicité à un ou deux jours (comparé à 1 ou 2 mois avec les autres photosensibilisants). En effet, Dougherty et ses collègues ont montré qu'avec le Photofrin II, il existait une photosensibilité cutanée présente pendant 4 à 6 semaines après l'injection (Dougherty, 1993). De plus, il a été signalé que chez certains patients, cette phototoxicité pouvait durer jusqu'à 3 mois limitant donc l'utilisation de la photochimiothérapie car, en cas d'exposition à la lumière, les risques de dommages au niveau de la peau sont importants (Kennedy *et coll.*, 1992).

En application topique, la phototoxicité de l'ALA est également très limitée. En effet, il a été prouvé que l'application topique d'ALA n'avait pas d'action sur le métabolisme général des porphyrines et qu'elle ne conduisait pas, au niveau systémique, à une augmentation mesurable des porphyrines chez la souris (Vonarx *et coll.*, 1997) et chez l'homme (Fritsch *et coll.*, 1996). Ce dernier, dans une étude portant sur 20 patients porteurs de kératoses actiniques et de carcinomes baso-cellulaires, a utilisé l'ALA en application locale 6 heures avant l'irradiation. Les résultats ont confirmé que cette application locale n'induisait pas d'accumulation systémique significative des porphyrines. Il a seulement été montré une augmentation très faible des concentrations de porphyrines dans les érythrocytes et le plasma de plusieurs patients 6 heures après la PDT, valeurs revenant à un niveau basal après 24 heures.

II.3 - Différentes voies d'administration

L'ALA peut être administré chez l'homme par différentes voies :

- voie cutanée (crèmes...)
- voie intraveineuse (ALA en solution)
- voie orale (dissous dans des jus de fruits...)
- voie intra-tumorale (voie intra-vésicale par exemple dans les cancers de la vessie)

Un autre avantage est que l'ALA peut être utilisé par voie orale avec des résultats comparables à la voie IV, si on tient compte de l'effet de premier passage hépatique dans le calcul de la dose administrée. Dans une étude sur 10 patients portant diverses tumeurs (3 adénocarcinomes de l'ampoule de vater, 2 adénomes du duodénum, 3 cancers de l'œsophage et 2 adénocarcinomes colorectaux), recevant 6 doses fractionnées d'ALA per os et irradiés

6 heures après la première dose (50 ou 100 J/cm²), il a été observé une nécrose de la tumeur dans 8 cas sur 10 (Regula *et coll.*, 1995).

Or, la voie orale est très importante notamment pour une utilisation de la PDT en pédiatrie.

II.4 - Applications cliniques de l'ALA-PDT

Grâce à ses avantages, l'ALA est de plus en plus étudié pour diverses utilisations cliniques. L'ALA a été introduite pour la première fois en applications topiques par Kennedy et ses collaborateurs en 1990 pour des maladies de la peau. Depuis, il a été utilisé dans de nombreux cas cliniques, soit par voie systémique, soit par voie locale aussi bien pour la détection et la délimitation précise des tumeurs que pour leur traitement en dermatologie (Kennedy *et coll.*, 1996) et en O.R.L.

Leunig et ses collaborateurs ont utilisé pour le diagnostic des tissus néoplasiques dans la cavité buccale une solution d'ALA à 0,4% ; ils ont ainsi obtenu un contraste de fluorescence d'un facteur 10 entre le tissu néoplasique et le tissu sain 1 à 2 heures après l'application (Leunig *et coll.*, 1996). L'application locale de l'ALA est préférable à l'administration systémique car la concentration en principe actif est accrue dans la cible et réduite dans les tissus environnants.

Svanberg et ses collaborateurs ont examiné la fluorescence issue de différents états cancéreux ou précancéreux de la tête et du cou chez 30 patients ayant reçu de l'ALA par voie orale (Svanberg *et coll.*, 1994). La quantité de fluorescence a été estimée suivant la technique LIF (laser-induced fluorescence) et une fluorescence spécifique à la PpIX a été observée dans les lésions dès 30 minutes après ingestion avec un maximum de fluorescence survenant après 5 à 8 heures. Le rapport de fluorescence entre 635 nm (fluorescence spécifique de la PpIX) et 490 nm (autofluorescence des tissus) est apparu élevé pour les tumeurs avancées mais pas pour les tissus dysplasiques dans la plupart des cas.

En gastro-entérologie, Gossner, dans une étude portant sur 32 patients (10 dysplasies de haut grade et 22 adénocarcinomes de l'œsophage (Tis et T1)), a utilisé l'ALA solubilisé dans l'eau minérale et administré par voie orale (60 mg/kg) 4 à 6 heures avant une irradiation de 150 J/cm². Alors que 100% des dysplasies de haut grade ont été éradiquées (10 patients), 77% (17 sur les 22 patients) des adénocarcinomes ont été éliminés (suivi moyen de 9,9 mois (1 à 30 mois)) qui correspondaient aux tumeurs d'épaisseur inférieure ou égale à 2 mm.

Par contre, le traitement n'a pas permis d'obtenir une réponse complète pour les 5 patients dont l'épaisseur de la tumeur était supérieure à 2 mm (Gossner *et coll.*, 1998).

Les premiers traitements cliniques en dermatologie ont été rapportés par Kennedy qui a trouvé un taux de réponse complète à 3 mois de 79% (300 cas) sur des carcinomes basocellulaires après application topique d'ALA et une exposition unique à la lumière (Kennedy *et coll.*, 1990, 1992). Depuis ces premières études, de nombreuses autres ont été menées (Fritsch *et coll.*, 1998). En particulier dans le cas d'épithéliomas malpighiens superficiels, un taux de réponse complète de 67 à 92% a été observé atteignant les 100% après une série de trois séances de traitement par application locale d'ALA.

En 1999, la société DUSA Pharmaceuticals a reçu une autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) pour l'utilisation de l'acide delta aminolévulinique sous sa forme commerciale Levulan[®] (ALA 20%) pour le traitement des kératoses actiniques. Pour cette indication, le Levulan[®] a ensuite reçu en février 2000 une A.M.M. aux U.S.A.

Un des inconvénients de l'ALA étant sa faible capacité à diffuser à travers les membranes biologiques du fait de sa faible lipophilicité, des esters de l'ALA agissant comme pro-drogues ont été développés et font actuellement l'objet de nombreux essais cliniques. Un de ces esters, l'ALA méthylester, commercialisé sous le nom de Metvix[®] par la société Photocure, a reçu en 2002 une A.M.M. pour le traitement des états précancéreux de la peau et des kératoses actiniques. Le Metvix[®] est distribué par les laboratoires Galderma-L'Oréal.

III - Facteurs influant sur la stabilité de l'ALA en solution: hétérogénéité des résultats

L'ALA est utilisé le plus souvent en application topique sous forme de crème, mais la pénétration de l'ALA au travers de la peau est le plus souvent insuffisante. Il a donc été développé une forme injectable de l'ALA en solution. Malheureusement, de nombreux auteurs ont déjà noté l'instabilité de l'ALA en solution et cela sous l'influence de différents facteurs physiques et chimiques. Ces facteurs influant sur la stabilité de l'ALA n'ont fait l'objet jusqu'à maintenant que de trop peu de recherches.

En 2002, de Blois et ses collaborateurs ont étudié l'influence du pH, de la concentration et de la température sur la dégradation de l'ALA en solution aqueuse en vue d'optimiser une forme injectable. Pendant la préparation des différentes dilutions d'ALA,

les solutions incolores sont devenues jaunes dans les minutes suivantes. De plus, la couleur des solutions est devenue de plus en plus intense avec le temps et leur pH initial a diminué significativement même en présence d'un tampon phosphate. Ces modifications ont suggéré l'existence d'une réaction chimique indésirable pour une application clinique non seulement pour les problèmes techniques d'utilisation, mais surtout pour la toxicité potentielle des produits de la réaction et la diminution éventuelle de l'efficacité du traitement (de Blois *et coll.*, 2002).

Des études antérieures avaient montré que l'ALA réagissait selon un mécanisme non-enzymatique en solution aqueuse pour donner plusieurs produits de dégradation. Frank et Stratmann en 1981 ont en effet montré qu'en solution alcaline, deux produits étaient formés. Le composé minoritaire ayant été identifié comme étant le porphobilinogène et le composé majoritaire, le 2,5-(β -carboxyéthyl)dihydropyrazine (CHPY). Butler et George ont ensuite identifié en 1992 trois produits de dégradation de l'ALA dont la formation était dépendante des conditions de la réaction. A pH modéré et sous conditions anaérobiques, le CHPY est formé. Celui-ci se transforme en 2,5-(β -carboxyéthyl)pyrazine (CPY) après oxydation. En solutions fortement alcalines, le CHPY est formé accompagné de pseudoporphobilinogène. Jaffe *et coll.* en 1990 ont également montré que sous des conditions physiologiques, 4 à 7 % de l'ALA existait sous forme de dihydropyrazine (CHPY), et que la fraction en ce composé était dépendante de la concentration en ALA utilisée (Jaffe *et coll.*, 1990).

Gadmar et ses collaborateurs, en 2002, ont étudié la dégradation de l'ALA en solution en mesurant l'absorption de photons à 278 nm d'un produit de dégradation, et également en mesurant la capacité de l'ALA à induire la production de PpIX dans les cellules. Ils ont trouvé une bande caractéristique d'absorption à 278 nm qui augmentait avec le temps de conservation à 37°C. De même, la capacité de l'ALA à synthétiser la PpIX diminuait avec le temps de conservation. Par contre, la forme du spectre d'absorption ne variait pas en fonction du temps ; cela signifie qu'il n'y a pas de modification dans les produits formés (Gadmar *et coll.*, 2002).

Novo et ses collaborateurs ont identifié le pic à 275 nm comme étant le 2,5-(β -carboxyéthyl)pyrazine en se basant sur le spectre UV du composé. Il semblerait que les modifications apparaissent dans les trois minutes après la préparation de la solution. Les changements de coloration sont également instantanés suggérant ainsi l'existence d'une réaction initiale rapide de dégradation de l'ALA (Novo *et coll.*, 1996).

Dans la littérature, la nature du solvant employé pour dissoudre l'ALA diffère d'un auteur à l'autre. En effet, pour Diddens, le PBS semble être le solvant le plus approprié (Diddens *et coll.*, 1994). Par contre, dans l'étude effectuée par Bunke et ses collaborateurs en 2000, il a été démontré qu'une solution aqueuse de pH faible était la meilleure forme pour limiter la dégradation de l'ALA. De plus, dans cette seconde étude, d'autres formes de solutions d'ALA ont été testées telles que des solutions non aqueuses, des émulsions huile dans eau et eau dans huile, des microémulsions et des hydrogels : aucune de ces formes n'a permis une augmentation de la stabilité de l'ALA. De même, l'ajout d'antioxydants dans une solution aqueuse d'ALA n'a pas eu d'influence bénéfique sur cette stabilité (Bunke *et coll.*, 2000).

En 1998, Elfsson et ses collaborateurs ont étudié l'influence de la température sur la réaction de dégradation de l'ALA en utilisant des températures comprises entre 37 et 85°C. Ils ont montré que plus la température augmentait, plus l'ALA était instable. Il a donc été émis l'hypothèse que la stabilité de l'ALA devrait être plus importante à une température inférieure à 37°C (Elfsson *et coll.*, 1998).

D'autre part, il est connu qu'il existe une grande hétérogénéité concernant les capacités métaboliques de transformation de l'ALA en PpIX d'une cellule à l'autre. En effet, Eleouet *et coll.* ont montré, en utilisant des cellules humaines sanguines (lymphocytes ou progéniteurs de patients atteints de leucémies ou de lymphomes) et des cellules de tumeur de cerveau, une grande variation de la synthèse de PpIX d'un patient à l'autre et même d'une cellule à l'autre (Eleouet *et coll.*, 2000a).

Le développement d'une forme stable d'ALA en solution pour une application aussi bien expérimentale que clinique requiert des connaissances sur les mécanismes de dégradation et la cinétique du produit. Toutes les études sur les différents facteurs influant potentiellement sur la stabilité de l'ALA en solution montrent une grande hétérogénéité dans les résultats, c'est pourquoi ces facteurs sont importants à analyser. Une standardisation des conditions d'utilisation et de conservation de l'ALA pourrait ainsi permettre une plus grande compréhension des résultats cliniques et expérimentaux observés.

MATÉRIELS
ET
MÉTHODES

I - Matériels

I.1 - Lignée cellulaire utilisée

Les cellules utilisées sont des cellules de la lignée C6, c'est à dire des cellules de glioblastome de rat (ATCC, CCL 105) provenant de l'ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). Le glioblastome est une tumeur des tissus du système nerveux central se développant à partir des astrocytes. Il représente environ 30% des tumeurs cérébrales chez l'homme. L'agressivité des tumeurs cérébrales est variable en fonction du grade histologique. La chirurgie, lorsqu'elle est possible, est le premier temps du traitement, souvent suivie de la radiothérapie surtout si la résection n'a pas été complète. La chimiothérapie se révèle peu efficace et est utilisée en traitement adjuvant de la chirurgie et de la radiothérapie. La médiane de survie d'un glioblastome multiforme se situe entre 42 et 60 semaines. L'utilisation de telles cellules a été justifiée par l'implantation administrative et géographique du laboratoire qui appartient à la clinique Neurochirurgicale. Le cerveau est protégé par une structure particulière : la barrière hémato-encéphalique. Celle-ci ne joue plus son rôle de filtre au niveau des tumeurs cérébrales. Bien que les volumes tumoraux soient relativement importants, les concentrations relatives de photosensibilisant seront élevées au niveau tumoral et faibles ailleurs. De plus, la lumière diffuse bien dans le cerveau, ce qui autorise le traitement de volumes significativement plus importants que dans d'autres disciplines.

I.2 - Le photosensibilisant : L'ALA

L'ALA, acide δ -amino lévulinique (Hydrochloride Approx. 98%, Cell Culture Tested) se présente sous forme de poudre lyophilisée blanche. L'ALA utilisé est fourni par la société Sigma (France). Il est conservé dans un congélateur, à une température de -15°C . Sa formule brute est $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\cdot\text{HCl}$ et son poids moléculaire est de 167,6 g/mol.

I.3 - Les solvants de dissolution

L'ALA est facilement soluble dans divers solvants. Les solvants utilisés pour les expériences sont :

- Eau pour préparation injectable ; pH 6,5
- PBS (Phosphate Buffer Saline) ; pH 7,1
- RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 ; pH 7,4
- Tampon Imidazole 0,2M ; pH 7,4
- Tampon Diméthylaminoéthylamine 1M (DMAEA) ; pH 7,4
- Tampon Tris-maléate acide 0,2M ; pH 7,4

Les différentes solutions tampons ont été préparées selon le protocole décrit dans le livret "Solutions aqueuses et tampons, documenta geigy, tiré à part de la 7^{ème} édition des Tables scientifiques, CIBA-GEIGY SA, Bâle 1973".

- ✓ Tampon Tris-maléate acide 0,2M : 24,23g de tris [hydroxyméthyl]-aminométhane et 23,21g d'acide maléique sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Puis, à 25 ml de cette solution sont ajoutés 26,7 ml de NaOH 0,2N. Une quantité suffisante d'eau distillée est alors additionnée pour obtenir 100 ml de tampon. Le pH de 7,4 de ce tampon est ensuite vérifié au pHmètre.
- ✓ Tampon Diméthylaminoéthylamine 1M : 88g de diméthylaminoéthylamine sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Puis, à 5 ml de cette solution sont ajoutés 55,3 ml de HCl 0,1N. Une quantité suffisante d'eau distillée est alors additionnée pour obtenir 100 ml de tampon. Le pH de 7,4 de ce tampon est ensuite vérifié au pHmètre.
- ✓ Tampon Imidazole 0,2M : 13,62g d'imidazole sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Puis, à 25 ml de cette solution sont ajoutés 14,6 ml de HCl 0,1N. Une quantité suffisante d'eau distillée est alors additionnée pour obtenir 100 ml de tampon. Le pH de 7,4 de ce tampon est ensuite vérifié au pHmètre.

I.4 - Appareillage

I.4.1 - La diode Laser

Les lasers à semi-conducteurs (figure 27) sont des diodes qui émettent une lumière cohérente par émission stimulée. L'élément principal d'une telle diode est une puce à semi-conducteur. Une telle puce est constituée d'un empilement de couches : la première, déposée sur un support, contient un excès d'électrons ; elle est dite de type n (pour négatif). Une autre couche, dite de type p (pour positif), située sur le dessus de la puce, présente au contraire un déficit en électrons (ou excès de particules chargées positivement, appelés « trous »). Entre ces deux couches n et p se trouve la couche dite active d'où est émise la lumière. Une différence de potentiel appliquée sur la puce semi-conducteur repousse vers la couche active des « trous » (des « charges positives ») de la couche de type p, et des électrons de la couche n.

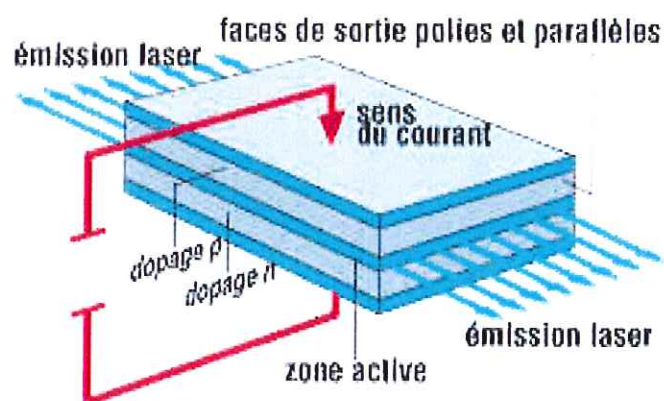


Figure 27 : Principe de fonctionnement d'une diode laser

L'émission de lumière résulte de la capture, dans la couche active, des électrons par les trous (ions positifs). En effet, un atome ne passe à l'état d'ion que s'il reçoit une énergie suffisante ; la transformation inverse s'accompagne donc de l'émission de la même quantité d'énergie. La quantité de photons libérés et leur longueur d'onde dépendent de la composition chimique des différentes couches. Cette émission se fait sous forme calorifique dans le cas du silicium et du germanium, sous forme de rayonnement lumineux rouge dans le cas de l'arséniure de gallium. De plus en plus, et notamment grâce à des nouvelles technologies de dopage, il est possible de fabriquer des diodes lasers pour de nombreuses longueurs d'ondes.

La diode laser (figure 30, page 59) utilisée pour l'irradiation de l'ALA provenait de la société DIOMED (U.K). Cette diode laser continue est utilisée avec 5m de fibre. La diode laser a la capacité d'irradier à 630 nm avec une puissance en sortie de fibre pouvant atteindre 3 W (notre puissance en sortie de fibre était de 200 mW).

I.4.2 - Le photomètre d'absorption

Le photomètre d'absorption est un appareil permettant de déterminer la densité optique de solutions à partir de microplaques de 96 puits.

Grâce à la présence de filtres interférentiels, la détermination des densités optiques (DO) peut être réalisée à une longueur d'onde précise (570 nm pour le test MTT). Le photomètre utilisé est un Titertek Uniskan II.

La lumière excitatrice provenant d'une lampe halogène au tungstène traverse verticalement le puits contenant la solution et le filtre interférentiel de haute qualité à largeur de bande étroite pour finalement atteindre le détecteur. Contrairement à la mesure horizontale de l'absorption, la mesure verticale permet de s'affranchir d'éventuels polluants dans la solution, seul le produit absorbant ayant une influence.

De plus, l'appareil possède un détecteur de référence pour compenser une éventuelle fluctuation dans l'intensité de la lampe. Le traitement du signal est effectué par un convertisseur linéaire/logarithmique qui donne ainsi en sortie l'absorbance de l'échantillon.

La DO est ensuite déterminée suivant le principe de mesure verticale qui obéit à la loi exprimée par l'équation de Suovaniemi :

$$DO = a / S.m$$

Où a = absorption molaire

S = section perpendiculaire au faisceau lumineux

m = quantité de solution absorbante

I.4.3 - Le système de l'imagerie

Bien que connu depuis plusieurs années, le phénomène de fluorescence n'a été utilisé comme méthode d'analyse que relativement récemment. L'imagerie permet de réaliser des points de fluorescence dans les organites de la cellule pour suivre la pénétration et la fixation des produits photosensibles dans les différents compartiments cellulaires (noyau, membrane, cytoplasme). Cette technique permet également de reconstituer une image de fluorescence et ainsi de déterminer la distribution cellulaire du produit photosensible. Le système de l'imagerie est composé de différents appareils (figure 28).

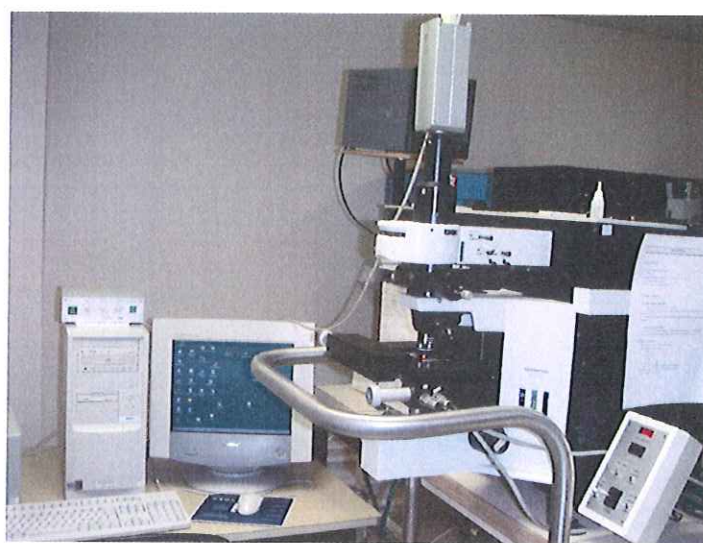


Figure 28 : Vue d'ensemble du système de l'imagerie

a- La caméra Kappa

La caméra utilisée est une Kappa CF 8/4 (Fisher Scientific S.A., France). C'est une caméra vidéo monochrome de très haute sensibilité (jusqu'à 2.10^{-5} Lux) permettant une grande variété d'applications. Elle est reliée à un moniteur de contrôle noir et blanc, et montée sur le microscope, elle permet l'observation de l'échantillon. Elle est reliée à un ordinateur permettant ainsi de digitaliser l'image de l'échantillon.

b- Le microscope

C'est un microscope optique (Olympus BX 40, France) équipé d'un objectif 40X ou d'un objectif 100X à immersion à huile permettant d'observer l'échantillon. Il est éclairé par une lumière blanche standard sur laquelle a été placé un filtre rouge de manière à supprimer

les longueurs d'onde susceptibles de modifier l'échantillon (cellule ou biopsie) lors de leur localisation (avant la mesure de fluorescence).

c- La platine motorisée

L'échantillon repose sur une platine motorisée qui permet, grâce à un tableau de contrôle électronique, d'effectuer des déplacements en X et Y avec une précision de l'ordre du micron, ces déplacements s'effectuent manuellement à l'aide d'un joystick.

Le système est optimisé par une interface PCI bidirectionnelle pour le transfert des images et les contrôles de la caméra.

d- L'unité de contrôle

Le contrôle manuel du gain et de l'offset permet un ajustement optimum du contraste et du brightness.

II - Méthodes

II.1 - Analyse du pH des solutions

Le pH des solvants utilisés pour dissoudre l'ALA (tampon imidazole pH 7,4, tampon tris-maléate pH 7,4, tampon diméthylaminoéthylamine pH 7,4, PBS, RPMI et eau pour préparation injectable) a été mesuré au pHmètre avant et après addition de l'ALA à différentes concentrations (100 et 200 µg/ml).

Le pH des dilutions d'ALA dans les différents solvants a été mesuré dès leur préparation, puis 60 et 120 minutes après.

II.2 - Entretien des cellules

II.2.1 - Culture des cellules C6

Les cellules C6 sont cultivées dans des flacons de culture de 25 cm² dans 6,5 ml de milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) sans rouge phénol, supplémenté de L-glutamine (2mM), de pénicilline (50 UI/ml), de streptomycine (5 UI/ml) et 10% de sérum de veau foetal décomplémenté (FCS).

Les flacons de culture contenant ces cellules sont ensuite placés à 37°C dans un incubateur en atmosphère humide complémenté de 5% de CO₂.

II.2.2 - Trypsination

Une fois les cellules à confluence dans les flacons de culture, il est nécessaire de les détacher du support soit pour les réimplanter dans de nouveaux flacons et assurer ainsi la survie de la lignée cellulaire, soit pour les implanter pour les différentes expérimentations.

La lignée cellulaire C6 étant adhérente au support de culture, les flacons de culture contenant les cellules sont rincés avec 2 ou 3 ml d'une solution de tampon phosphate (PBS) afin d'éliminer les traces de FCS. Les cellules sont alors mises en contact avec une solution de

trypsine (0,02 % d'EDTA, 0,0025 % trypsine) pendant quelques minutes à 37°C, le temps de détacher les cellules du support.

Après contrôle au microscope, 1 ml de FCS est ajouté afin d'inhiber l'effet de la trypsine, puis 8 ml de RPMI. La suspension est centrifugée pendant 5 minutes à 155 trs/min à 4°C. Après avoir jeté le surnageant, le culot cellulaire est prélevé par 1 ml de RPMI.

Pour assurer la conservation de la lignée, une fraction du culot est déposée dans un nouveau flacon contenant un milieu de culture neuf.

Pour les différentes expériences, les cellules sont implantées dans des plaques 24 ou 96 puits à la concentration de 10^5 cellules/ml, la concentration cellulaire étant calculée par comptage sur lame de Malassez.

La lame de Malassez est une lame épaisse en verre possédant un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles. Environ 1 μ l du culot cellulaire repris par le RPMI est déposé sur la lame. Chaque rectangle correspond à un volume de 10^{-3} ml.

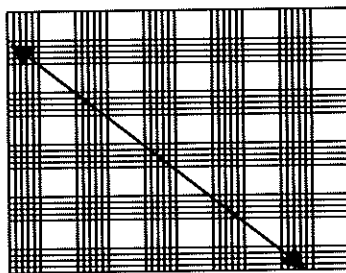


Figure 29 : Quadrillage d'une lame de Malassez

Les cellules sont comptées sur les 5 rectangles de la diagonale, ce qui permet d'obtenir le nombre de cellules pour $5 \cdot 10^{-3}$ ml puis, par un calcul simple, le nombre de cellules dans 1 ml. La dilution nécessaire est ensuite réalisée afin d'obtenir la concentration désirée de 10^5 cellules/ml.

II.3 - Influence des différents facteurs sur l'intensité de fluorescence de la PpIX

La fluorescence de la PpIX induite par l'administration d'ALA avec les cellules est analysée en fonction de :

- la température de conservation des solutions d'ALA,
- le temps entre la préparation des solutions d'ALA et leur incubation avec les cellules,
- le solvant utilisé pour dissoudre l'ALA,
- et la concentration en ALA incubée avec les cellules.

II.3.1 - Implantation des cellules

Les cellules C6 contenues dans un flacon de culture sont lavées avec 3 ml de tampon phosphate salin (PBS), décollées chimiquement par l'utilisation de trypsine (1ml) puis lavées dans du milieu de culture (centrifugation 155 tours/min, 5 min). Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'une lame de Malassez puis préparées à 10^5 cellules/ml dans du milieu RPMI/FCS dans les proportions 90 : 10. Puis, 100 μ l de cellules sont déposés sur des lamelles en verre stériles (14 mm de diamètre, 0,13 mm d'épaisseur) préalablement placées dans des plaques de 24 puits stériles.

II.3.2 - Conditionnement des solvants

L'ALA est dissous dans six solvants différents : tampon imidazole, tampon DMEAE, tampon tris-maléate, eau pour préparation injectable, PBS et RPMI 1640.

Ces solvants sont placés dans des tubes fermés dans un réfrigérateur (4°C), ou dans un incubateur thermostaté à 37°C dès la veille de l'expérience afin que les solvants soient à la bonne température lors de la préparation des différentes dilutions d'ALA.

II.3.3 - Préparation des solutions d'ALA et incubation

Deux concentrations finales d'ALA sont testées : 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$ (solutions de concentration initiale de 1000 et 2000 $\mu\text{g/ml}$). Les solutions sont maintenues à l'abri de la lumière et à la température testée (4 ou 37°C) pendant toute la durée de l'expérience. Le pH des solutions est vérifié avant l'expérience et au moment de l'ajout des différentes quantités d'ALA.

Vingt-quatre heures après l'implantation des cellules C6, les différentes solutions d'ALA sont ajoutées soit immédiatement après leur préparation (solutions à T0), soit 20 minutes après (solutions T20) ou soit 60 minutes plus tard (T60). Chaque puits est complété avec 350 μl de milieu RPMI, 50 μl de SVF et 50 μl des solutions d'ALA afin d'obtenir des concentrations finales de 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$.

Les cellules sont ensuite incubées à 37°C dans l'obscurité totale pendant 2 heures.

II.3.4 - Etudes de fluorescence

Avant chaque mesure de fluorescence, une lamelle (sur laquelle les cellules sont adhérentes) est récupérée du puits de culture et est recouverte par une seconde lamelle. Les lamelles sont placées sous l'objectif 100X du microscope et une goutte d'huile est placée sur la surface (interface indispensable à l'utilisation de l'objectif 100X).

L'analyse de la fluorescence est réalisée après excitation entre 450 et 480 nm par une lampe Xénon 150 W, en utilisant la caméra Kappa.

Dix points par cellule et 10 cellules par condition ont été analysés. La fluorescence est exprimée en échelle de gris en utilisant le logiciel d'analyse d'images Kappa Image Base.

II.4 - Détermination de la phototoxicité : études des différents paramètres

II.4.1 - Implantation des cellules

Les cellules C6 contenues dans un flacon de culture sont lavées avec 3 ml de tampon phosphate salin (PBS), décollées chimiquement par l'utilisation de trypsine (1ml) puis lavées dans du milieu de culture (centrifugation 155 tours/min, 5 min). Les cellules sont ensuite comptées à l'aide d'une lame de Malassez puis préparées à 10^5 cellules/ml dans du milieu RPMI/FCS dans les proportions 90 : 10. Cette solution est alors implantée (100 μ l/puits) dans des plaques de 96 puits stériles à fonds plats. Quatre puits par concentration d'ALA sont prévus. Six plaques sont préparées de manière identique.

II.4.2 - Conditionnement des solvants

Trois solvants différents sont utilisés pour la dissolution de l'ALA : eau pour préparation injectable, PBS et RPMI 1640.

La stabilité des solutions d'ALA est également étudiée en fonction de la température. Les solvants ont donc été placés dans des tubes fermés, puis soit dans le réfrigérateur (4°C), soit dans un incubateur thermostaté à 37°C, soit dans une pièce du laboratoire maintenue à température ambiante (21°C) la veille de l'expérience afin que les solvants soient à la bonne température lors de la préparation des différentes dilutions d'ALA.

II.4.3 - Préparation des solutions d'ALA

Différentes concentrations d'ALA sont testées : 0, 20, 50, 100 et 200 μ g/ml (solutions de concentration initiale de 0-2000 μ g/ml). Les solutions sont préparées par dilutions successives à partir d'une solution mère à 2000 μ g/ml (2 mg d'ALA dans 1 ml de solvant) dans de l'eau pour préparation injectable, du RPMI 1640 non supplémenté, ou du PBS ; ces solvants étant maintenus à différentes températures comme nous l'avons vu précédemment. Ces différentes solutions d'ALA sont conservées à l'abri de la lumière pendant toute la durée de l'expérience.

III.4.4 - Incubation avec les cellules

Vingt quatre heures après l'implantation des cellules C6, celles-ci sont prêtes à être incubées avec les solutions d'ALA pendant 2 heures. Pour cela, 11 μ l de solution d'ALA sont placés dans chaque puits contenant déjà 100 μ l de milieu.

Les différentes solutions d'ALA sont incubées avec les cellules à des temps différents. A T0, les solutions fraîches sont implantées avec les cellules sur deux plaques différentes (une pour la toxicité et une autre pour la phototoxicité). Les tubes sont alors replacés à l'obscurité et à la température de l'expérience pendant 20 minutes. A T20, les solutions d'ALA sont implantées sur deux autres plaques. A T60 (soit 1 heure après la première implantation), les différentes concentrations d'ALA sont implantées sur deux nouvelles plaques.

En résumé

Il y a 6 plaques de 96 puits au total : - 2 plaques à T0 (une irradiée, l'autre non)
- 2 plaques à T20 (une irradiée, l'autre non)
- 2 plaques à T60 (une irradiée, l'autre non)

Sur chaque plaque :

- 4 puits par concentration (5 concentrations différentes donc 20 puits)
- 2 conditions par plaques (2 x 20 puits), (2 températures ou deux solvants différents)

II.4.5 - Irradiation

L'irradiation est réalisée à l'aide d'une diode laser (Diomed, 630 nm) dont le faisceau est focalisé dans une fibre optique en silice-silicone de 400 μ m de coeur utilisée pour irradier les cellules. La fibre est maintenue à une distance permettant l'irradiation de l'ensemble des puits en une seule fois. La puissance (200mW) est calibrée avec un mesureur de puissance (Coherent, France), et le temps d'exposition est ajusté pour obtenir une densité énergétique de 25 J/cm².

Calcul du temps d'irradiation :

Le temps d'irradiation s'exprime par la formule suivante :

$$\text{Temps (secondes)} = \Delta o \text{ (Joules/cm}^2\text{)} \times \Sigma \text{ (cm}^2\text{)} / \Im \text{ (Watts)}$$

Le diamètre de la surface contenant les cellules à irradier étant de 7,2 cm, et la puissance délivrée par le laser en sortie de fibre de 200 mW, le temps d'irradiation est donc de 84 minutes par plaque. Pendant l'irradiation, les plaques ont été placées sur une plaque chauffante (Polylabo ref 49403) afin de maintenir les cellules à une température de 37°C.



Figure 30 : Irradiation des cellules par la diode laser

II.4.6 - Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire est déterminée par l'utilisation du test colorimétrique MTT. Le MTT est un sel de coloration jaune, du bromure de 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphenyltetrazolium qui est réduit en formazan, produit insoluble bleu foncé, par les deshydrogénases mitochondriales présentes dans les cellules vivantes.

Vingt trois heures après le début de l'irradiation, 15 µl de MTT en solution (5 mg/ml) dans du PBS sont placés dans chacun des puits contenant les cellules et 100 µl de milieu avec 10% de FCS (les puits ont été rincés). Après une incubation de 4 heures (37°C, 5% de CO₂),

les cellules sont lysées avec une solution (150 µl) d'HCl et d'isopropanol (1/24 volume/volume) afin de solubiliser le formazan (MTT réduit).

Après l'homogénéisation de chacun des puits obtenue par sonification, un photomètre Uniskan Titertek I 362 (Flow Laboratories, France) est utilisé pour déterminer la densité optique (DO) à 570 nm. Les valeurs de DO mesurées sur des puits contrôles (contenant le milieu, l'isopropanol/HCl et le MTT mais ne contenant pas de cellules) sont moyennées et soustraites des valeurs brutes, le blanc de l'appareil étant déterminé sur un puits vide. Le pourcentage de survie cellulaire est déterminé en prenant pour témoin (100%) les cellules sans drogue et non irradiées.

Tous les résultats sont la moyenne d'au moins 3 expériences séparées.

II.5 - Etudes de phototoxicité : rapport 1/40

L'expérience précédente de phototoxicité (II.4) est réalisée en changeant le facteur de dilution de la solution d'ALA dans le puits. En effet, le rapport ALA/solvant de l'étude précédente était de 1/10, celui de cette expérience est de 1/40. Ce rapport est analysé en vue d'une utilisation clinique de la solution d'ALA (perfusion de 100 ml) chez l'homme (environ 4 litres de sang).

II.5.1 - Implantation des cellules

Après lavage et décollement, les cellules C6 sont comptées à l'aide d'une lame de Malassez puis préparées à 10^5 cellules/ml dans du milieu RPMI/FCS dans les proportions 90 : 10. Cette solution est alors implantée (100 µl/puits) dans des plaques de 96 puits stériles à fonds plats. Quatre puits par concentration d'ALA sont prévus. Six plaques sont préparées de manière identique.

II.5.2 - Préparation des différentes conditions

L'ALA est dissous soit dans de l'eau pour préparation injectable, soit dans du PBS ou soit dans du RPMI 1640.

Ces solvants sont placés dans des tubes fermés dans un réfrigérateur (4°C), ou dans un incubateur thermostaté à 37°C dès la veille de l'expérience afin que les solvants soient à la bonne température lors de la préparation des différentes dilutions d'ALA.

II.5.3 - Préparation des solutions d'ALA

Différentes concentrations d'ALA sont testées : 0, 20, 50, 100 et 200 µg/ml (solutions de concentration initiale de 0-8000 µg/ml). La solution mère est préparée en dissolvant 4 mg d'ALA dans 500 µl de solvant (soit 4 fois plus que dans l'expérience précédente de phototoxicité (II.4)).

Ces solutions sont maintenues à l'abri de la lumière pendant toute la durée de l'expérience.

II.5.4 - Incubation avec les cellules

Vingt quatre heures après leur implantation, les cellules C6 reçoivent 2,5 µl de solution d'ALA par puits contenant déjà 100 µl de milieu RPMI/FCS. Les différentes solutions d'ALA sont incubées immédiatement après leur préparation (T0) ou 20 minutes plus tard (T20), ou après 60 minutes (T60).

II.5.5 - Irradiation et détermination du pourcentage de survie

Après l'incubation des cellules avec l'ALA, celles-ci sont irradiées par une diode laser (cf II.4.5-Irradiation page 58) et la viabilité cellulaire est déterminée par le test MTT (cf II.4.6-Mesure de la viabilité cellulaire page 59).

Tous les résultats sont la moyenne d'au moins 3 expériences séparées.

RÉSULTATS

I - Analyse du pH des solutions

Le pH des solvants utilisés pour dissoudre l'ALA a été mesuré avant et après addition de l'ALA à différentes concentrations. Pour les solvants tampons, l'ajout d'ALA n'entraîne aucune modification de pH. Par contre, pour l'eau, le PBS et le RPMI, l'addition d'ALA modifie le pH, et cette variation ne s'effectue pas de la même manière pour les trois solvants. En effet, l'ajout d'ALA diminue considérablement le pH de l'eau pour préparation injectable où le pH passe de 6,5 avant addition à 3,7 pour 100 $\mu\text{g/ml}$ d'ALA. En ce qui concerne le PBS et le RPMI, la diminution de pH observée après addition d'ALA est beaucoup plus faible (figure 31).

De plus, le pH des solvants seuls et des différentes dilutions d'ALA a été mesuré 60 et 120 minutes après leur préparation, et seulement de très légères variations non significatives ont été observées.

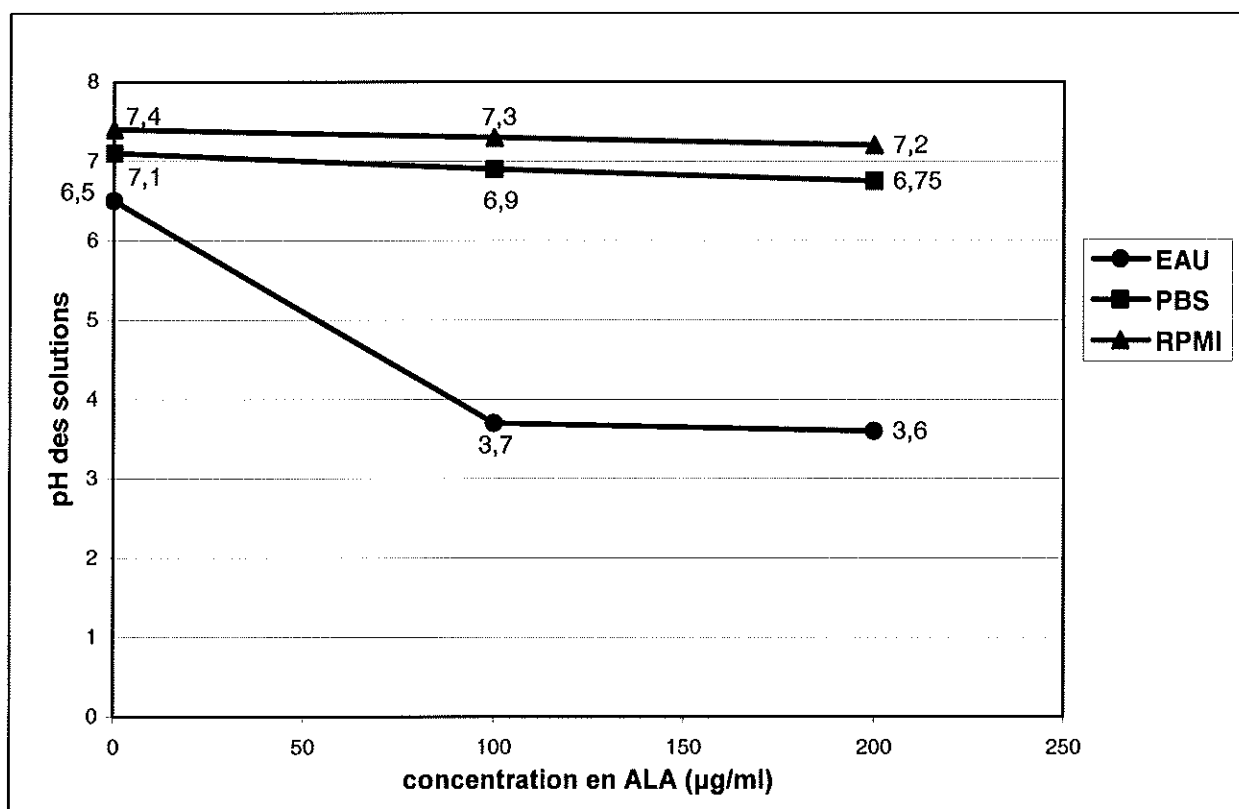


Figure 31 : pH des solutions d'ALA mesurés dès leur préparation et à température ambiante

II - Etudes de fluorescence de la PpIX

Les images de fluorescence ont été obtenues par l'acquisition directe de l'image de la cellule sous microscopie classique avec une caméra de haute sensibilité. Nous avons étudié l'influence de la concentration, de la température, du temps et de différents solvants de dilution sur la capacité de l'ALA à synthétiser la PpIX après une incubation de 2 heures avec les cellules C6.

II.1 - Influence de la concentration en ALA sur la fluorescence de la PpIX

Nous avons testé trois solvants tampons de pH 7,4 (imidazole, tris-maléate et diméthylaminoéthylamine (DMAEA)), ainsi que trois solvants couramment utilisés en culture cellulaire (eau pour préparation injectable, PBS et RPMI 1640). Toutes les conditions ont été testées sur ces six solvants.

La fluorescence de la PpIX mesurée après une incubation des cellules avec une dose d'ALA de 200 $\mu\text{g/ml}$ est très légèrement supérieure à celle mesurée pour les cellules incubées avec une dose d'ALA de 100 $\mu\text{g/ml}$. Cette différence n'est pas significative (test t de Student, $P < 0,05$, figure 32).

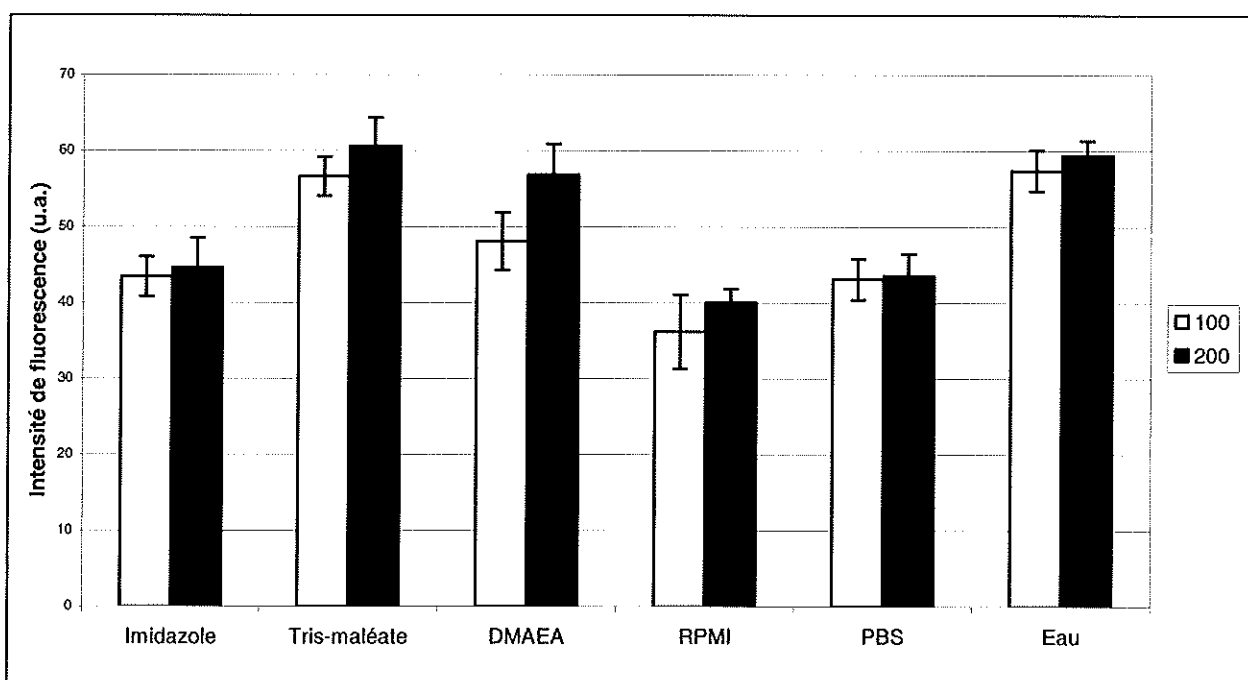


Figure 32 : Intensités de fluorescence dans les cellules C6 après 2 heures d'incubation avec des solutions d'ALA à 100 ou 200 $\mu\text{g/ml}$ préparées extemporanément (T0) et dans différents solvants conservés à 37°C.

Ceci suggère que la concentration en ALA n'a pas ou peu d'influence directe sur la capacité des cellules C6 à synthétiser la PpIX pour les doses utilisées (100 et 200 $\mu\text{g/ml}$).

II.2 - Influence de la température sur la fluorescence induite par l'ALA

Quel que soit le solvant utilisé, l'intensité de fluorescence de la PpIX mesurée dans les cellules incubées avec une solution d'ALA conservée à 4°C est supérieure à celle des cellules incubées avec une solution d'ALA maintenue à 37°C (figure 33).

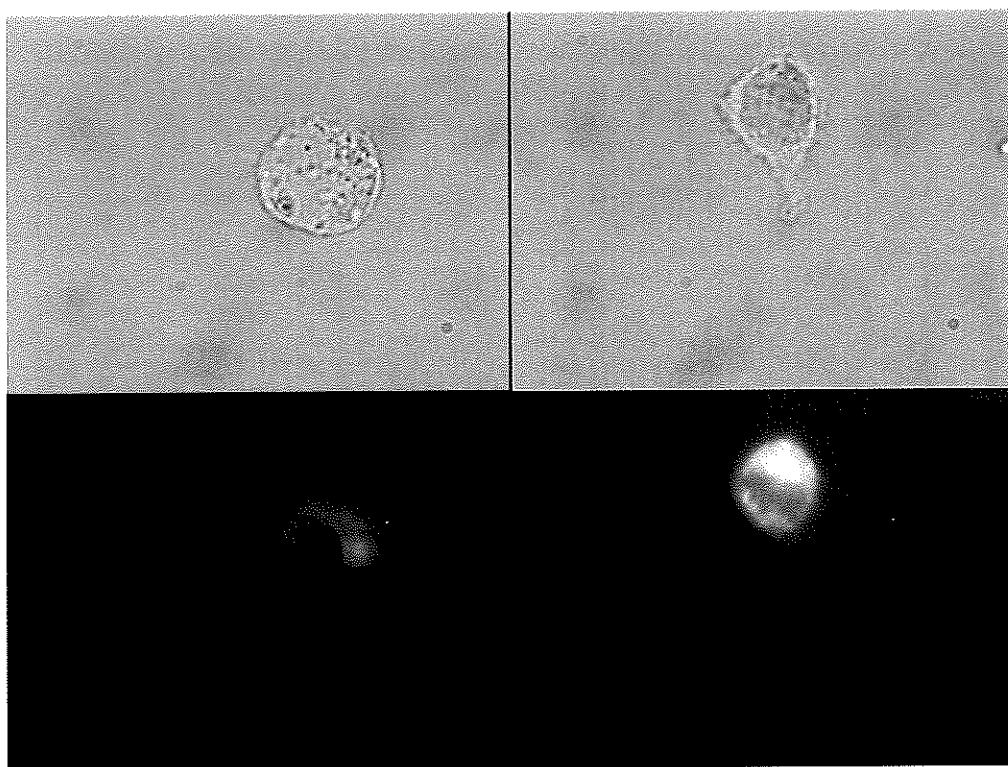


Figure 33 : Cellules C6 sous microscopie photonique (en haut) et fluorescence de la PpIX induite par l'administration d'une solution à 200 $\mu\text{g/ml}$ d'ALA diluée dans l'eau chaude (37°C, à gauche) ou dans l'eau froide (4°C, à droite) après 2 heures d'incubation. Images obtenues en épi-fluorescence avec une caméra Kappa et observation au microscope optique à l'objectif 100X.

Les images obtenues sous microscope laissent parfaitement apparaître la distribution de la fluorescence dans le cytoplasme, la zone en regard du noyau ne fluorescant pas ou peu. La très légère fluorescence apparente du noyau provient en fait de la fluorescence diffuse du cytoplasme entourant le noyau dans une dimension plane et surtout de la fluorescence du cytoplasme qui entoure le noyau dans une direction verticale, le système d'imagerie n'étant pas confocal.

Si nous analysons les cellules incubées avec une solution fraîche (T0) d'ALA de 100 $\mu\text{g/ml}$ et que nous comparons l'intensité de fluorescence moyenne des cellules incubées soit avec une solution conservée à 4°C ou à 37°C, nous observons une différence significative (test t de Student, $P < 0,01$) pour les trois solvants couramment employés en culture cellulaire : le RPMI, le PBS et l'eau pour préparation injectable. Cette différence est notamment très importante quand l'ALA est dissous dans l'eau : intensité de fluorescence de 99 U.A. à 4°C et de 57 U.A. à 37°C. Nous observons également une légère diminution de l'intensité de fluorescence à 37°C pour les trois autres solvants, mais cette différence n'est pas significative après analyse statistique (figure 34).

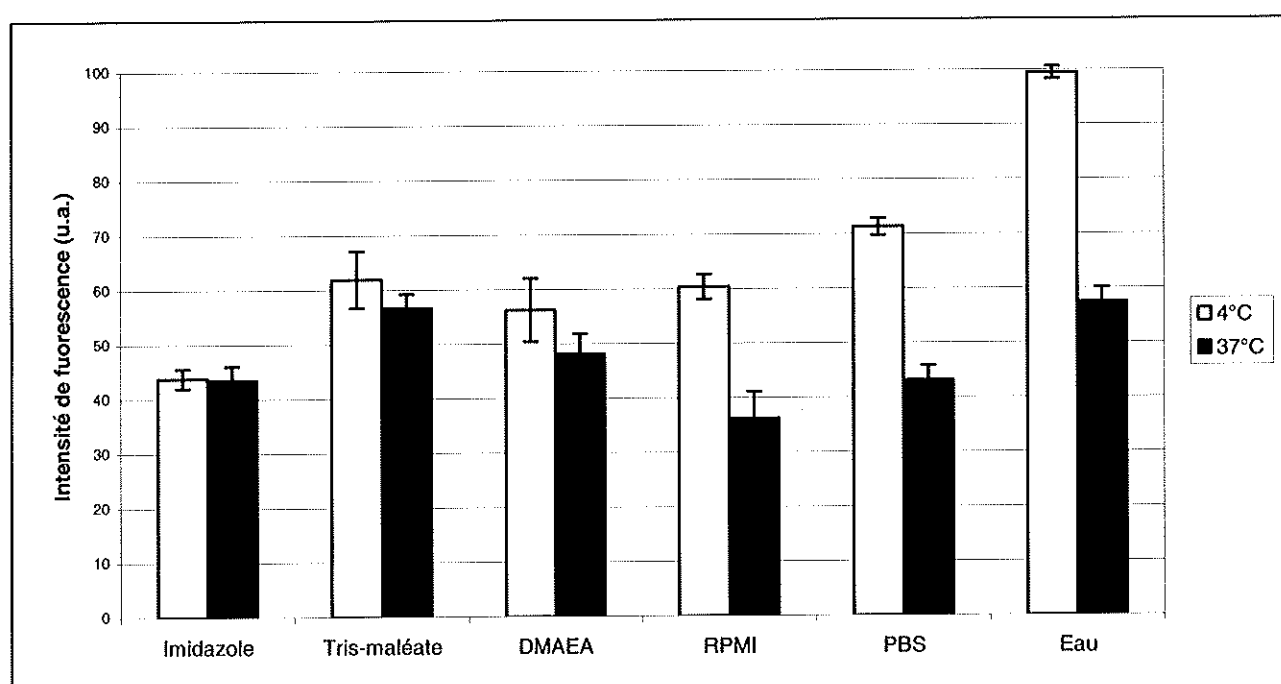


Figure 34 : Intensités de fluorescence dans les cellules C6 après 2 heures d'incubation avec des solutions d'ALA à 100 $\mu\text{g/ml}$ préparées extemporanément (T0) et dans différents solvants conservés à 4°C ou à 37°C.

II.3 - Influence du temps de conservation des solutions d'ALA

Le temps de conservation des différentes dilutions d'ALA avant leur incubation avec les cellules C6, et ce quels que soit les autres facteurs étudiés, montre une influence sur la capacité de l'ALA à synthétiser la PpIX. En effet, quand l'ALA est dissous dans le RPMI, le PBS et l'eau, l'intensité de fluorescence de la PpIX est significativement (test t de Student, $P < 0,05$) supérieure pour les cellules incubées avec une solution d'ALA préparée extemporanément (T0) comparée à une solution conservée pendant 60 minutes (T60) avant

son incubation avec les cellules (figure 35). Cette différence n'est pas statistiquement significative pour les solutions d'ALA préparées dans les solvants tampons.

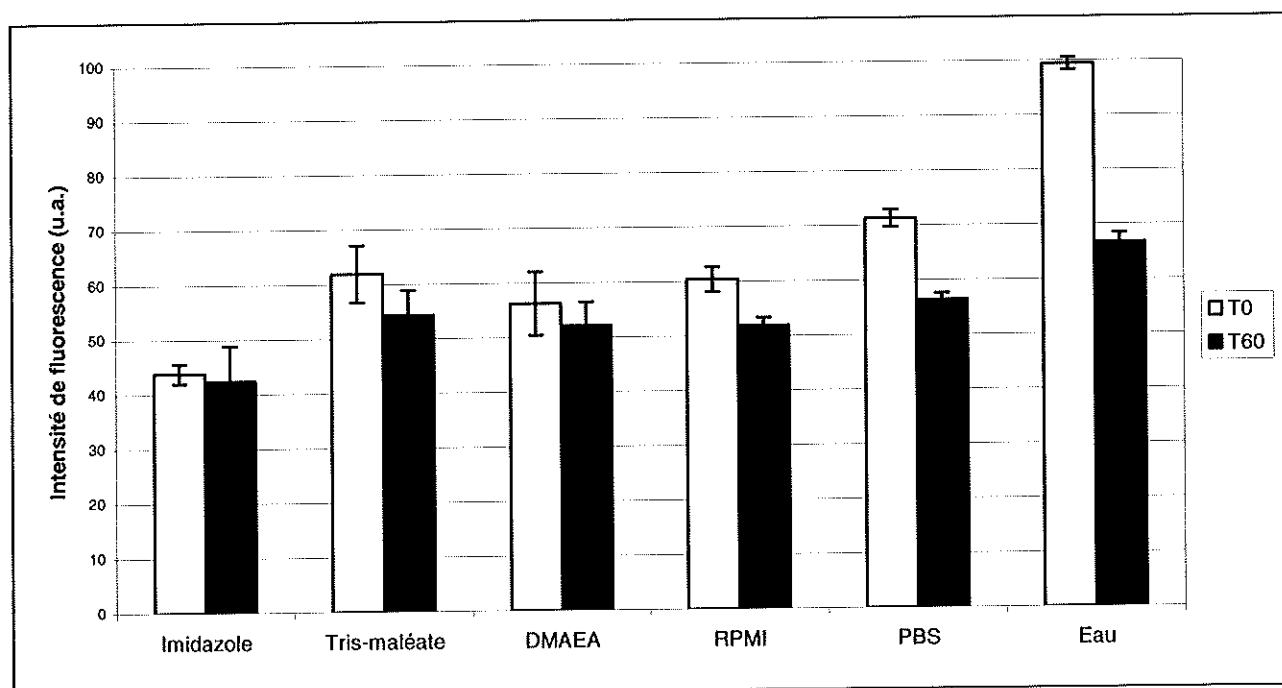


Figure 35 : Intensités de fluorescence de la PpIX dans les cellules C6 après 2 heures d'incubation avec des solutions d'ALA à 100 µg/ml préparées et ajoutées aux cellules immédiatement (T0) ou après 60 minutes (T60).

Cette intensité de fluorescence de la PpIX peut diminuer de 33 U.A. entre les valeurs à T0 et celles à T60 lorsque l'ALA est dilué dans l'eau.

II.4 - Influence du solvant de dilution de l'ALA

Lorsque nous observons les figures 32 à 35, nous remarquons que l'intensité de fluorescence de la PpIX est non seulement variable selon la température et le temps mais aussi selon le solvant employé pour dissoudre l'ALA.

Les trois solvants tampons réagissent approximativement de la même manière, ce qui n'est pas le cas des trois autres solvants. Comparés aux trois solvants utilisés couramment en culture cellulaire, les trois systèmes tampons semblent moins intéressants donnant des intensités de fluorescence plus faibles ; c'est pourquoi ils ne seront pas employés pour les études suivantes de phototoxicité.

De plus, la toxicité de ces trois solvants tampons n'ayant pas été analysée chez l'homme, ils semblent moins intéressants que les autres solvants pour une application potentielle en clinique chez l'homme. D'autre part, ces tampons n'existent pas dans le commerce sous forme liquide, leur préparation est donc plus longue.

Quant aux trois autres solvants, nous observons que l'intensité de fluorescence est supérieure quand les cellules sont incubées avec une solution d'ALA diluée dans l'eau. Ceci est vrai quels que soient la température et le temps de conservation de ces solutions. L'intensité de fluorescence obtenue avec une solution d'ALA diluée dans le PBS est certes, inférieure à celle de l'eau, mais supérieure à celle obtenue avec le RPMI (eau>PBS>RPMI).

En effet, les cellules incubées avec une solution d'ALA fraîche (T0) diluée dans l'eau à 4°C montrent une intensité de fluorescence de 99 U.A.. Cette intensité est de 71 U.A. pour une solution de PBS, et de 60 U.A. pour une solution de RPMI dans les mêmes conditions.

La figure suivante récapitule l'influence de tous les facteurs testés (température, temps, concentration et solvants) sur la capacité de l'ALA à induire la PpIX (figure 36).

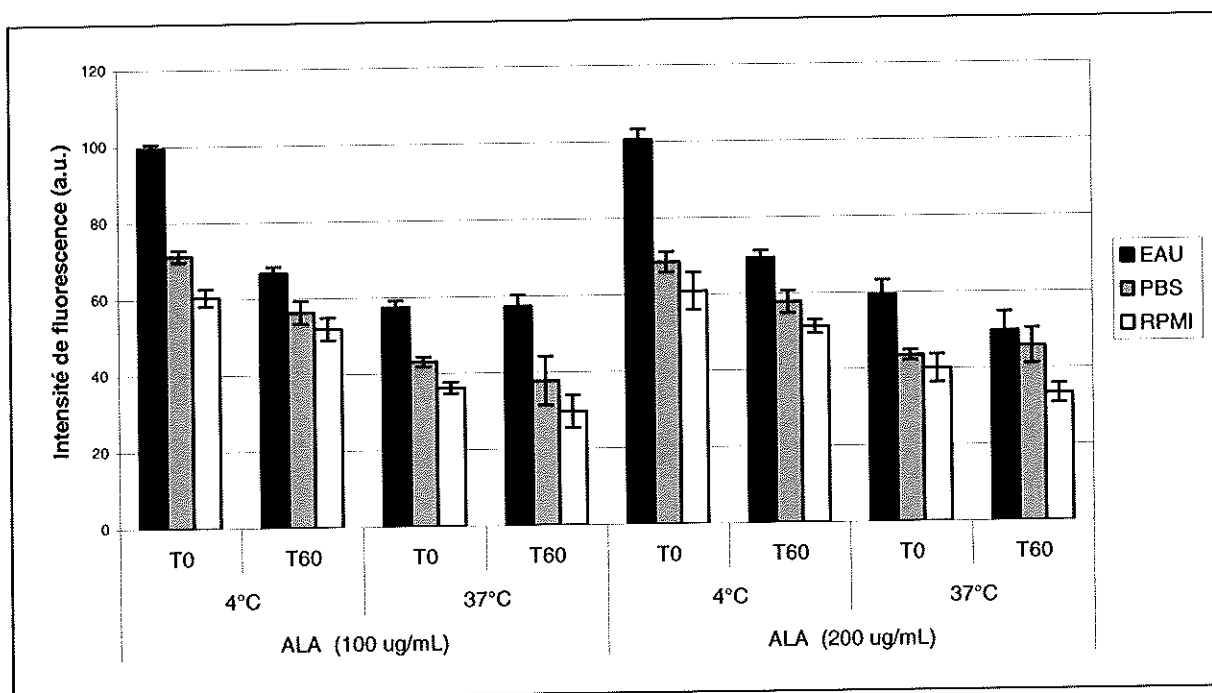


Figure 36 : Intensités de fluorescence de la PpIX mesurées après incubation de 2 heures des cellules C6 avec des solutions d'ALA de différentes concentrations, diluées dans différents solvants, conservées à différentes températures et ajoutées aux cellules immédiatement ou une heure après.

III - Etudes de phototoxicité de l'ALA

La toxicité des cellules non irradiées est toujours inexistante pour les cellules C6. Cinq solutions avec des concentrations initiales d'ALA différentes sont incubées pour obtenir cinq concentrations finales de 0, 20, 50, 100 et 200 $\mu\text{g/ml}$.

Pour toutes les conditions testées, la phototoxicité (630 nm, 25 J/cm^2) induite par les différentes dilutions d'ALA est proportionnelle à la concentration d'ALA employée sans aucune phototoxicité aberrante pour les concentrations les plus élevées. Cependant, une phototoxicité de plus de 80% est difficile à obtenir même pour la concentration la plus élevée de 200 $\mu\text{g/ml}$.

III.1 - Influence du solvant de dilution de l'ALA sur sa phototoxicité

L'ALA a été dissous dans trois solvants différents : eau pour préparation injectable, PBS et RPMI 1640. Ces trois solvants seuls (sans ALA) n'entraînent aucun effet ni de toxicité, ni de phototoxicité sur les cellules. Si nous considérons les expériences à T0 et à 37°C comme "références" en vue d'une application clinique avec administration extemporanée chez l'homme, la DL50 obtenue pour l'eau est de 81,2 $\mu\text{g/ml}$, 87,2 $\mu\text{g/ml}$ pour le PBS et 152 $\mu\text{g/ml}$ pour le RPMI (figure 37).

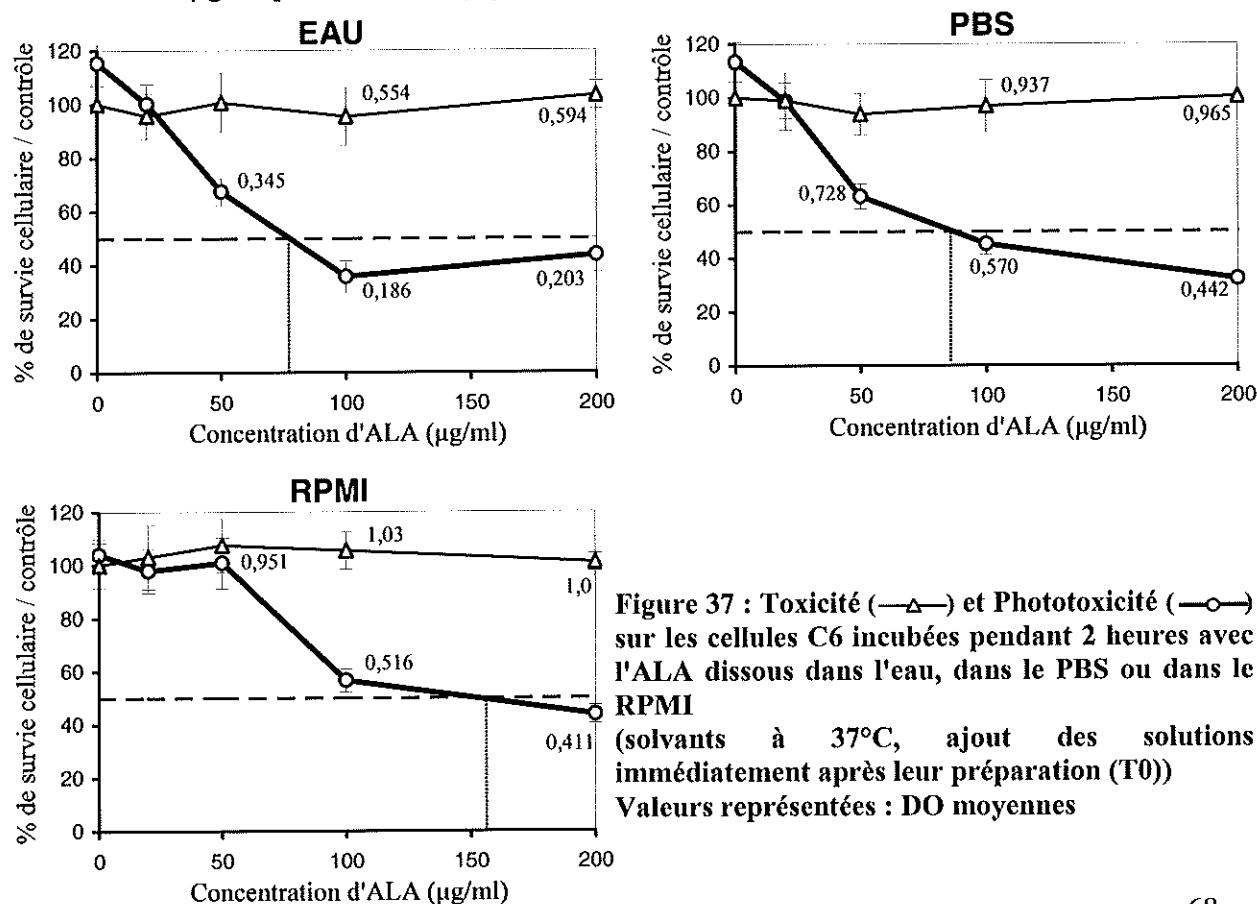
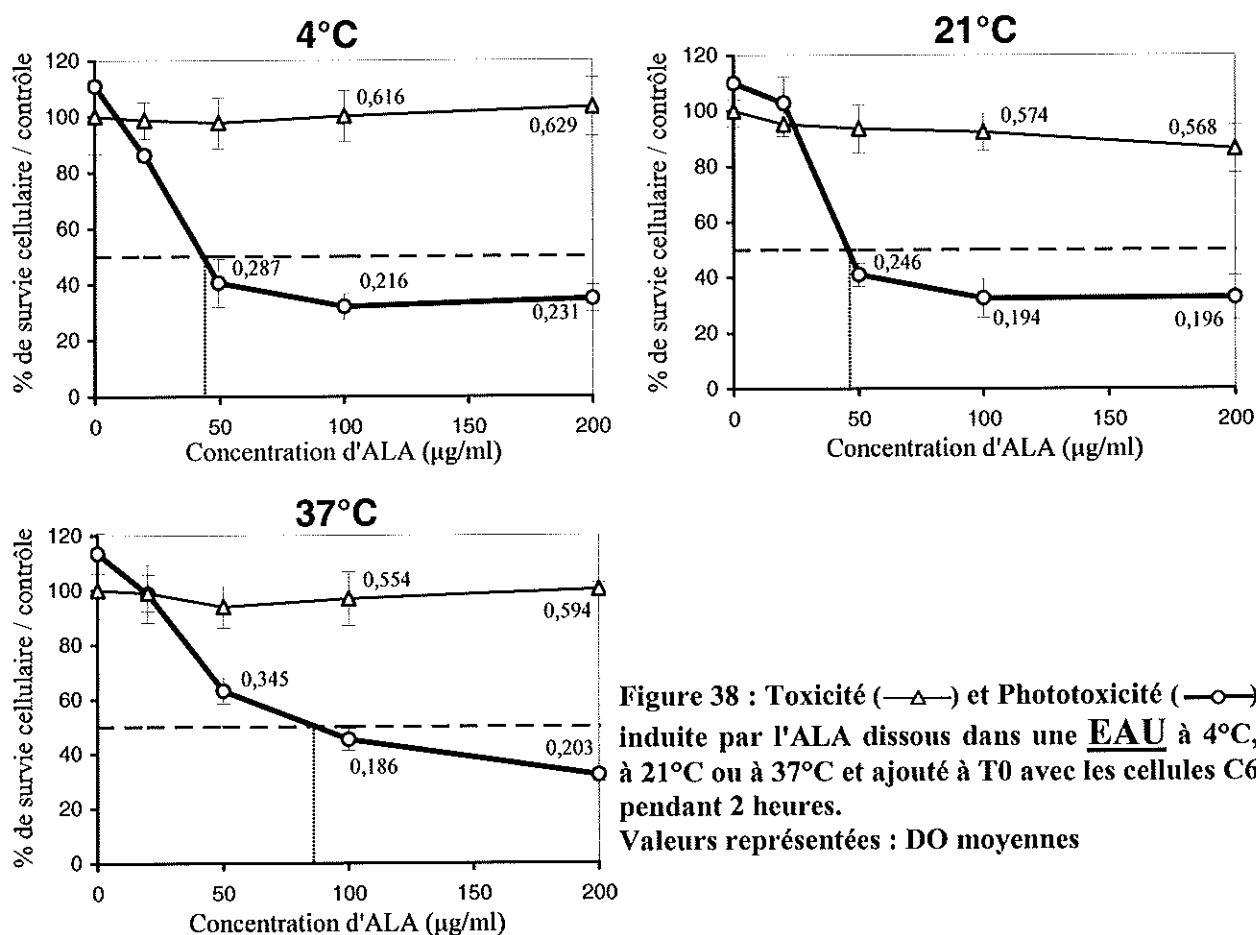


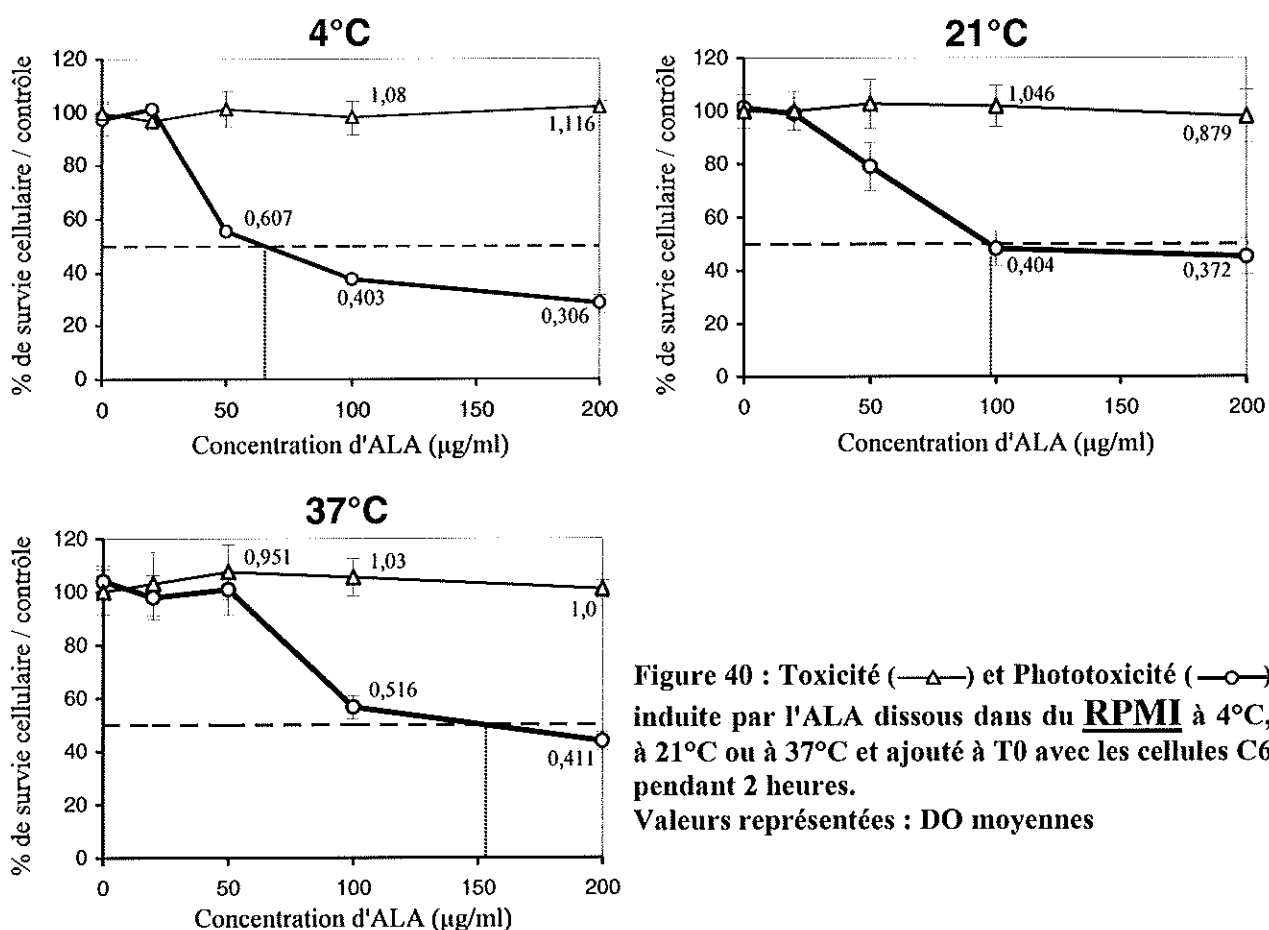
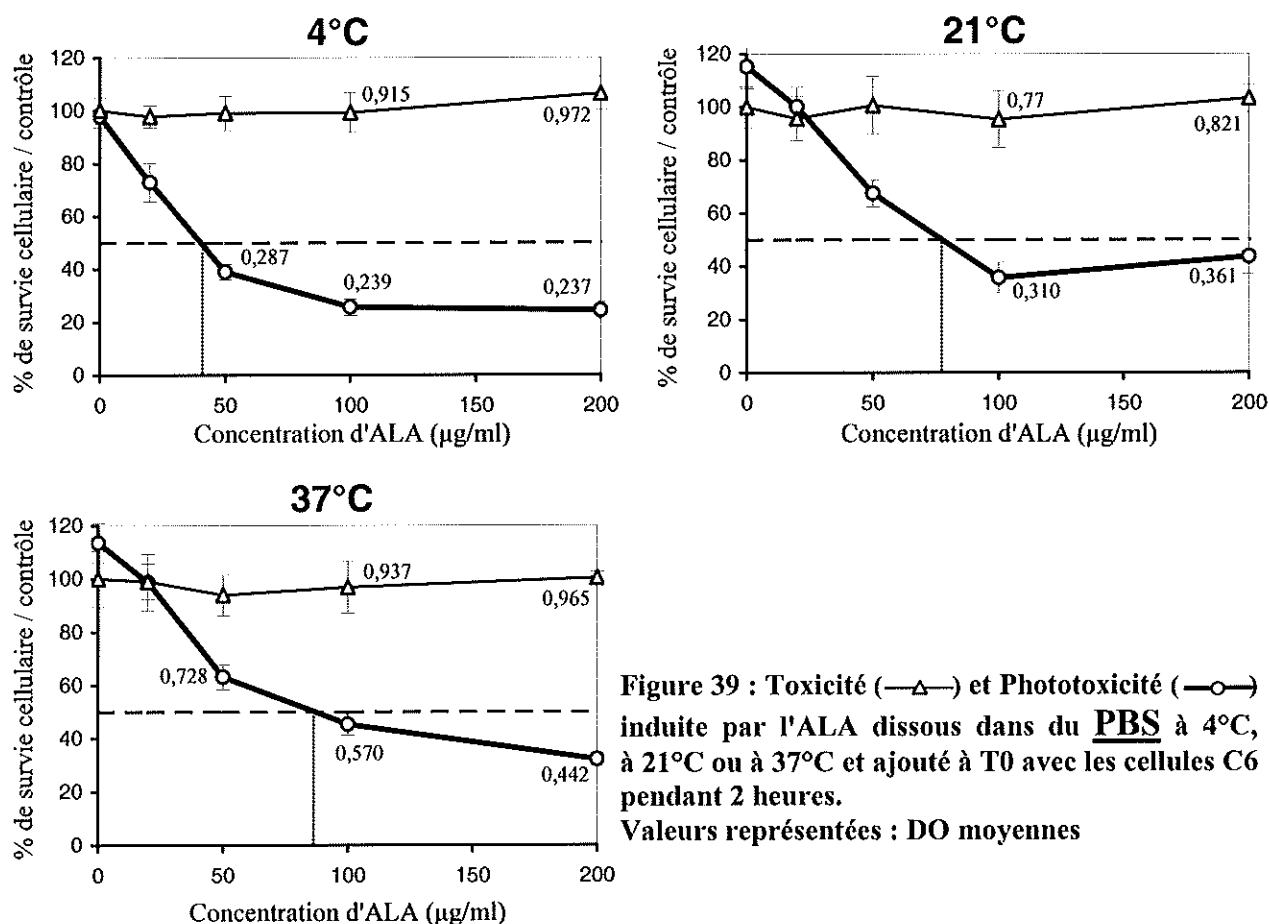
Figure 37 : Toxicité (— Δ —) et Phototoxicité (— $\circ$ —) sur les cellules C6 incubées pendant 2 heures avec l'ALA dissous dans l'eau, dans le PBS ou dans le RPMI (solvants à 37°C, ajout des solutions immédiatement après leur préparation (T0))
Valeurs représentées : DO moyennes

Une analyse statistique (test t de Student, $P < 0,05$) comparant les valeurs moyennes des DL50 montre une différence significative entre l'eau et le RPMI. Nous n'avons pas de différence significative entre l'eau et le PBS à T0 et à 37°C, mais la différence entre les valeurs des DL50 de ces deux solvants devient significative à 21°C.

III.2 - Influence de la température de conservation des solutions d'ALA

Les différentes solutions d'ALA sont préparées dans les solvants mis à 4°C, 21°C ou à 37°C la veille de la manipulation. Ces solutions sont conservées à ces différentes températures jusqu'à leur incubation avec les cellules C6. Quel que soit le solvant testé, quand la température augmente, la phototoxicité induite par l'ALA diminue. En effet, dans l'eau (figure 38), la DL50 à T0 est de 43,3 µg/ml à 4°C, 45,8 µg/ml à 21°C et 81,2 µg/ml à 37°C. Dans le PBS (figure 39), à T0 la DL50 est de 44 µg/ml à 4°C, 86 µg/ml à 21°C et de 87,2 µg/ml à 37°C. Et finalement, dans le RPMI (figure 40), la DL50 à T0 est de 65 µg/ml à 4°C, 97 µg/ml à 21°C et de 152 µg/ml à 37°C. Il y a une différence significative entre les valeurs moyennes de DL50 à 4°C et celles à 37°C (test t de Student, $P < 0,05$) pour les trois solvants testés.





III.3 - Influence du temps de conservation des solutions d'ALA

Les solutions d'ALA préparées dans différents solvants sont incubées avec les cellules C6 immédiatement (T0), 20 minutes (T20) ou 60 minutes (T60) après leur préparation. Entre chaque incubation les tubes contenant les solutions sont conservés à l'abri de la lumière et soit au réfrigérateur (4°C), soit à température ambiante (21°C) ou soit dans un incubateur à température contrôlée (37°C).

A chaque expérience, nous observons que plus les solutions sont préparées extemporanément et placées directement avec les cellules, plus la DL50 diminue et donc plus la phototoxicité induite par l'ALA sur les cellules C6 est importante. Ce phénomène est présent pour toutes les températures et tous les solvants testés. Des analyses statistiques (test t de Student, $P < 0,05$) montrent une différence significative entre les valeurs moyennes des DL50 entre T0 et T60 pour les trois solvants utilisés.

Dans l'eau (figure 41) à température ambiante, la DL50 est de 45,8 µg/ml à T0, 58,5 µg/ml à T20 et 67,5 µg/ml à T60.

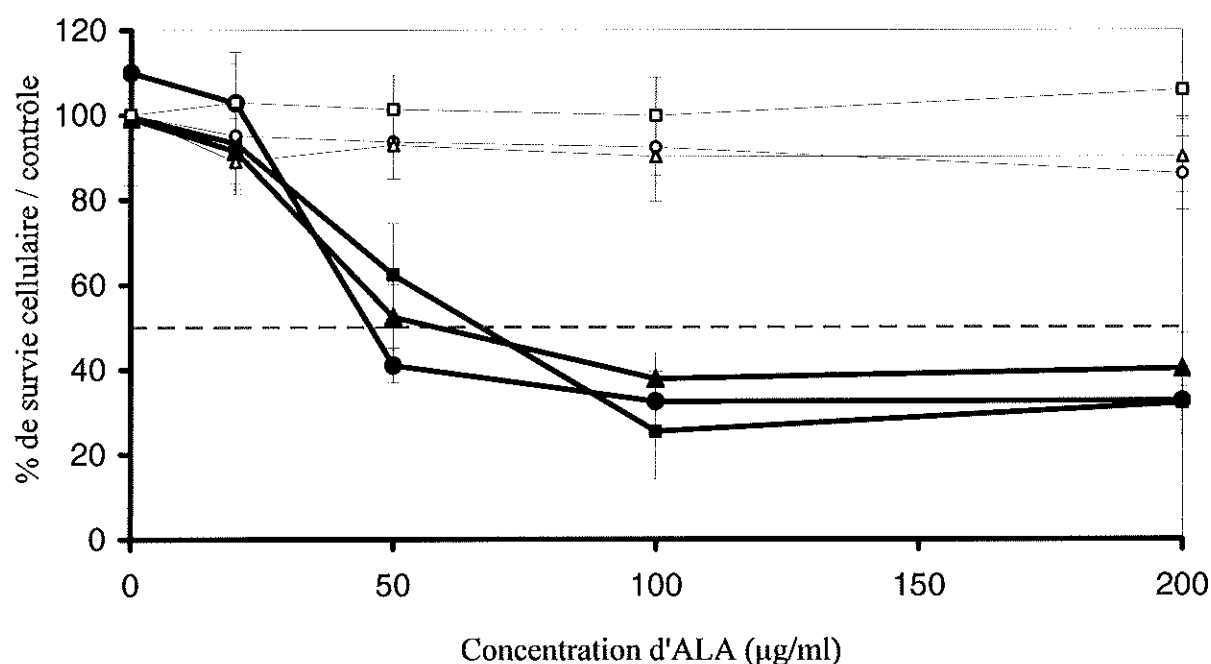


Figure 41 : Toxicité (○;△;□) et Phototoxicité (●;▲;■) des cellules C6 incubées pendant 2h avec une solution d'ALA diluée dans l'EAU à température ambiante et ajoutée aux cellules immédiatement (T0;●;○), 20 minutes (T20;▲;△) ou 60 minutes (T60;■;□) après leur préparation.

Dans le PBS (figure 42) conservé à 21°C, la DL50 est de 86 µg/ml à T0, 98,3 µg/ml à T20 et 145 µg/ml à T60.

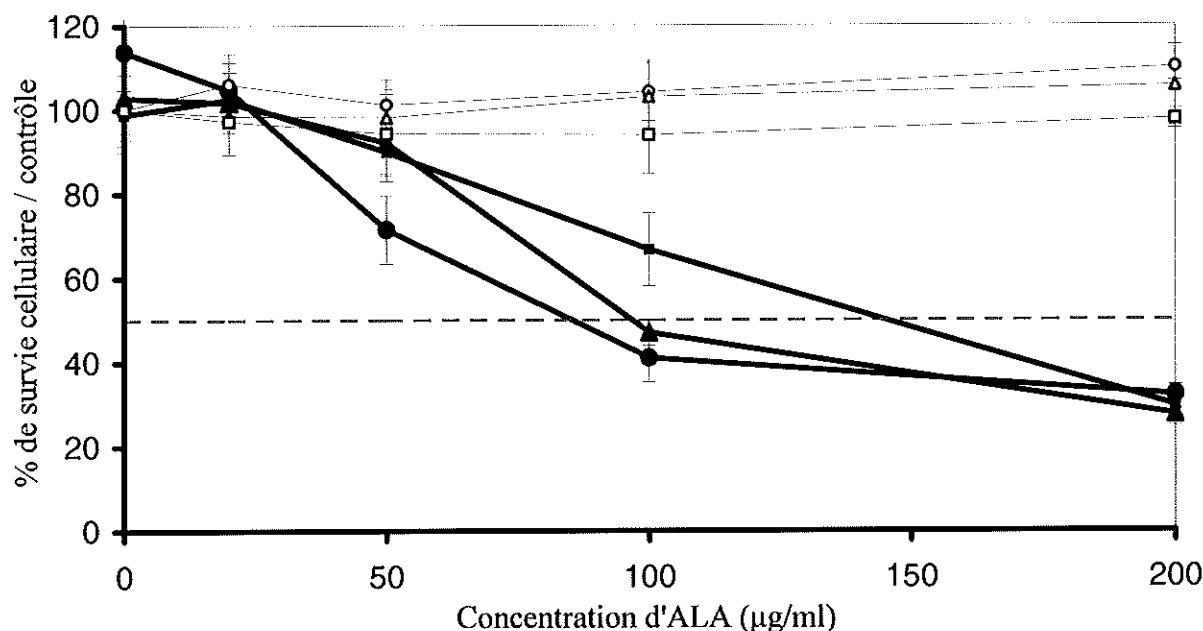


Figure 42 : Toxicité (○;△;□) et Phototoxicité (●;▲;■) des cellules C6 incubées pendant 2h avec une solution d'ALA diluée dans le PBS à température ambiante et ajoutée aux cellules immédiatement (T0;●;○), 20 minutes (T20;▲;△) ou 60 minutes (T60;■;□) après leur préparation.

Puis, dans le RPMI (figure 43) conservé à 21°C, la DL50 est de 97 µg/ml à T0, 200 µg/ml à T20 et supérieure à 200 µg/ml à T60.

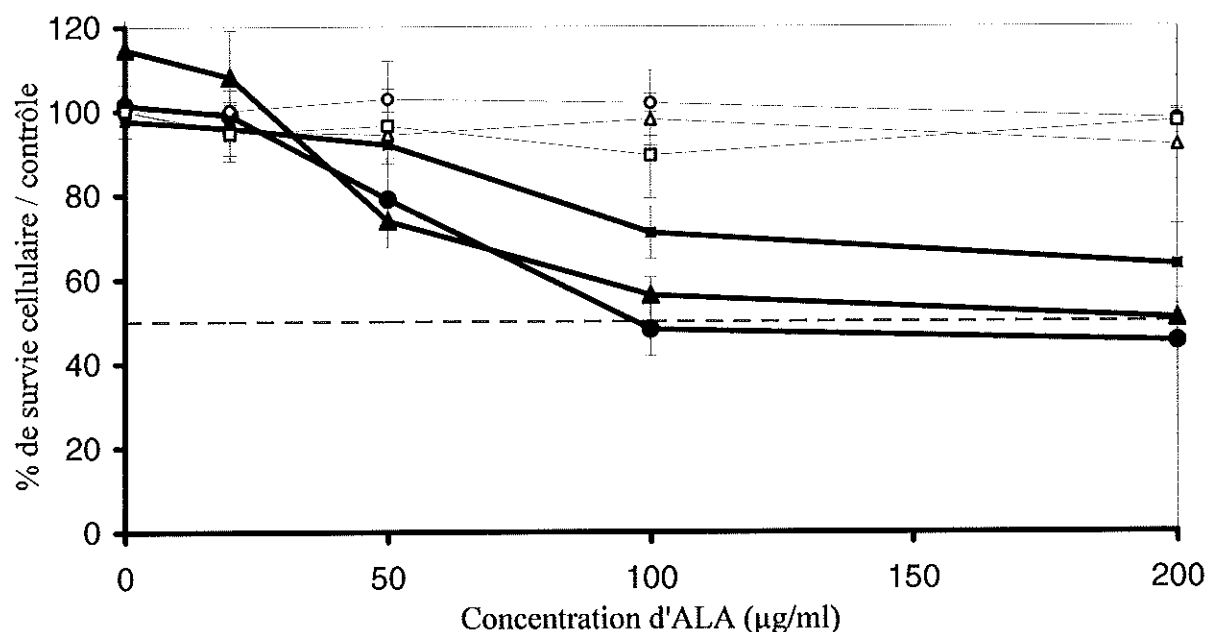


Figure 43 : Toxicité (○;△;□) et Phototoxicité (●;▲;■) des cellules C6 incubées pendant 2h avec une solution d'ALA diluée dans le RPMI à température ambiante et ajoutée aux cellules immédiatement (T0;●;○), 20 minutes (T20;▲;△) ou 60 minutes (T60;■;□) après leur préparation.

III.4 - Influence de tous les facteurs étudiés sur la phototoxicité induite par l'ALA

Quand nous comparons les résultats de phototoxicité obtenus pour les cellules C6 incubées avec une solution d'ALA dissous dans l'eau à 4°C et ajoutée immédiatement après sa préparation (T0) avec ceux obtenus pour les cellules incubées avec une solution d'ALA préparée dans du RPMI et ajoutée aux cellules 60 minutes (T60) après sa préparation, nous observons une différence largement significative de DL50 de plus de 156,5 µg/ml (43,3 µg/ml pour l'eau et plus de 200 µg/ml pour le RPMI) (tableau 2 et figure 44).

Il semblerait selon les différents résultats obtenus qu'il existe un effet cumulatif ; plus nous mettons l'ALA dans de bonnes conditions (T0, 4°C, eau), moins l'ALA se dégrade et plus la phototoxicité induite par l'ALA sur les cellules C6 est efficace et inversement.

			Eau	PBS	RPMI
valeurs des DL50 (µg/ml)	4°C	T0	43,34 ± 5	43,9 ± 4	65 ± 3
		T20	49,88 ± 5	53 ± 6	78 ± 2
		T60	54 ± 4	76,6 ± 5	91 ± 5
	21°C	T0	45,8 ± 6	86 ± 3	97 ± 4
		T20	58,5 ± 5,5	98,34 ± 7	200 ± 10
		T60	67,5 ± 4	145 ± 13	> 200
	37°C	T0	81,17 ± 5	87,17 ± 3	152 ± 3
		T20	83,17 ± 6	90 ± 5	> 200
		T60	120,33 ± 8	150 ± 4	> 200

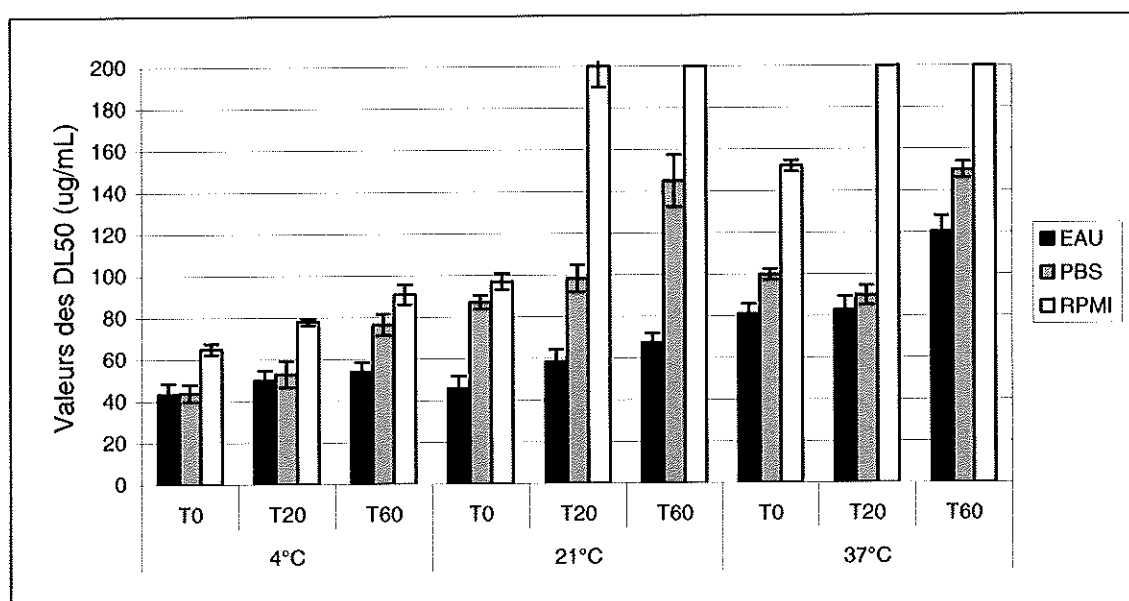


Tableau 2 et figure 44 : DL50 mesurées après incubation de 2 heures des cellules C6 avec des solutions d'ALA de différentes concentrations (0-200 µg/ml), diluées dans différents solvants (eau, PBS, RPMI), conservées à différentes températures (4°C, 21°C, 37°C) et ajoutées aux cellules immédiatement (T0), 20 minutes (T20) ou une heure (T60) après leur préparation, et irradiées par une diode laser (630 nm, 25 J/cm²)

IV - Etudes de phototoxicité : rapport 1/40

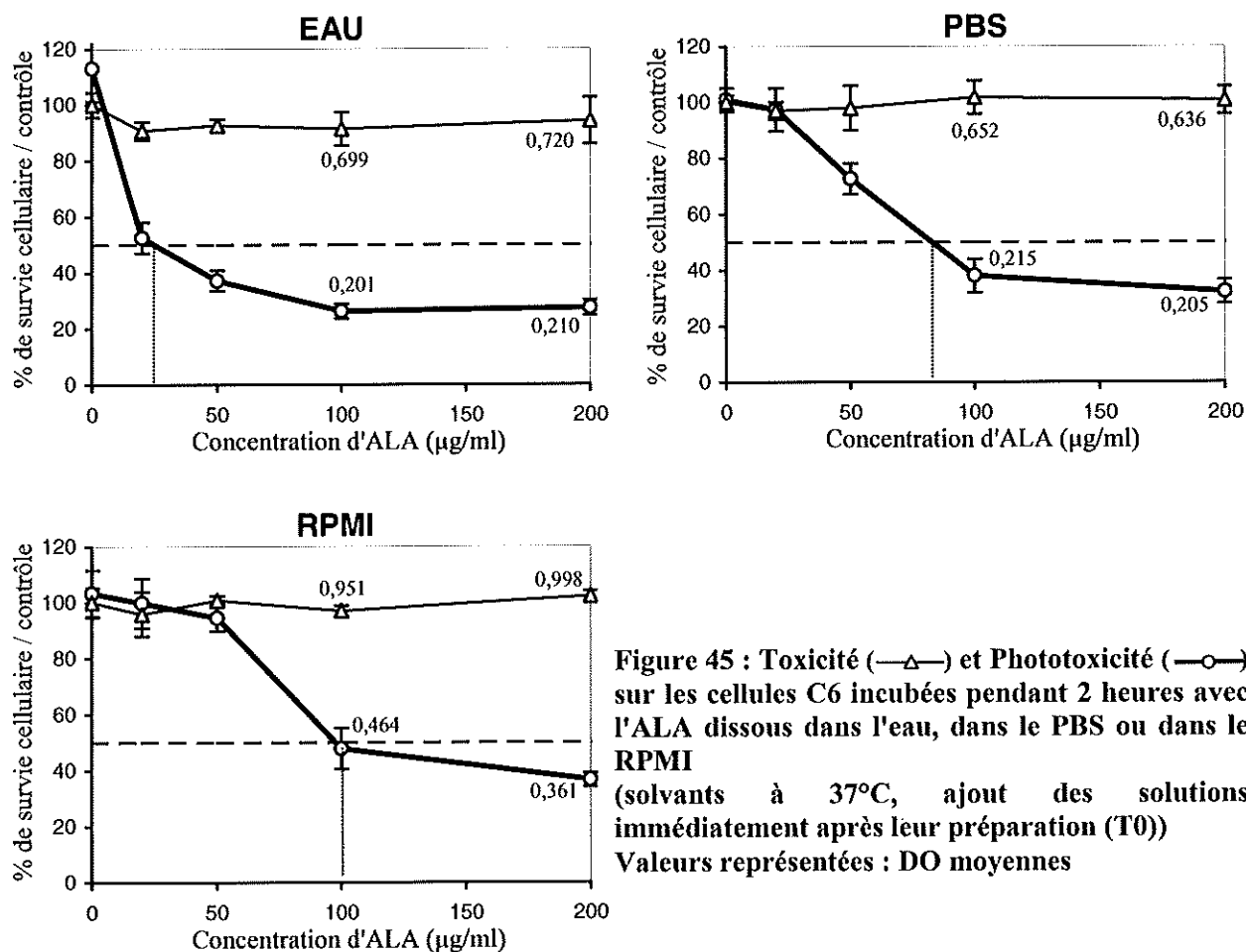
La toxicité des cellules non irradiées est toujours inexistante pour les cellules C6. Cinq solutions avec des concentrations initiales d'ALA différentes sont incubées pour obtenir cinq concentrations finales de 0, 20, 50, 100 et 200 µg/ml.

Pour toutes les conditions testées, la phototoxicité (630 nm, 25 J/cm²) induite par les différentes dilutions d'ALA est proportionnelle à la concentration d'ALA employée sans aucune phototoxicité aberrante pour les concentrations les plus élevées. La concentration n'influence donc pas la dégradation de l'ALA pour les doses utilisées.

Dans cette expérience, nous avons utilisé un rapport solvant/cellule de 2,5 µl de solution d'ALA pour 100 µl de milieu RPMI/FCS (seule modification apportée par rapport à l'expérience de phototoxicité précédente où le rapport était de 11 µl pour 100 µl, chapitre III). L'étude de la phototoxicité sur les cellules C6 induite par l'ALA en utilisant ce nouveau rapport de 1/40 a été réalisée en vue d'une utilisation clinique de la solution d'ALA (perfusion de 100 ml) chez l'homme (environ 4 litres de sang).

IV.1 - Influence du solvant de dilution de l'ALA sur sa phototoxicité : rapport 1/40

Comme dans l'expérience précédente (chapitre III) employant un rapport solution d'ALA/milieu de culture de 1/10, le solvant de dilution dans cette nouvelle manipulation montre une influence sur la stabilité de l'ALA en solution. En effet, lorsque l'ALA est dissous dans l'eau, sa phototoxicité sur les cellules C6 est supérieure à celle quand il est dissous dans le PBS qui elle, est supérieure à celle induite par une solution d'ALA dissous dans du RPMI. Si nous considérons les expériences à T0 et à 37°C comme "références" en vue d'une application clinique avec administration extemporanée chez l'homme, la DL50 pour l'eau est de 22,75 µg/ml, 84,25 µg/ml pour le PBS et 100 µg/ml pour le RPMI (figure 45).



IV.2 - Influence de la température de conservation des solutions d'ALA : rapport 1/40

Les différentes solutions d'ALA sont préparées dans les différents solvants conservés à 4°C ou à 37°C. Ces solutions sont ensuite maintenues à ces deux températures jusqu'à leur incubation avec les cellules C6.

Quel que soit le solvant testé, quand la température augmente, la phototoxicité induite par l'ALA diminue. Il y a une différence significative entre les valeurs moyennes de DL50 à 4°C et celles à 37°C (test t de Student, $P < 0,05$) pour les trois solvants testés.

En effet, dans l'eau (figure 46), la DL50 à T0 est de 14,75 $\mu\text{g/ml}$ à 4°C et de 22,75 $\mu\text{g/ml}$ à 37°C.

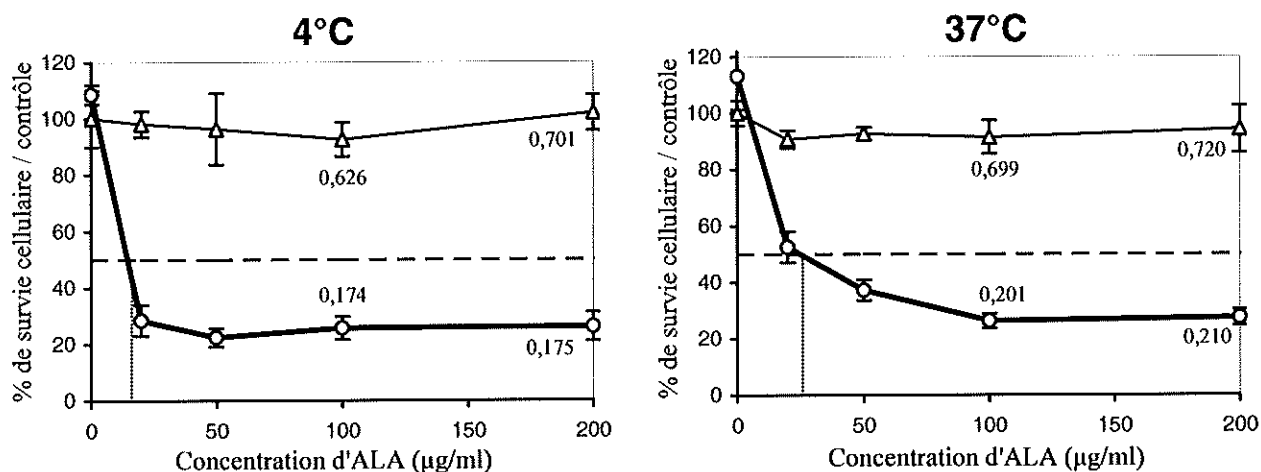


Figure 46 : Toxicité (—△—) et Phototoxicité (—○—) induite par l'ALA dissous dans de l'EAU conservée à 4°C ou à 37°C et ajouté à T0 avec les cellules C6 pendant 2 heures.
Valeurs représentées : DO moyennes

Dans le PBS (figure 47), à T0 la DL50 est de 68 $\mu\text{g/ml}$ à 4°C et de 84,25 $\mu\text{g/ml}$ à 37°C.

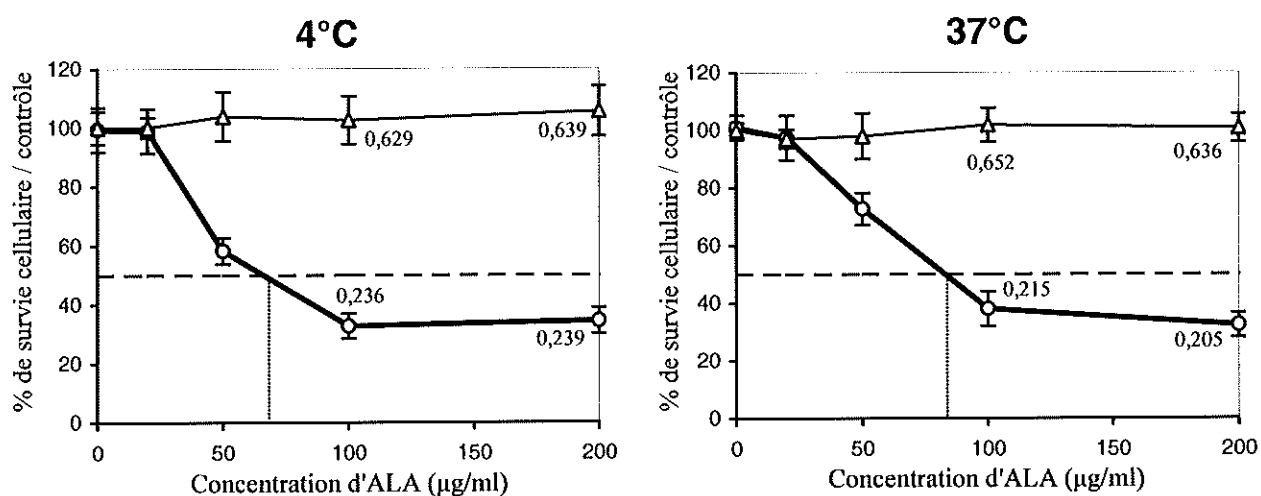


Figure 47 : Toxicité (—△—) et Phototoxicité (—○—) induite par l'ALA dissous dans du PBS conservée à 4°C ou à 37°C et ajouté à T0 avec les cellules C6 pendant 2 heures.
Valeurs représentées : DO moyennes

Et finalement, dans le RPMI (figure 48), la DL50 à T0 est de 78 µg/ml à 4°C et de 100 µg/ml à 37°C.

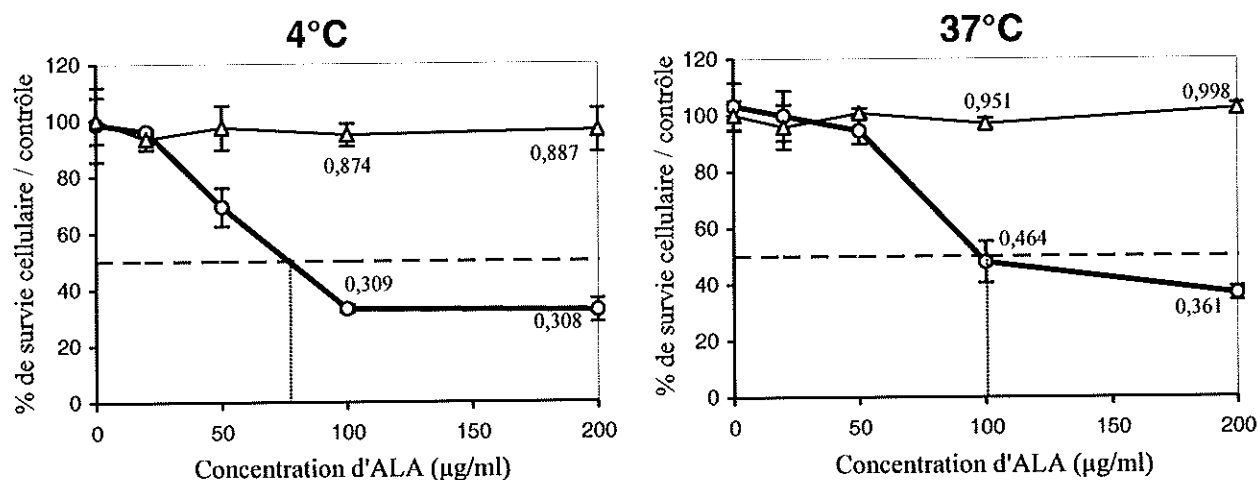


Figure 48 : Toxicité (—△—) et Phototoxicité (—○—) induite par l'ALA dissous dans du RPMI conservée à 4°C ou à 37°C et ajouté à T0 avec les cellules C6 pendant 2 heures.
Valeurs représentées : DO moyennes

IV.3 - Influence du temps de conservation des solutions d'ALA : rapport 1/40

Le temps de conservation des différentes solutions d'ALA a une influence sur la phototoxicité induite par l'ALA sur les cellules C6 et donc sur la stabilité de l'ALA en solution.

En effet, plus les solutions d'ALA sont incubées rapidement avec les cellules C6 après leur préparation, plus la phototoxicité induite par l'ALA est efficace ($T_0 > T_{20} > T_{60}$). Nous obtenons par exemple pour les cellules incubées pendant 2 heures avec une solution aqueuse (figure 49) d'ALA conservée à 37°C des DL50 de 22,75 µg/ml à T0, 58,5 µg/ml à T20 et 111,5 µg/ml à T60. De même, pour les solutions préparées dans le PBS (figure 50) et conservées à 37°C, nous obtenons une DL50 de 84,25 µg/ml à T0, 96 µg/ml à T20 et 153 µg/ml à T60. Puis, pour le RPMI (figure 51), nous avons une DL50 de 100 µg/ml à T0, 136,5 µg/ml à T20 et 190,75 µg/ml à T60.

Tous ces résultats ont été analysés statistiquement par un test t de Student, ils ont tous montré une différence significative entre T0 et T60 à $P < 0,01$ et une différence significative à $P < 0,05$ entre T0 et T20.

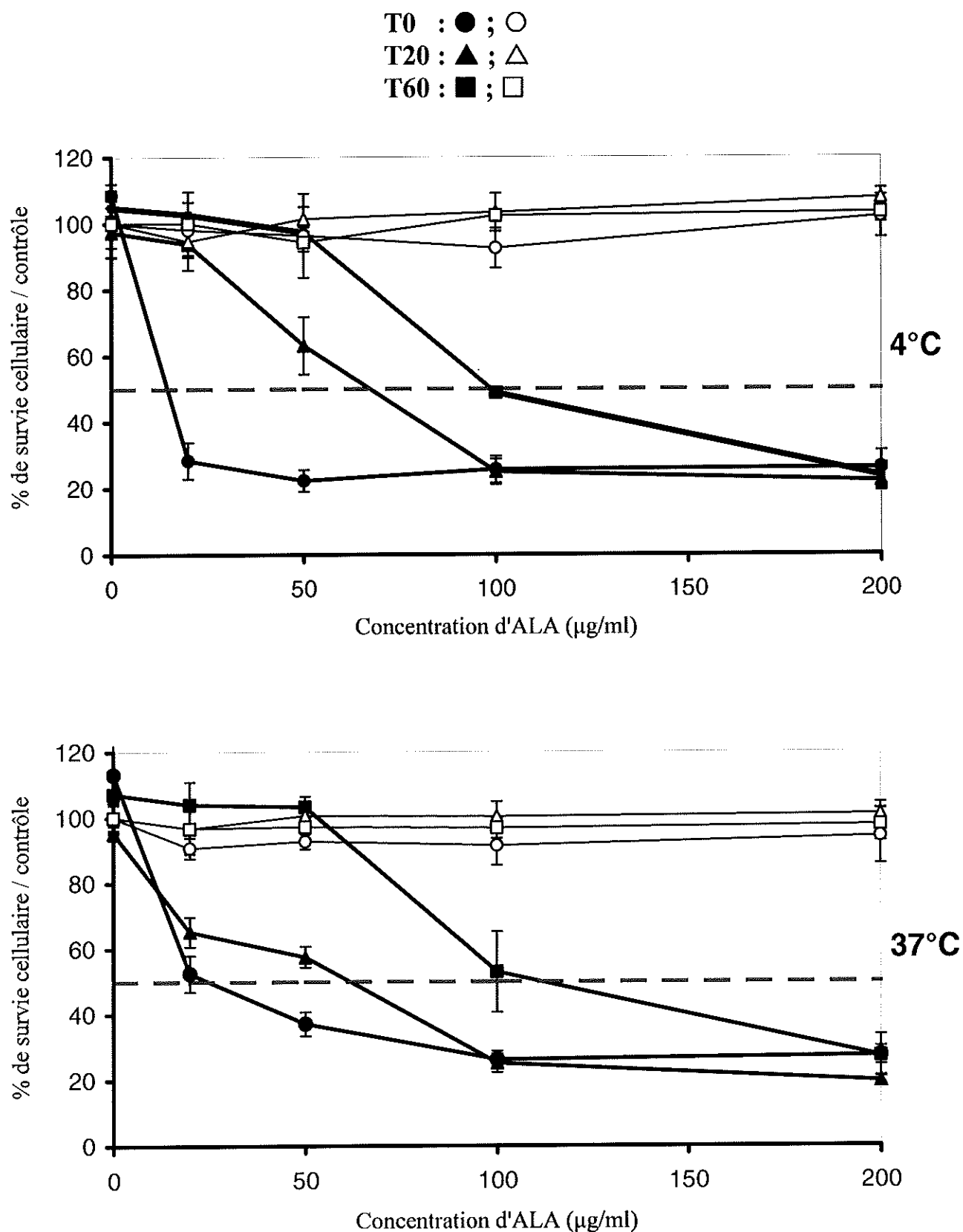


Figure 49 : Toxicité (○;△;□) et Phototoxicité (●;▲;■) des cellules C6 incubées pendant 2h avec une solution d'ALA dilué dans l'EAU, conservées à 4°C ou à 37°C et ajoutée aux cellules immédiatement (T0;●;○), 20 minutes (T20;▲;△) ou 60 minutes (T60;■;□) après leur préparation.

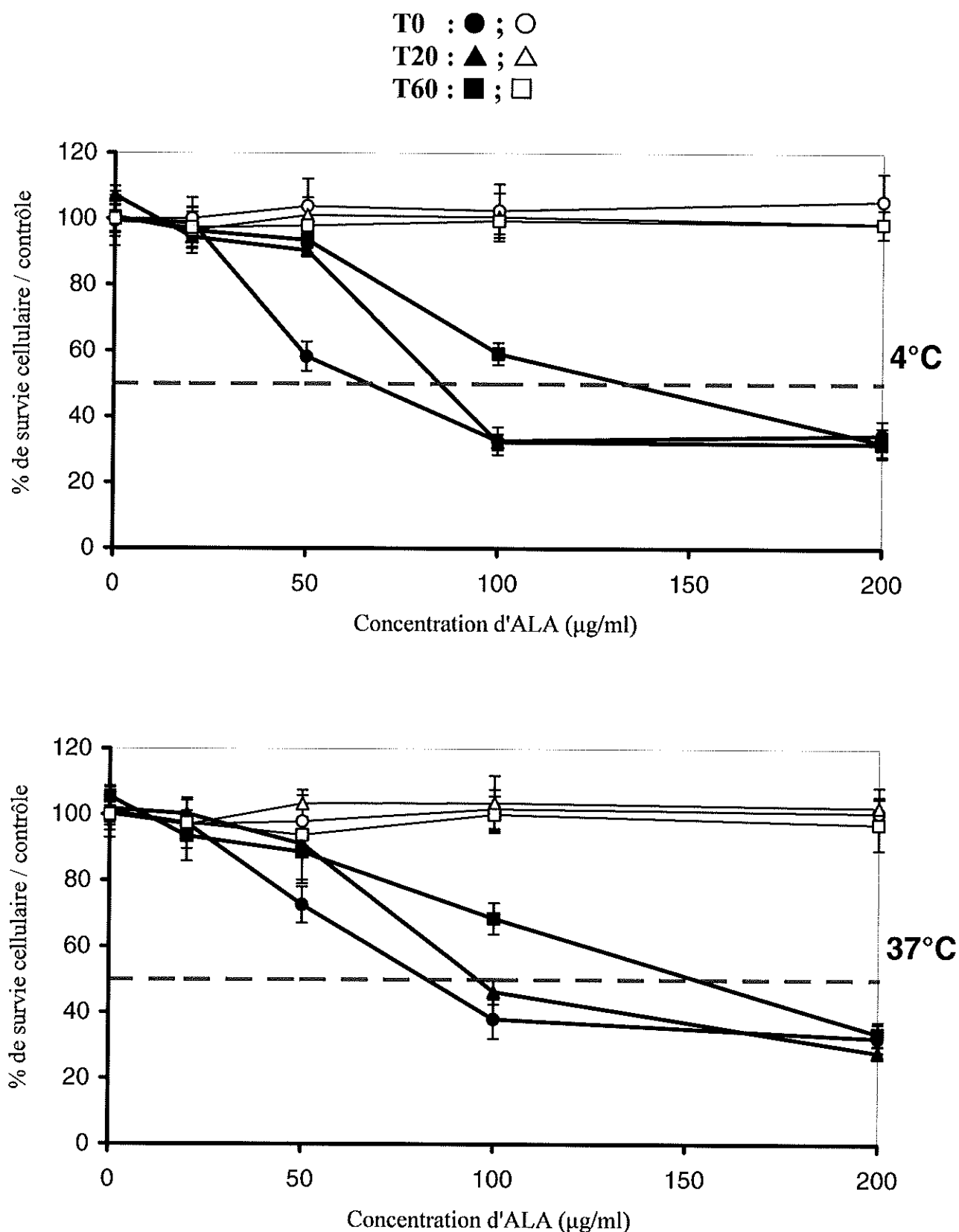


Figure 50 : Toxicité (○;△;□) et Phototoxicité (●;▲;■) des cellules C6 incubées pendant 2h avec une solution d'ALA dilué dans le **PBS**, conservées à 4°C ou à 37°C et ajoutée aux cellules immédiatement (T0;●;○), 20 minutes (T20;▲;△) ou 60 minutes (T60;■;□) après leur préparation.

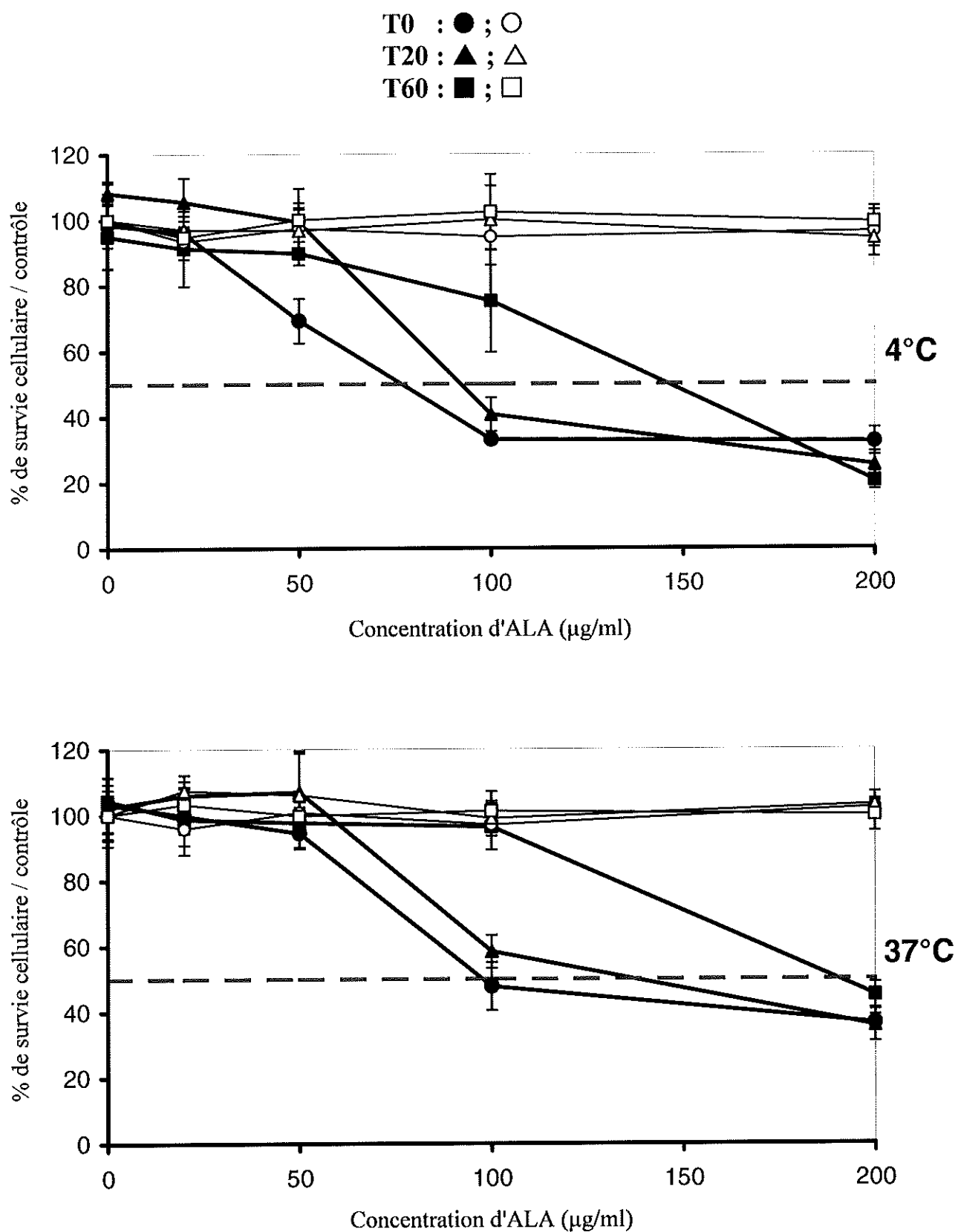


Figure 51 : Toxicité (○;△;□) et Phototoxicité (●;▲;■) des cellules C6 incubées pendant 2h avec une solution d'ALA dilué dans le RPMI, conservées à 4°C ou à 37°C et ajoutée aux cellules immédiatement (T0;●;○), 20 minutes (T20;▲;△) ou 60 minutes (T60;■;□) après leur préparation.

IV.4 - Influence de tous les facteurs étudiés sur la phototoxicité induite par l'ALA sur les cellules C6 : rapport 1/40

Il semblerait qu'il existe un effet cumulatif des différents facteurs étudiés ; plus nous mettons l'ALA dans de bonnes conditions (T0, 4°C, eau), plus la phototoxicité induite par l'ALA sur les cellules C6 est efficace et inversement (tableau 3 et figure 51).

De plus, lorsque nous comparons les DL50 observées lors de cette expérience utilisant un rapport ALA/milieu de 1/40 avec celles de l'étude précédente (chapitre III, rapport ALA/milieu de 1/10), nous observons qu'à 4°C, les DL50 dans l'étude 1/40 sont globalement plus élevées. Il semblerait ainsi qu'à 4°C, plus la solution mère d'ALA est concentrée, plus l'ALA se dégrade et donc moins sa phototoxicité est efficace.

			Eau	PBS	RPMI
valeurs des DL50 ($\mu\text{g/ml}$)	4°C	T0	14,75 $\pm$ 0,5	68 $\pm$ 6	78 $\pm$ 7
		T20	68,75 $\pm$ 0,5	84,75 $\pm$ 4	93 $\pm$ 6
		T60	99,15 $\pm$ 0,5	133,25 $\pm$ 14	145,75 $\pm$ 3
	37°C	T0	22,75 $\pm$ 1	84,25 $\pm$ 7	100 $\pm$ 6
		T20	58,5 $\pm$ 9	96 $\pm$ 1,5	136,5 $\pm$ 6
		T60	111,5 $\pm$ 6	153 $\pm$ 14	190,75 $\pm$ 2,5

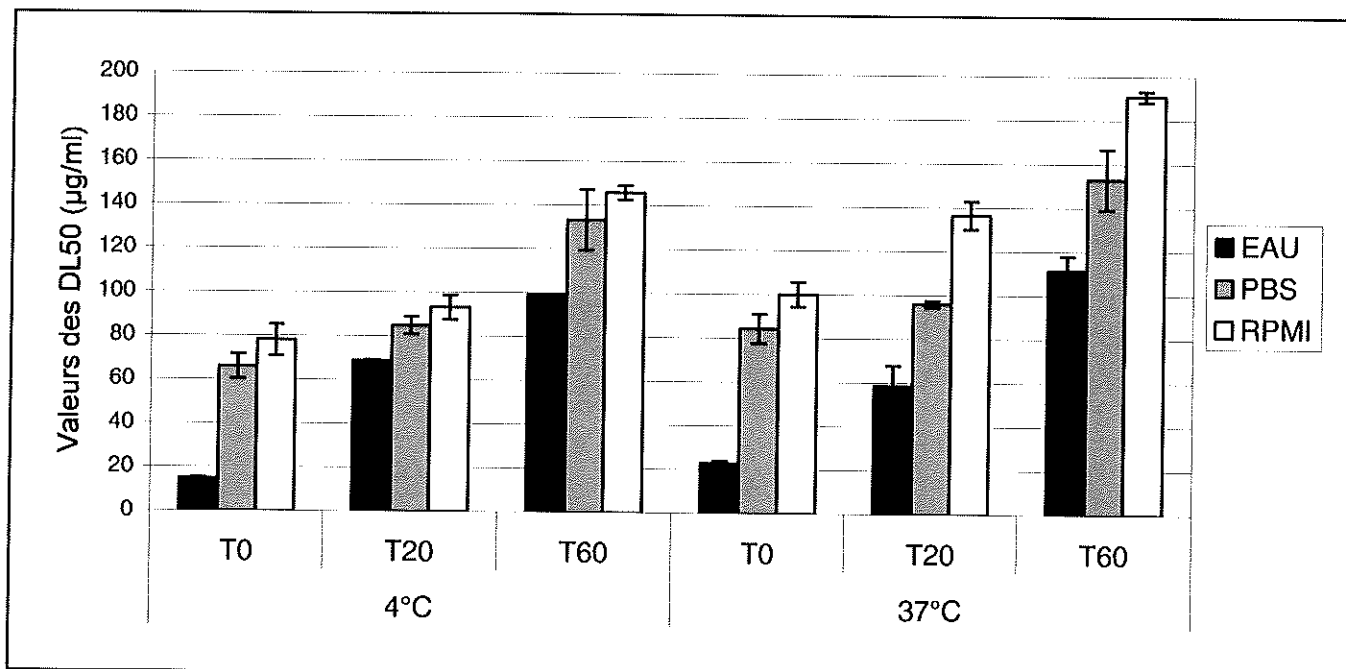


Tableau 3 et figure 52 : DL50 mesurées après incubation de 2 heures des cellules C6 avec des solutions d'ALA de différentes concentrations (0-200 $\mu\text{g/ml}$), diluées dans différents solvants (eau, PBS, RPMI), conservées à différentes températures (4°C ou 37°C) et ajoutées aux cellules immédiatement (T0), 20 minutes (T20) ou une heure (T60) après leur préparation, et irradiées par une diode laser (630 nm, 25 J/cm²)

DISCUSSION

La thérapie photodynamique utilisant l'acide δ -aminolévulinique comme photosensibilisant (ALA-PDT) fait l'étude de nombreuses recherches aussi bien expérimentales que cliniques (dermatologie, cancers gastro-intestinaux...). Pour une utilisation clinique de cette substance, une forme stable et stérile est obligatoire. Cependant, les propriétés de stabilité de l'ALA en solution ne sont pas encore très bien définies. C'est pourquoi nous avons analysé l'influence de la concentration, de la température, du temps et de la nature du solvant de dilution sur cette stabilité.

Au cours de cette discussion, nous rappellerons dans un premier temps les avantages en photochimiothérapie et en photodiagnostic de la protoporphyrine IX induite par l'administration de son précurseur, l'ALA. Puis, nous ferons un point sur les différentes applications cliniques actuelles mais également futures de l'ALA-PDT.

Enfin, nous évoquerons les problèmes d'instabilité de l'ALA en solution et nous analyserons les facteurs susceptibles d'être responsables de cette instabilité. Les résultats très hétérogènes des études antérieures seront alors comparés à ceux obtenus lors de nos expériences.

Avantages et applications cliniques de l'ALA

L'ALA-PDT utilisant la synthèse d'un photosensibilisant interne, la PpIX a été largement étudiée depuis sa première application en 1990. Elle est aujourd'hui employée aussi bien en application locale qu'en administration systémique (voie orale essentiellement). En effet, L'ALA a démontré son efficacité en administration locale sur des lésions cutanées et sur des organes internes comme la vessie ou l'utérus et également en administration systémique *via* la voie orale ou parentérale sur des cancers internes.

Le grand inconvénient d'une administration systémique d'un photosensibilisant est la phototoxicité cutanée qui en résulte. Cette phototoxicité est largement diminuée chez les patients traités par l'ALA. Une approche alternative pour traiter les lésions précancéreuses épithéliales comme les kératoses actiniques et la maladie de Bowen, de même que les tumeurs superficielles de la peau comme les carcinomes baso-cellulaires est l'application topique de photosensibilisants tels que l'ALA. L'application topique de l'ALA entraîne une nécrose sélective des tissus et la destruction de la tumeur avec en plus des résultats cosmétiques excellents.

Les tumeurs superficielles de la peau sont les formes les plus communes de cancer dans les populations à peau claire. Les plus courants sont les carcinomes baso-cellulaires (BCC) et les épithéliomas malpighiens. Rien qu'aux Etats-Unis, plus de 500 000 BCC et 100 000 épithéliomas malpighiens sont diagnostiqués chaque année. La mortalité due à ces cancers est faible mais peut toucher les jeunes enfants. Actuellement, certaines thérapies existent pour traiter ces lésions comme la cryothérapie, la chirurgie, la radiothérapie... En 1990, Kennedy *et coll.* ont rapporté le premier traitement efficace de l'ALA-PDT sur des BCC (Kennedy *et coll.*, 1990). L'ALA-PDT est maintenant bien étudiée et son utilisation montre de très bons résultats pour le traitement de nombreuses tumeurs cutanées bien que ces essais cliniques soient encore pour la plupart en phase I-II.

En ce qui concerne les **carcinomes baso-cellulaires**, des réponses complètes et durables ont été observées en employant une procédure simple utilisant une crème à 20 % d'ALA appliquée pendant 3 à 8 heures sur la peau et soumise à des sources de lumières variables (630 nm ; 40-200 J/cm²) (Wilson *et coll.*, 1992 ; Morton *et coll.*, 1998). D'autres traitements ont montré une diminution de l'efficacité ; ces traitements faisaient varier la concentration en ALA, la forme galénique ainsi que la longueur d'onde et la puissance de la lumière employée pour l'irradiation (Szeimies *et coll.*, 1994). Bien que la chirurgie reste le traitement de choix des larges BCC, un pré-traitement par la PDT pourrait augmenter le résultat cosmétique et fonctionnel des localisations difficiles.

Les succès du traitement de la **maladie de Bowen** par le porfimer sodique, un photosensibilisant de première génération, ont été décrits dans de nombreux articles (Büchanan *et coll.*, 1989 ; Jones *et coll.*, 1992). Le traitement de cette maladie montre également de bons résultats avec l'ALA-PDT, mais les résultats à long terme varient considérablement selon les patients (Jones *et coll.*, 1992 ; Svanberg *et coll.*, 1994). Cette réponse incomplète pourrait notamment être expliquée par la faible pénétration de l'ALA au travers de la peau.

Les **kératoses actiniques** représentent une des principales indications de l'ALA-PDT en dermatologie. Dans la plupart des études cliniques, un taux de réponse allant de 80 à 100% est obtenu en utilisant des concentrations de 10 à 20% d'ALA (Jeffes *et coll.*, 1997). La sensation de brûlure ressentie pendant l'irradiation par de nombreux patients a pu être significativement réduite en utilisant une formulation à 10% d'ALA (Fritsch *et coll.*, 1998) et en irradiant avec une source de lumière verte plutôt que rouge (Fritsch *et coll.*, 1997). Les kératoses actiniques sur les bras et les mains répondent moins bien au traitement que les lésions localisées sur le cuir chevelu (Szeimies *et coll.*, 1996).

En application topique, le taux de réponse obtenu par l'ALA-PDT sur les **épithéliomas malpighiens** superficiels est de 60 à 92%. Ce taux est de 0 à 67% pour les épithéliomas nodulaires (Lui *et coll.*, 1995). Mais des taux beaucoup plus importants sont obtenus pour les deux types d'épithéliomas après administration répétée de l'ALA-PDT sur les lésions (Fritsch *et coll.*, 1998).

L'ALA-PDT semble également avoir des effets bénéfiques prometteurs pour le traitement des lésions épithéliales précancéreuses et les épithéliomas malpighiens de la muqueuse buccale (Nauta *et coll.*, 1996).

Il y a actuellement peu d'information sur l'efficacité de l'ALA-PDT dans le traitement des **mélanomes** malins et les résultats sont souvent contradictoires (McCaughan *et coll.*, 1989 ; Wolf *et coll.*, 1993). La forte pigmentation, quoique aléatoire, des tissus du mélanome serait sûrement le facteur limitant inhibant la pénétration de la lumière au travers de la peau.

Certaines lésions du **sarcome de Kaposi**, et notamment celles induites par les anti-inflammatoires non stéroïdiens, ont été traitées avec succès après application topique de l'ALA-PDT dans de nombreuses études (Schweitzer *et coll.*, 1990).

Cette application topique de l'ALA montre des résultats comparables avec ceux du dithranol dans le traitement du **psoriasis**. De plus, contrairement à la thérapie du psoriasis par les UVA, le risque de développer un cancer par la suite est très nettement inférieur pour l'ALA-PDT. Par contre, la distribution de la PpIX dans les plaques du psoriasis n'est pas totalement homogène (Stringer *et coll.*, 1996), mais une administration systémique de l'ALA pourrait aboutir à une accumulation de la PpIX plus homogène et plus sélective dans ces plaques comme cela a déjà été démontré pour les lésions des carcinomes baso-cellulaires (Peng *et coll.*, 1995).

L'ALA-PDT a également montré de bons résultats après administration systémique et notamment pour les **cancers du tractus aéro-digestif**. Dans une étude sur 10 patients portant diverses tumeurs (3 adénocarcinomes de l'ampoule de vater, 2 adénomes du duodénum, 3 cancers de l'œsophage et 2 adénocarcinomes colorectaux), recevant 6 doses fractionnées d'ALA per os et irradiés 6 heures après la première dose (50 ou 100 J/cm²), il a été observé une nécrose de la tumeur dans 8 cas sur 10 (Regula *et coll.*, 1995).

L'application topique de l'ALA induit la formation de porphyrines dans la peau et préférentiellement dans les tissus tumoraux. L'irradiation de ces tissus tumoraux enrichis en PpIX conduit à l'émission d'une fluorescence rouge. Ce principe est à la base du diagnostic

photodynamique (PDD). Les lésions cancéreuses et précancéreuses de la peau montrent une fluorescence rouge intense et homogène lors de l'utilisation de l'ALA en PDD (ALA-PDD). Les lésions dues au psoriasis montrent également une forte mais inhomogène fluorescence rouge. Cette fluorescence peut également être utilisée avant une opération afin de délimiter les bords d'une tumeur donnée. Actuellement, les principales indications de l'ALA-PDD sont la délimitation des tumeurs de la peau et le contrôle de l'efficacité des autres thérapies employées sur les tumeurs plus profondes. L'ALA-PDD a également montré de bons résultats pour détecter et délimiter les **cancers du cou et de la tête** (Svanberg *et coll.*, 1995), les **glioblastomes** (Eléouet *et coll.*, 2000a), ainsi que les **cancers de la vessie** après administration intra-vésicale (Kriegmair *et coll.*, 1996).

L'utilisation de l'ALA en PDT et PDD semble donc être un outil prometteur de détection et de traitement des cancers et d'autres affections malignes. Le 6 décembre 1999, la société DUSA Pharmaceuticals a reçu une autorisation de la FDA (Food and Drug Administration) pour l'utilisation de l'acide delta aminolévulinique sous sa forme commerciale Levulan[®] (ALA 20%) pour le traitement des kératoses actiniques. Le Levulan[®] a ensuite reçu une A.M.M. aux USA pour le traitement des kératoses actiniques (février 2000, commercialisé par Schering-Plough). Cette molécule qui n'est pas brevetée en Europe va être développée par Schering AG par l'intermédiaire d'une société allemande Medac.

Plus récemment, des pro-drogues de l'ALA ont également montré des résultats cliniques très intéressants et l'ALA méthylester, commercialisé sous le nom de Metvix[®] par la société Photocure, a reçu en 2002 une A.M.M. pour le traitement des états précancéreux de la peau et des kératoses actiniques. Le Metvix[®] est distribué par les laboratoires Galderma-L'Oréal.

Concentration en ALA nécessaire pour induire une fluorescence de la PpIX détectable et une phototoxicité efficace

La concentration optimale d'ALA pour obtenir une fluorescence détectable de la PpIX et encore plus pour obtenir des effets après PDT chez l'homme est encore inconnue.

La concentration en PpIX dans les cellules varie en fonction du temps d'incubation avec l'ALA, de la concentration en ALA du milieu et de la lignée cellulaire. Il existe un seuil

en dessous duquel la concentration en ALA n'est pas suffisante pour induire une accumulation détectable de la PpIX. Dans les cellules d'adénocarcinomes humains WiDr, la PpIX produite est très faible en dessous d'une concentration en ALA de 35 µg/ml (Moan *et coll.*, 1997). Ce seuil a été confirmé par Berg et ses collaborateurs à une concentration de 50 µg/ml (Berg *et coll.*, 1996). Dans une autre étude, il a été montré qu'une variation de concentration de 10 à 700 µg/ml induisait une augmentation de la production de PpIX dans les cellules mais qu'une concentration supérieure entraînait le phénomène inverse (étude jusqu'à 10000 µg/ml), indiquant l'existence également d'une concentration optimale pour la production de PpIX (Krammer *et coll.*, 1996).

Les cellules C6 utilisées dans nos expériences ont été largement étudiées par de nombreux auteurs. Ces cellules sont une lignée facile à entretenir, proliférant rapidement. Stummer *et coll.*, dans une étude réalisée par fluorescence en cytométrie de flux, ont confirmé l'accumulation, spécifique et dépendante du temps d'incubation, de porphyrines fluorescentes dans les cellules C6. Ils ont obtenu, avec 167 µg/ml d'ALA, une augmentation linéaire de la PpIX jusqu'à 85 minutes puis un ralentissement de cette augmentation jusqu'à 2 heures d'incubation, temps maximal de l'étude (Stummer *et coll.*, 1998b). Le pourcentage de cellules présentant une fluorescence détectable était très bon, de l'ordre de 95% pendant toute la durée de l'étude.

Dans notre travail, nous avons utilisé des concentrations d'ALA de 100 et 200 µg/ml pour les études de fluorescence dans les cellules C6 incubées pendant 2 heures avec l'ALA. Comme Stummer *et coll.*, nous avons obtenu une très bonne fluorescence pour toutes les conditions testées. Par contre, contrairement aux études antérieures, nous n'avons pas observé d'augmentation significative de la fluorescence en fonction de la concentration d'ALA employée (intensités de fluorescence quasiment similaires pour les cellules incubées avec une concentration d'ALA de 100 µg/ml ou de 200 µg/ml).

Des expériences *in vivo* ont également été menées pour déterminer la concentration en ALA nécessaire pour générer une fluorescence de la PpIX détectable. Dans ces expériences, des concentrations d'ALA comprises entre 0,001 et 0,01% (soit 10 et 100 µg/ml) ont montré une bonne fluorescence de la PpIX (Iinuma *et coll.*, 1994 ; Bech *et coll.*, 1997a).

En ce qui concerne la concentration d'ALA nécessaire pour induire une PDT efficace en clinique, Fink-Puches et ses collaborateurs ont montré une formation de PpIX détectable et

une disparition de la tumeur après injection intra-lésionnelle de 10% d'ALA et irradiation par une lumière visible chez un patient porteur d'un large carcinome baso-cellulaire (Fink-Puches *et coll.*, 1997). Chez les cochons, la fluorescence de la PpIX et les lésions post-PDT ont été démontrées après une injection intracutanée de solutions d'ALA à 0,5-2% (soit 5000-20000 µg/ml) (de Blois *et coll.*, 2001).

En accord avec ces différentes études, nous avons choisi de travailler avec des solutions d'ALA de concentrations initiales allant de 0 à 8000 µg/ml (concentrations finales *in vitro* de 0 à 200 µg/ml).

Corrélation entre l'intensité de fluorescence de la PpIX et la phototoxicité induite par l'ALA

Leunig et ses collaborateurs ont montré une corrélation sigmoïde entre l'intensité de fluorescence cellulaire et la phototoxicité induite par la PDT (Leunig *et coll.*, 1993). Contrairement à ces résultats, Iinuma *et coll.* n'ont pas obtenu de corrélation stricte entre le contenu en PpIX intracellulaire et la phototoxicité induite par l'ALA dans différentes lignées cellulaires (Iinuma *et coll.*, 1994).

Pour Fuchs et ses collègues, l'intensité de fluorescence maximale ainsi que la destruction des cellules par la PDT ont été observées pour une incubation des cellules avec un milieu de pH 7,4. Par contre, l'intensité de fluorescence des cellules incubées avec l'ALA à pH 8,5 est faible comparée à celle obtenue pour les cellules incubées à pH 7,4, mais les dommages observés après irradiation sont comparables. Ces résultats indiquent l'existence d'un seuil pour que la PDT induise la mort cellulaire (Fuchs *et coll.*, 1997).

Dans notre travail, nous avons obtenu une parfaite corrélation entre les résultats obtenus pour l'intensité de fluorescence et ceux de phototoxicité de l'ALA. En effet, l'intensité maximale de fluorescence de la PpIX et la DL50 la plus faible dans les études de phototoxicité ont été observées pour l'ALA dissous dans l'eau à 4°C et incubé immédiatement après sa préparation avec les cellules C6.

Sensibilité de la biosynthèse de PpIX induite par l'ALA à différents facteurs

➤ Lignée cellulaire

En plus des conditions d'utilisation et de conservation, l'ALA semble avoir une efficacité variable d'une cellule à l'autre.

Les cellules plus fortement impliquées dans la biosynthèse de l'hème, comme les cellules de la moelle osseuse hématopoïétique ou les cellules hépatiques, ont plus de capacité à accumuler des porphyrines. Des cellules d'un même cancer mais dérivant d'une tumeur avec un degré de différenciation différent n'accumulent pas la PpIX en même quantité. Steinbach *et coll.* ont en effet montré un rapport double de fluorescence entre deux lignées cellulaires de carcinomes avec une différenciation urothéliale différente, la lignée pauvrement différenciée accumulant le moins (Steinbach *et coll.*, 1995).

Dans une même lignée cellulaire, des fibroblastes, Bech *et coll.* ont également noté, *in vitro*, une variation de la fluorescence d'une cellule à l'autre, mais aussi au sein d'une même cellule (Bech *et coll.*, 1997b).

Dans notre étude, cette hétérogénéité de la synthèse a également été relevée et est caractérisée par de grandes barres d'erreur dans les études de fluorescence et de phototoxicité. Cette hétérogénéité avait déjà été observée dans le laboratoire par Eléouet *et coll.*, 2000b.

➤ Cycle cellulaire

Il a aussi été démontré une dépendance de la synthèse des porphyrines à partir de l'ALA suivant l'avancement des cellules dans le cycle cellulaire. Fukuda a remarqué une différence positive dans le contenu en porphyrine intra-cellulaire dans les cellules en phase G2/M comparées aux cellules en phase G1 ou S (Fukuda *et coll.*, 1993).

Moan *et coll.* ont confirmé l'influence de la phase du cycle cellulaire dans des cellules d'adénocarcinome, la fluorescence de la PpIX étant plus forte dans les cellules en phase G2/M qu'en phase G1 (Moan *et coll.*, 1997). Cependant ils ont également noté une dépendance à la densité cellulaire, les cellules dans une zone à forte densité émettant plus de fluorescence que celles dans une zone à faible densité.

➤ pH du milieu de culture

La dépendance au pH extracellulaire de l'ALA a été démontré par Fuchs et ses collaborateurs en utilisant des cellules de fibrosarcome de souris (SSK II) incubées avec des milieux de culture de pH différents et en mesurant ensuite la fluorescence de la PpIX induite et la phototoxicité de l'ALA. Un maximum d'intensité de fluorescence a été obtenu lorsque les cellules étaient incubées avec l'ALA dans un pH physiologique. Quand les valeurs de pH augmentaient ou diminuaient par rapport au pH physiologique, l'intensité de fluorescence intracellulaire diminuait dans les deux cas. A pH 6,8, l'intensité de fluorescence a montré une diminution de 30%. Finalement, quand les cellules étaient incubées à des valeurs de pH inférieures ou égales à 6, l'intensité de fluorescence était équivalente à l'autofluorescence des cellules. Il est important de noter qu'une alcalinisation du milieu de culture par rapport au pH physiologique affecte moins la fluorescence de la PpIX qu'une acidification du milieu (Fuchs *et coll.*, 1997).

L'étude de Bech montre également clairement que le pH extracellulaire est important à contrôler afin d'obtenir une bonne capacité de l'ALA à induire la PpIX aussi bien dans les cellules V79 (fibroblastes de poumons de hamster chinois) que dans les cellules WiDr (cellules issues d'un adénocarcinome humain). Ce pH est de 7,5 pour les deux lignées cellulaires testées et le taux de synthèse décroît avec des valeurs de pH inférieures à 7,5. De plus, celui-ci propose une hypothèse afin d'expliquer cette dépendance de synthèse de la PpIX au pH extracellulaire. L'ALA est un zwitterion avec des valeurs de pKa de 4 (groupe carboxylique) et 8,9 (groupe amine). Ainsi, il n'est pas probable que sa lipophilicité et son taux de pénétration dans les cellules change significativement dans l'intervalle de pH 6-7,9. Dans les enzymes de la synthèse de PpIX à partir de l'ALA, la porphobilinogène déaminase (PBGD) semble avoir le moins d'activité et c'est pourquoi, probablement, elle constitue l'étape limitante de la biosynthèse. L'activité de cette enzyme en fonction du pH montre une courbe avec un maximum entre pH 7,8 et 8,2 dans de nombreux organismes incluant les humains (Anderson *et coll.*, 1980). L'activité de la PBGD des érythrocytes humains augmente quand le pH augmente dans un intervalle de 6-7,5 allant en parallèle avec une augmentation de la production de la PpIX dans les cellules WiDr. C'est pourquoi la dépendance du pH de la production de PpIX dans les cellules *in vitro* pourrait être expliquée par la dépendance de l'activité de la PBGD au pH (Bech *et coll.*, 1997b).

➤ Présence de substances exogènes

Les conditions environnementales comme la pression en oxygène ou la présence de certaines substances (sérum, chélateurs de fer...) ont plus ou moins grande influence sur la synthèse de la PpIX par la cellule cancéreuse à partir d'ALA.

La présence de **sérum** a montré une influence sur la synthèse de porphyrines stimulée par l'ALA. Fukuda a noté une amélioration de la synthèse avec un milieu enrichi à 10% en sérum par rapport à un milieu en contenant 1%. Il a également noté un plus grand relargage des porphyrines générées par les cellules dans le milieu (demi-vie calculée de 24 minutes avec 10% de sérum par rapport à 62 minutes avec 1%) (Fukuda *et coll.*, 1993).

Il a également été rapporté que l'addition de **glucose** pouvait augmenter la captation sélective du composé actif de l'hématoporphyrine dérivée et la destruction induite des cellules tumorales (Thomas *et coll.*, 1989). Ces effets ont été expliqués par la diminution du pH des cellules cancéreuses due au glucose. Cependant, dans une étude sur l'accumulation de PpIX dans les cellules EAC (carcinomes), Dietel émet l'hypothèse que l'importante augmentation de la production de PpIX et son occurrence plus tardive sont simplement liées à l'accroissement de la viabilité des cellules et à l'accroissement du métabolisme glycolytique affectant la configuration des enzymes (Dietel *et coll.*, 1996).

In vivo, Nelson *et coll.*, ont montré que l'administration de glucose combinée à celle du photosensibilisant augmentait l'efficacité thérapeutique (Nelson *et coll.*, 1992).

Hétérogénéité des résultats de phototoxicité induite par l'ALA obtenus dans différentes études

Le tableau 4 page 92 rapporte les différents résultats obtenus après administration de l'ALA dans différentes lignées cellulaires et irradiation par différentes intensités de lumière.

Il apparaît clairement que les conditions de culture, d'irradiation, et de dissolution de l'ALA sont très différentes d'une étude à l'autre, donnant des résultats souvent impossibles à comparer. En effet, certains auteurs étudient la phototoxicité de l'ALA en faisant varier le temps d'incubation des cellules avec l'ALA et l'intensité d'irradiation (Spörri *et coll.*, 2001 ; Ren *et coll.*, 2002), d'autres font varier l'intensité de l'irradiation et le milieu de culture (Fuchs *et coll.*, 1997), etc... D'après les différentes études du tableau, nous pouvons comparer nos résultats de phototoxicité de l'ALA sur les cellules C6 avec seulement ceux de Eléouet *et*

coll., et de Carré *et coll.* En effet, seules ces deux études sont réalisées sur des cellules C6 et avec des conditions d'incubation et d'irradiation comparables à celles que nous avons utilisées. Eléouet *et coll.* ont obtenu une DL50 de 45 µg/ml pour une solution d'ALA dissous dans de l'eau isotonique conservée à 4°C. Ce résultat est tout à fait comparable et du même ordre de grandeur que celui que nous avons observé pour une solution d'ALA diluée dans de l'eau à 4°C (DL50 variant de 43 à 54 µg/ml selon le temps entre la préparation des solutions et leur incubation avec les cellules).

De plus, si nous voulons comparer la phototoxicité de l'ALA en fonction des lignées cellulaires, nous pouvons comparer nos résultats seulement aux études de Bourré *et coll.*, et de Schick *et coll.* car seulement dans ces deux études ont été employées des doses d'irradiations voisines des nôtres (25 et 30 J/cm²). Nous observons alors que l'ALA semble moins cytotoxique sur les cellules ProB (cellules d'un adénocarcinome de rat) que sur les cellules C6. En effet, la DL50 obtenue sur les cellules ProB par Bourré *et coll.* pour une solution d'ALA préparée dans de l'eau à température ambiante est de 150 µg/ml ; la DL50 obtenue dans notre étude pour la même solution d'ALA varie de 45,8 à 67,5 µg/ml sur les cellules C6 (variations en fonction du temps entre la préparation des solutions et leur incubation avec les cellules).

La DL50 obtenue par Schick *et coll.* pour une solution d'ALA préparée dans du RPMI est de 300 µg/ml sur les cellules ScL1 et ScL2 (cellules d'épithéliomas malpighiens). Lors de nos expériences, nous avons obtenu pour une solution d'ALA dissous dans du RPMI des DL50 sur les cellules C6 allant de 97 µg/ml (21°C, incubation immédiate après préparation), à plus de 200 µg/ml (21°C et incubation après 1 heure ou 37°C et incubation après 20 et 60 minutes). Ainsi, l'ALA pourrait soit être moins cytotoxique sur les cellules ScL1 et ScL2 que sur les cellules C6, ou soit avoir une cytotoxicité de même intensité sur les deux lignées cellulaires. D'après ces résultats, il semble évident que des facteurs modifiant considérablement la toxicité de l'ALA, comme par exemple le temps et la température de conservation des solutions, doivent être standardisés afin de pouvoir comparer des études entre-elles.

Il nous a donc semblé nécessaire d'effectuer une standardisation de l'utilisation de l'ALA aussi bien en vue d'expérimentation sur des cultures cellulaires que pour une bonne utilisation de l'ALA-PDT en clinique. Nous avons donc dans un premier temps de cet objectif fait varier les conditions d'utilisation de l'ALA mais pas les conditions d'incubation avec les cellules. En effet, ni le milieu de culture (RPMI), ni le temps d'incubation (2 h), ni l'intensité d'irradiation (630 nm, 25 J/cm²) ne varient dans nos expériences. Ces facteurs devront être analysés par la suite lors d'une autre étude.

Lignées cellulaires	Concentrations d'ALA et temps d'incubation	Conditions d'irradiation	Solvant de dissolution	DL50	Références
ProB	0-200 µg/ml 2 h	25 J/cm ² 514 nm	Eau	150 µg/ml	Bourré et coll., 2002
C6	25-150 µg/ml 2 h	25 J/cm ² 514 nm	Eau 4°C	75 µg/ml	Carré et coll., 1999
C6	25-200 µg/ml 6 h	25 J/cm ² 514 nm	NaCl 0,9% 4°C	45 µg/ml	Eléouet et coll., 2000b
PAM ET NBT-II	167 µg/ml 4 h	0,7, 1,8, 2,5 J/cm ² 514 nm	NaCl 0,9% pH 7,4	167 µg/ml	Iinuma et coll., 1994
QGY	5 h	14,7 J/cm ² 500 nm	PBS	330 µg/ml	Ren et coll., 2002
SKK II	100 µg/ml 4 h	3 J/cm ² 635 nm	RPMI pH 7,4	100 µg/ml	Fuchs et coll., 1997
DAUDI HEL HL60	167 µg/ml 4 h	4 - 13 J/cm ² 400-550 nm	RPMI	167 µg/ml	Grebenova et coll., 1998
ScL1 ScL2	30-300 µg/ml 4 h	30 J/cm ² 600-700 nm	RPMI	300 µg/ml	Schick et coll., 1995
WiDr	2 h	75 J/cm ² 630 nm	RPMI	120 µg/ml	Moan et coll., 1997
MGH-U1	260 µg/ml 2 h	6 J/cm ² >450 nm	RPMI	84 µg/ml	Bech et coll., 1997a
NCTC 2544	167 µg/ml	5 J/cm ² 436 nm	EMEM + PBS	167 µg/ml	Gaullier et coll., 1995
TEC	10-100 µg/ml 48 h	1,6, 4, 8 J/cm ² 631 ± 2 nm	EMEM	100 µg/ml	Spörri et coll., 2001
R3230AC	17, 42, 84 µg/ml 2 h	30 mJ/cm ²	EMEM	84 µg/ml	Gibson et coll., 1997

Tableau 4 : Phototoxicité induite par l'ALA sur différentes lignées de cellules cancéreuses

La réaction de dégradation de l'ALA en solution

De nombreux auteurs ont noté l'instabilité de l'ALA qui subit en solution une réaction de dégradation. Il a alors été supposé que l'ALA en se dégradant perdait de son efficacité. Nous avons donc étudié différents facteurs pouvant influencer la stabilité de l'ALA afin de limiter cette réaction de dégradation et de conserver une efficacité maximale de l'ALA.

Le développement d'une forme stable de l'ALA en vue d'une utilisation clinique requiert des connaissances de la cinétique et des mécanismes de dégradation du composé. L'ALA appartient à la classe des α -amino-cétones qui se dimérisent facilement dans des conditions alcalines. Il est connu depuis longtemps que l'ALA, *in vivo*, subit une réaction enzymatique pour donner le porphobilinogène dans le cycle de la biosynthèse de l'hème (del C. Battle, 1993). Cependant, en l'absence des enzymes correspondantes, la dimérisation spontanée de l'ALA aboutit à différents composés cycliques de dégradation. Des études antérieures ont montré que l'ALA réagissait selon un mécanisme non-enzymatique en solution aqueuse pour donner plusieurs produits de dégradation possibles (figure 53).

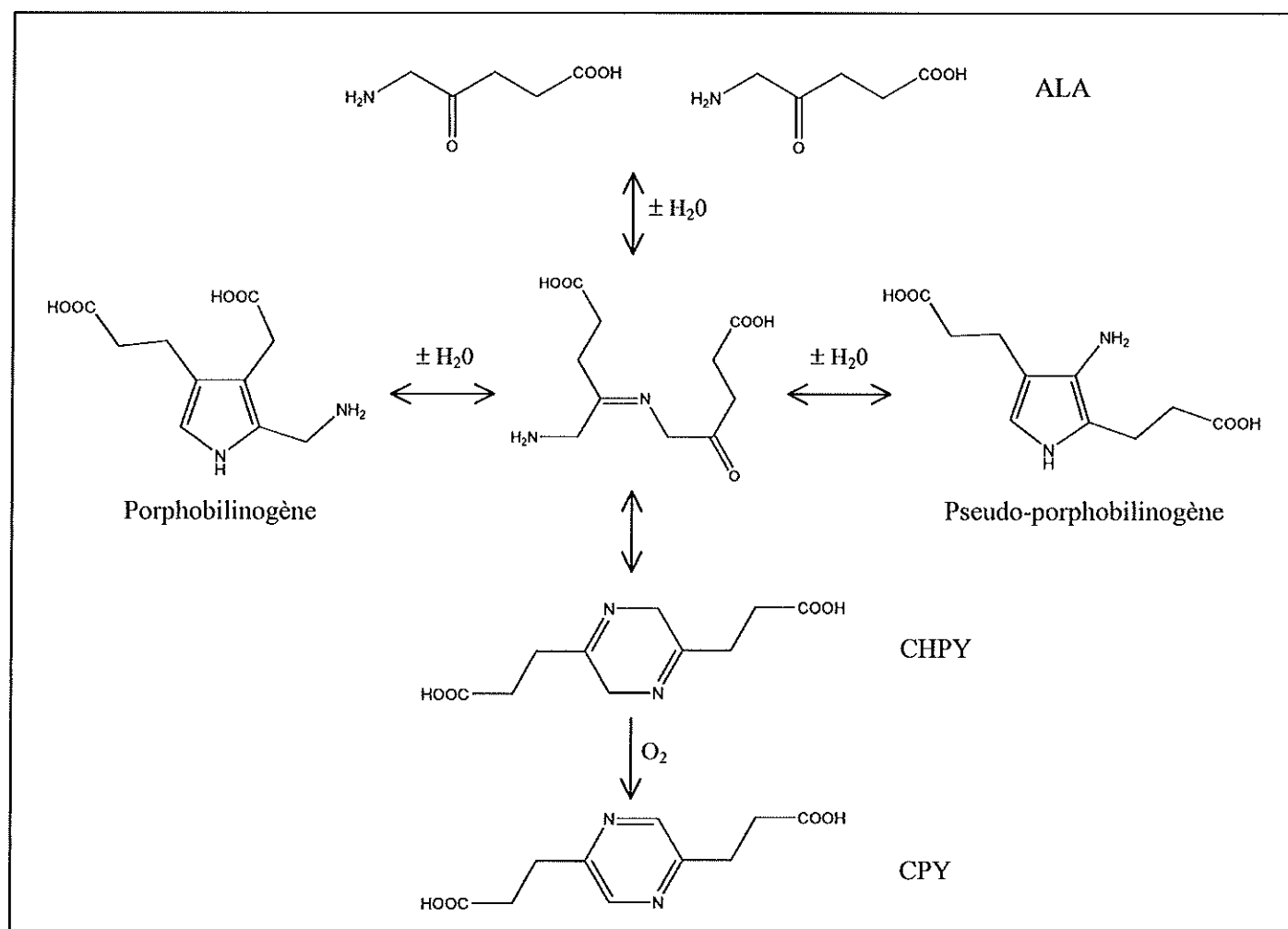


Figure 53 : Produits de dégradation de l'ALA

Frank et Stratmann en 1981 ont montré qu'en solution alcaline, deux produits étaient formés. Le composé minoritaire ayant été identifié comme le porphobilinogène et le composé majoritaire, le 2,5-(β -carboxyéthyl)dihydropyrazine (CHPY) instable et difficile à isoler ; le rapport de 1 / 10 étant largement indépendant des conditions de la réaction.

Butler et George en 1992 ont identifié trois produits de dégradation de l'ALA dont la formation était dépendante des conditions de la réaction. A pH modéré et sous conditions anaérobiques, le produit de dégradation CHPY est formé. Celui-ci se transforme en 2,5-(β -carboxyéthyl)pyrazine (CPY) après oxydation. En solutions fortement alcalines, l'ALA se décompose en CHPY accompagné de pseudoporphobilinogène.

Sous des conditions physiologiques, 4 à 7 % de l'ALA semble exister sous forme de dihydropyrazine, et le taux de présence de ce composé dépend de la concentration en ALA utilisée (Jaffe *et coll.*, 1990).

Ces différentes études ont ainsi montré que l'ALA réagissait en solution pour donner différents produits de dégradation. Cependant, les résultats controversés des différents auteurs montrent la complexité de la réaction de l'ALA. Les conditions (concentration, température, etc...) nécessaires pour que cette réaction ait lieu sont très peu investiguées, si bien que la stabilité de l'ALA n'est pas complètement définie.

De nombreuses études actuelles s'appuient sur ces différents produits de dégradation pour étudier l'instabilité de l'ALA en solution.

Influence du solvant de dilution et du pH de la solution sur la stabilité de l'ALA

Selon de nombreuses études, la dégradation de l'ALA en solution est fortement dépendante du pH et ainsi du solvant utilisé pour la dissolution.

Ce phénomène peut être expliqué par le mécanisme réactionnel proposé en 1996 par Novo *et coll.* En effet, ceux-ci ont étudié la stabilité de l'ALA en utilisant des solutions d'ALA de pH différents et en suivant par spectrométrie d'absorption l'absorbance des différents produits de dégradation. Lorsque l'ALA a été dissous dans l'eau sans addition de soude, la solution acide obtenue (pH 2 ; 0.3 M) s'est révélée stable montrant un spectre d'absorption ne variant pas en fonction du temps.

La réaction de l'ALA dans l'intervalle de pH envisageable pour une application clinique fut également étudiée dans cette même étude en 1998 par Novo *et coll.* en préparant cinq solutions d'ALA diluées dans le PBS de même concentration (0,18 M) et à différentes valeurs de pH (5,2 ; 6,3 et 7,4). Ces solutions ont été conservées à 37°C pendant plusieurs heures. Il a été observé que, bien que la même quantité de tampon phosphate soit présente dans toutes les solutions, l'acidité de la solution à pH 5,2 ne variait pas avec le temps de la réaction. Par contre, les valeurs de pH des deux autres solutions diminuaient significativement. Quand les absorbances des solutions étaient trop élevées pour être lues à 350 et à 275 nm, l'absorbance du CHPY était détectée à 400 nm ou à 350 nm selon le temps de réaction. Des solutions diluées (5 mM, pH 7,3) ont alors été préparées pour chaque solution de départ afin de pouvoir mesurer l'absorbance à 275 nm. Puisque ni l'ALA, ni le CPY n'absorbent à 400 nm, l'absorption mesurée à cette longueur d'onde est proportionnelle à la concentration en CHPY formé. Les résultats ont montré que la concentration en CHPY augmentait très rapidement dans les 10-15 premières minutes de la réaction pour n'importe quel pH, indiquant que le taux de formation de ce produit est important. Cependant, après 10 minutes supplémentaires plus de CHPY était présent dans la solution de pH 7,4 que dans celle à 6,3 et deux fois plus que dans celle à pH 5,2. Cela suggère que le taux de formation du CHPY est fortement dépendant du pH et que ceci peut être dû aux différentes réactivités des formes protonnées et déprotonnées de l'ALA et/ou en fonction de la catalyse acide/base de la réaction (Novo *et coll.*, 1998).

Pour des temps plus longs, le comportement de l'absorbance à 400 nm était différent dans les trois solutions (pH 5,2, 6,3 et 7,4). Il augmentait légèrement dans la solution à pH 5,2 avec le temps. Par contre, celui-ci diminuait légèrement dans celle à pH 6,3 et significativement dans celle à pH 7,4. Ces différentes variations dans la concentration en CHPY en fonction du temps peuvent être expliquées par plus de réaction du CHPY pour donner du CPY, dont le taux doit dépendre de la concentration en CPHY et donc doit être supérieur quand le pH des solutions augmente. Les données de l'absorbance à 275 nm sont en accord avec cette interprétation. Le taux d'augmentation dans la mesure des absorbances était 10 et 20 fois supérieur dans les solutions à pH 6,3 et 7,4 respectivement, que dans celle à pH 5,2. Ceci indique que le taux de formation du CPY augmente fortement quand le pH augmente (Novo *et coll.*, 1998)

Cette dépendance au pH peut être expliquée sur la base de l'équilibre acide/base de l'ALA. Les valeurs de cet acide aminé sont $pK_1 = 4,05 \pm 0,05$ et $pK_2 = 8,3 \pm 0,1$. Ces valeurs indiquent que la forme zwitterion est la forme majoritairement présente dans un intervalle de pH de 5 à 7,5, bien que des taux significatifs des deux autres formes existent, et ce en fonction de l'acidité. Donc, à pH 5, environ 10% des molécules d'ALA sont des cations alors qu'à pH 7,3, environ 10% des molécules d'ALA sont des anions (Novo *et coll.*, 1998). En accord avec ces résultats, un schéma similaire a été proposé par Butler et George pour expliquer la réaction de l'ALA quand l'anion, une espèce avec un groupe aminé non-protonné, est le seul qui est capable de réagir avec un groupe cétone d'une molécule voisine pour donner la dihydropyrazine cyclique (figure 54) (Butler et George, 1992).

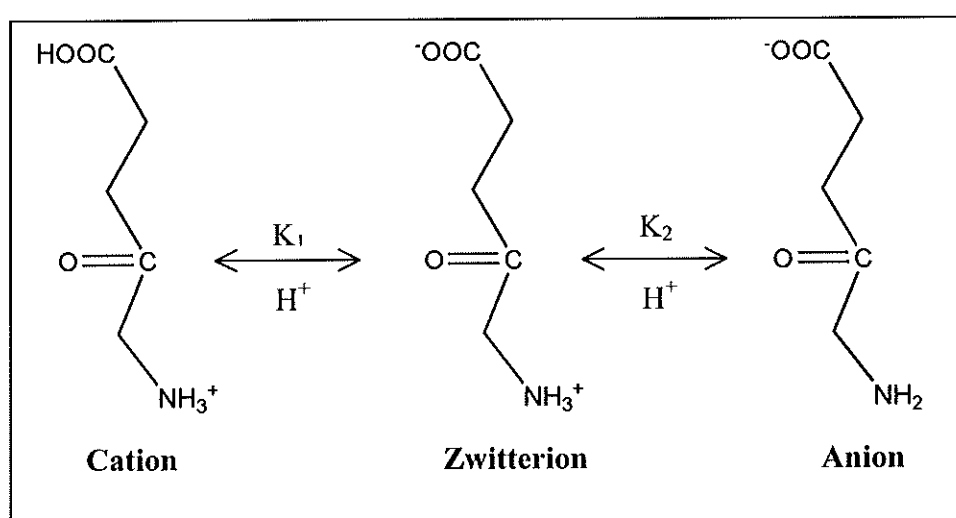


Figure 54 : Equilibre acide/base de l'ALA

Pour que la condensation ait lieu, le groupe aminé de l'ALA doit être déprotonné. Ceci explique la dépendance forte du pH de la réaction. C'est pourquoi les solutions d'ALA ne sont stables qu'en grande acidité quand la forme anion n'existe pas. De plus, comme l'anion réagit, la concentration en protons augmente dans les solutions d'ALA afin de conserver l'équilibre zwitterion-anion, expliquant la diminution du pH observé pendant la réaction de l'ALA.

Afin de remédier à cette dépendance du pH, nous avons dans un premier temps dilué l'ALA dans trois systèmes tampons différents (pH 7,4) : l'imidazole, le tris-maléate et le diméthylaminoéthylamine. Malheureusement ces trois solvants ont entraîné une capacité de l'ALA à induire la PpIX dans les cellules C6 inférieure à l'eau, au PBS et du même ordre que le RPMI. L'innocuité de ces trois systèmes de tampons n'ayant pas été parfaitement établie

pour une utilisation *in vivo*, ils n'ont donc pas été sélectionnés pour les expériences suivantes de phototoxicité effectuées.

Elfsson *et coll.* ont décidé en 1998 d'utiliser des solutions tamponnées d'ALA pour éviter cet effet du pH. Les solutions d'ALA (1%) ont été dissoutes dans du NaCl 0,1M, ajustées au pH désiré, puis analysées par CLHP à 50°C. Aucune dégradation de l'ALA n'a été observée pendant la période d'incubation (37 jours) à pH 2,35. La demi-vie de décomposition de l'ALA à pH 4,81 est de 257 heures et de 3 heures pour la solution à pH 7,42 (Elfsson *et coll.*, 1998). Il semblerait ainsi que l'ALA se dégraderait beaucoup plus lentement à pH acide.

Plus récemment, Gadmar *et coll.* ont également étudié l'influence du pH sur la stabilité de l'ALA. Ils ont dissous l'ALA (0-50 mM) dans le PBS, puis ajusté au pH 7,2 par addition de soude. Les solutions ont ensuite été analysées par spectrométrie d'absorption avant leur incubation avec les cellules. Ils ont observé une variation de coloration des solutions qui passaient de l'incolore au jaune. Si le pH n'était pas ajusté, cette coloration n'apparaissait pas (Gadmar *et coll.*, 2002).

N'ayant pas ajusté le pH des différentes solutions d'ALA après dissolution, nous n'avons pas non plus observé cette coloration jaune. De même, tout comme Gadmar *et coll.*, nous n'avons pas observé de variations du pH des solutions dans le temps (60 et 120 minutes), contrairement aux observations de Novo *et coll.* En effet, seulement une très légère diminution dans le pH est observée pour quelques échantillons. La différence est probablement liée au fait que les concentrations d'ALA utilisées par Novo *et coll.* étaient supérieures à celles utilisées par Gadmar *et coll.*, et dans ce travail, excédant ainsi les capacités du tampon à exercer son effet.

Dans une autre étude, l'influence du pH a été analysée en vue de constituer une forme injectable intracutanée d'ALA afin de remédier à la faible pénétration de l'ALA au travers de la peau (de Blois *et coll.*, 2002). Les différentes solutions d'ALA ont été préparées en utilisant de l'eau distillée et en ajustant le pH avec de la soude à 0,1M pour obtenir les pH désirés. Dans les solutions à 0,1 % d'ALA avec des valeurs de pH comprises entre 4 et 8, une forte dépendance de la dégradation de l'ALA en fonction du pH a été observée, montrant une décomposition rapide pour les pH supérieurs à 7, alors que les solutions de pH inférieurs ou égaux à 6 montrent une concentration en ALA de 90 à 100 % par rapport à la concentration initiale pendant 128 jours.

Toutes ces études s'accordent pour dire que le pH a une influence sur la stabilité de l'ALA en solution, mais les solvants utilisés sont variables d'un auteur à l'autre. Nous avons donc voulu savoir si en plus du pH, la nature du solvant utilisé pour dissoudre l'ALA avait une influence sur d'une part la capacité de celui-ci à induire la PpIX, puis d'autre part sa phototoxicité. Nous avons pour cela utilisé trois solvants couramment utilisés en culture cellulaire et pouvant être employés sans effet toxique chez l'homme en vue d'une application clinique éventuelle.

Nous avons étudié l'eau, le PBS et le RPMI. Il semblerait selon nos résultats que l'efficacité de l'ALA soit supérieure lorsque celui-ci est dissous dans l'eau comparée à celle quand l'ALA est dissous dans le PBS et le RPMI (eau>PBS>RPMI). La solution aqueuse d'ALA a un pH inférieur aux solutions de PBS et de RPMI, nous obtenons ainsi les mêmes résultats que les études précédentes ; plus le pH est faible, plus l'ALA est stable en solution et donc plus il induit une phototoxicité efficace. Par contre, le pH de la solution d'ALA diluée dans le PBS est du même ordre de grandeur que celle du RPMI. Pourtant, nous observons une différence significative dans l'efficacité et donc dans la stabilité de l'ALA dans ces deux solvants. Ceci montre ainsi que non seulement le pH a une influence sur la stabilité de l'ALA, mais également le solvant utilisé pour sa dissolution.

Contrairement aux propositions de Diddens *et coll.* en 1994 qui jugeaient le PBS comme étant le meilleur solvant pour limiter la dégradation de l'ALA, nos résultats sont plus en accord avec ceux de Bunke *et coll.* qui ont démontré qu'une solution aqueuse d'ALA de pH faible était le meilleur dosage (Diddens *et coll.*, 1994 ; Bunke *et coll.*, 2000).

Trouvant une balance entre la stabilité de l'ALA qui demande un pH le plus faible possible et le souhait d'injecter cette solution non-irritative chez l'homme qui requiert un pH compris entre 4 et 9, un pH de 5 semble être le bon compromis. Pour cela, il suffirait d'utiliser la concentration d'ALA la plus faible possible.

Influence de la concentration en ALA sur sa stabilité et son efficacité

Un mécanisme de dégradation dépendant de la concentration en ALA a été montré dans plusieurs études antérieures.

En effet, de Blois *et coll.*, en 2002 ont observé que plus les solutions d'ALA étaient concentrées, plus elles se dégradaient rapidement. Le contenu d'une solution d'ALA de concentration initiale de 0,5% (soit 5000 µg/ml) à un pH de 5 est toujours supérieur à 90% après 178 jours. Par contre, les solutions de concentrations initiales de 2, 5 et 10 % ont un contenu qui passe en dessous des 90% après 150, 94 et 29 jours respectivement. Après 122 jours, la solution à 0,5 % est toujours incolore alors que les solutions à 2, 5 et 10% sont respectivement jaune, orange et rouge. Un an après l'expérience, toutes les solutions sont devenues rouges sauf celle à 0,1 % qui est toujours incolore (de Blois *et coll.*, 2002).

De même, dans une autre étude étudiant l'effet de la concentration en ALA sur trois solutions à 0,005 M, 0,18 M et 0,30 M, il a été observé une bande supplémentaire sur le spectre d'absorption à 350 nm correspondant à un produit de dégradation pour les deux solutions les plus concentrées seulement (Novo *et coll.*, 1998).

Nous n'avons pas observé dans notre travail d'influence de la concentration en ALA sur la stabilité de celui-ci contrairement à ces deux études, mais ceci s'explique sûrement par le fait que nous avons employé des concentrations initiales beaucoup faibles (concentrations initiales allant de 0 à 2000 µg/ml).

Nous avons obtenu une phototoxicité de l'ALA inférieure dans l'expérience utilisant le rapport ALA/milieu de 1/40 comparée à la phototoxicité obtenue dans l'expérience avec le rapport ALA/milieu de 1/10. Cela pourrait s'expliquer par le fait que la solution mère d'ALA utilisée dans l'expérience 1/40 avait une concentration beaucoup plus élevée (8000 µg/ml contre 2000 µg/ml pour obtenir la même concentration finale avec les cellules de 200 µg/ml). Ainsi, dans l'expérience 1/40, la concentration de la solution mère étant plus élevée, l'ALA se serait plus dégradé et aurait donc perdu davantage de son efficacité.

De plus, nous observons un effet plateau qui apparaît entre 100 et 200 µg/ml d'ALA (concentrations finales) dans les cellules C6. Ce plateau a également été rencontré dans les études effectuées par Gadmar *et coll.* utilisant des cellules WiDr (adénocarcinome humain) incubées avec l'ALA pendant 4 heures dans du RPMI comme milieu de culture sans sérum. Le taux de PpIX produit dans les cellules était fonction de la concentration en ALA utilisée et un plateau est apparu pour les concentrations d'ALA de 1 à 1,5 mM (soit de 167,6 à 251,4 µg/ml) (Gadmar *et coll.*, 2002).

Autres recherches effectuées pour augmenter la stabilité de l'ALA en solution

Certains auteurs ont supplémenté les solutions d'ALA en EDTA, mais celui-ci n'a montré pratiquement aucun effet sur la stabilité de l'ALA en solution (Elfsson *et coll.*, 1998). Ceci est surprenant car l'ajout d'EDTA avait pour but de stabiliser les préparations d'ALA à cause de ces propriétés de chélation des métaux. Ceci suggère que les ions métalliques ne sont pas importants dans le processus de dégradation de l'ALA.

L'optimisation du pH des solutions semble contrôler l'instabilité de l'ALA comme nous en avons discuté dans le paragraphe sur l'influence du pH. Le produit intermédiaire de dégradation, le CHPY, existe de façon dépendante du pH en équilibre avec l'ALA. Pour illustrer ceci, quand l'ALA est complètement converti en CPHY par addition de soude, il peut être totalement retransformé après re-acidification de la solution. Des pH élevés favorisant la formation de CHPY, des solutions d'ALA de pH faibles ont été étudiées pour augmenter la stabilité de l'ALA en solution.

Quand l'ALA (0,3 g/ml) est dissous dans des acides forts (HCl, H₂SO₄, H₃PO₄, HClO₄, tous 1N), aucune dégradation significative n'apparaît à 40°C pendant 6 semaines alors que 5% de dégradation de l'ALA est observé dans l'eau pure dans les mêmes conditions de stockage. Malheureusement, de telles solutions d'ALA diluées dans ces acides forts ne sont pas envisageables pour une application clinique, et d'autres stratégies ont été envisagées (Bunke *et coll.*, 2000).

Une autre approche possible pour préparer une solution stable et cliniquement utilisable d'ALA a été d'utiliser des solutions non-aqueuses et des solvants miscibles à l'eau. L'ALA est soluble dans le glycérol (10%) et le propylène glycol (5%). Cependant, l'apparence jaune immédiate de telles solutions quand l'ALA y est dissous a laissé penser que ces solvants n'étaient pas indiqués pour résoudre l'instabilité de l'ALA.

L'addition d'anti-oxydants tels que Na₂SO₃ ou l'acide ascorbique a également été étudiée. Malheureusement, aucun de ces agents n'a exercé un effet stabilisateur. De plus, l'acide ascorbique a même accéléré la dégradation de l'ALA à cause de son potentiel redox élevé.

Finalement, une grande variété de formes galéniques comme des émulsions huile dans eau et eau dans huile, des microémulsions et des hydrogels ont été analysées pour leur capacité à stabiliser l'ALA en solution, mais aucun de ces dosages n'a montré un effet bénéfique (Bunke *et coll.*, 2000).

Contrôle de la température, de la concentration, du solvant de dilution et du temps sur l'efficacité de l'ALA lors d'essais *in vivo*

Le développement d'une thérapie efficace pour les maladies cancéreuses dépend de la nette distinction entre les tissus sains et les tissus malins. Une différence majeure entre les tumeurs et les tissus sains périphériques est l'environnement métabolique et nutritionnel. Les facteurs environnants peuvent avoir un rôle crucial sur l'entrée et la libération d'un médicament.

Une étude a montré l'influence de la température de la peau sur la capacité de l'ALA à synthétiser la PpIX. Un taux significatif de PpIX a été formé après 6 minutes d'une application locale d'ALA chez des souris avec une température de la peau à 37°C. En baissant la température de la peau par un anesthésique, la fluorescence de la PpIX a été réduite par un facteur de 2-3. Pratiquement pas de PpIX n'est formée aussi longtemps que la peau est maintenue entre 12 et 18°C. L'accumulation de PpIX pourrait donc être intensifiée en augmentant la température des tissus cibles (Juzeviciene *et coll.*, 2002).

Des solutions aqueuses d'ALA ont été préparées pour une instillation intra-vésicale lors d'une étude clinique chez l'homme pour le diagnostic du cancer de la vessie (Novo *et coll.*, 1996). Les conditions de préparation des solutions d'ALA à utiliser en vue d'une instillation intra-vésicale ont été optimisées. Comme les concentrations d'ALA pour une utilisation clinique doivent être suffisamment élevées pour induire une détection minimale de la PpIX, une concentration minimale de 0,18 M fut utilisée. Le pH des solutions fut réduit à pH 5, qui est près de la limite de tolérance de la vessie, puisque l'intervalle de pH de la vessie est de 4,8 à 8,4. Finalement, la température jouant également une influence sur la stabilité de l'ALA, elle a donc été contrôlée en refroidissant les solvants utilisés pour dissoudre l'ALA, en préparant les solutions dans la glace et en les conservant jusqu'à leur utilisation à basse température. Les solutions préparées dans ces conditions ont montré une stabilité pendant plusieurs jours et ont montré après administration chez l'homme de bons résultats pour le photodiagnostic des tumeurs de la vessie. Les résultats obtenus après administration intra-vésicale de ces solutions ont également montré la nécessité de contrôler la stabilité de l'ALA non seulement avant l'administration mais également pendant l'instillation afin d'éviter la réaction de dégradation néfaste de l'ALA.

CONCLUSION

Les essais cliniques effectués en utilisant l'ALA-PDT montrent que cette molécule a de très nombreux avantages tout en ayant des effets similaires à d'autres photosensibilisants :

- le premier avantage est sa bonne tolérance quelle que soit la voie d'utilisation employée. Les effets secondaires sont faibles et les quelques cas de photosensibilisation rapportés ne durent que quelques jours,
- le deuxième avantage est que l'ALA a une très bonne sélectivité vis-à-vis des tissus tumoraux,
- le troisième avantage est que l'ALA peut être utilisé par voie orale avec des résultats comparables à la voie intra-veineuse,
- le quatrième avantage est que, contrairement à beaucoup d'autres molécules utilisées en photochimiothérapie, le risque d'induire un cancer à plus ou moins long terme est quasiment inexistant.

Afin de remédier à la faible pénétration de l'ALA au travers de la peau, une forme injectable a été développée. Cependant, de nombreux auteurs ont noté l'instabilité de l'ALA qui subit une réaction de dégradation en solution. Cette réaction de dégradation de l'ALA doit être contrôlée pour plusieurs raisons. Tout d'abord, l'innocuité des produits de dégradation de l'ALA n'ayant pas été établie, cette réaction peut se révéler néfaste après administration chez l'homme. De plus, de nombreux auteurs ont supposé que cette réaction pouvait certainement influencer l'efficacité de l'ALA aussi bien dans les études expérimentales *in vitro* que dans les essais cliniques chez l'homme. En effet, il semblerait que plus l'ALA se dégrade, plus il est inefficace. Nous avons donc étudié les différents facteurs pouvant influencer la stabilité de l'ALA afin de limiter sa dégradation et de conserver une efficacité maximale.

Nous avons observé que les différents facteurs étudiés (température, solvant de dissolution et temps) influenceraient considérablement l'efficacité de l'ALA à induire une fluorescence détectable de la PpIX et une phototoxicité sur les cellules C6. Nous avons obtenu une intensité de fluorescence de la PpIX et une phototoxicité induite par l'ALA maximales pour une température de conservation la plus faible possible (4°C), un temps court entre la préparation des solutions et leur incubation avec les cellules (T0) et une dissolution de l'ALA dans l'eau stérile pour préparation injectable. En ce qui concerne l'influence de la concentration en ALA sur son instabilité, celle-ci n'apparaît pas lorsque nous utilisons des concentrations faibles (concentration finale de 200 µg/ml) mais suffisantes pour induire une fluorescence détectable de la PpIX.

Dans un dernier temps, nous avons analysé l'influence de ces facteurs sur la phototoxicité induite par l'ALA en utilisant un rapport ALA/milieu de 1/40 afin de modéliser une utilisation clinique de l'ALA (perfusion de 100 ml) chez l'homme (environ 4 litres de sang). Il a également été observé une influence significative de ces facteurs sur l'efficacité de l'ALA et la phototoxicité maximale a été atteinte pour une solution d'ALA préparée et conservée dans les mêmes conditions que précédemment (eau, 4°C, incubation immédiate).

Nous pouvons ainsi proposer une forme galénique à conserver au froid (4°C) où l'ALA en poudre serait placé dans un compartiment et l'eau stérile dans l'autre. Les deux constituants seraient à mélanger juste avant l'injection chez le patient.

La dégradation de l'ALA qui apparaît très rapidement (moins de 20 minutes) peut varier d'un facteur 5 selon les conditions d'utilisation.

D'autre part, il est connu qu'une grande hétérogénéité de l'efficacité de l'ALA existe en fonction de la lignée cellulaire utilisée, du cycle cellulaire et du pH extracellulaire.

A la vue de ces différentes observations, il semble nécessaire que tous les paramètres de traitement incluant les conditions de conservation et de solubilisation de l'ALA soient clairement notés et employés à chaque nouvelle utilisation de cette molécule afin de conserver une efficacité maximale de l'ALA et d'éviter des résultats hétérogènes entre les différentes études expérimentales ou cliniques.

BIBLIOGRAPHIE

- Amato I. Hope for a magic bullet that moves at the speed of light. *Science* (1993) 262, 32-33.
- Anderson PM, Desnick RJ. Purification and properties of uroporphyrinogen I synthase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* (1980) 255, 1993-1999.
- Auler H, Banzer G. Investigations on the role of porphyrins in tumour-bearing humans and animals. *Z. Krebsforsch* (1942) 53, 65-68.
- Banks JG, Board RG, Carter J, Dodge AD. The cytotoxic and photodynamic inactivation of micro-organisms by rose bengal. *J. Appl. Bacteriol.* (1985) 58, 391-400.
- Bech O, Phillips D, Moan J, MacRobert AJ. A hydroxypyridinone (CP94) enhances protoporphyrin IX formation in 5-aminolaevulinic acid treated cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1997a) 41, 136-44.
- Bech O, Berg K, Moan J. The pH dependency of protoporphyrin IX formation in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *Cancer letters* (1997b) 113, 25-29.
- Berg K, Anholt H, Bech O, Moan J. The influence of iron chelators on the accumulation of protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic acid-treated cells. *Brit. J. Cancer* (1996) 74, 688-697.
- Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem. J.* (1989) 261, 277-280.
- Bonnett R. Photodynamic therapy in historical perspective. In: *Reviews in contemporary pharmacotherapy: Photodynamic therapy* (Eds. S. Johnson and F.N. Johnson), (1999) pp. 11, Marius Press, Carnforth, UK.
- Bourré L, Rousset N, Thibault S, Eleouet S, Lajat Y, Patrice T. PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. *Apoptosis* (2002) 7, 221-230.
- Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* (1996) 64, 469-485.
- Büchanan RB, Carruth JAS, McKenzie AL, Williams SR. Photodynamic therapy in the treatment of malignant tumors of the skin and head and neck. *Eur. J. Surg. Oncol.* (1989) 15, 400-406.
- Bunke A, Zerbe O, Schmid H, Burmeister G, Merkle HP, Gander B. Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. *J. Pharm. Sci.* (2000) 89, 1335-1341.
- Buskard NA, Wilson BC. Introduction to the symposium on photodynamic therapy. *Semin. Oncol.* (1994) 21, 1-13.
- Butler AR, George S. The nonenzymatic cyclic dimerisation of 5-aminolevulinic acid. *Tetrahedron* (1992) 48, 7879-7886.
- Byrne CJ, Marchallsay LV, Ward AD. The composition of Photofrin II. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1990) 6, 13-27.

- Carré J, Eleouet S, Rousset N, Vonarx V, Heyman D, Lajat Y, Patrice T. Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in C6 glioblastoma cells after delta-aminolevulinic acid incubation : effect of a protoporphyrinogen oxidase inhibitor. *Cell. Mol. Biol.* (1999) 45, 433-444.
- Cosserat-Gerardin I, Bezdetnaya L, Notter D, Vigneron C, Guillemin F. Biosynthesis and photodynamic efficacy of protoporphyrin IX (PpIX) generated by 5-aminolevulinic acid (ALA) or its hexylester (hALA) in rat bladder carcinoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* (2000) 59, 72-79.
- Davies CD, Western A, Lindmo T, Moan J. Changes in antigen expression on human FME melanoma cells after exposure to photoactivated hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.* (1986) 46, 6068-6072.
- de Blois AW, Grouls RJE, Ackerman EW, Wijdeven WJA. Development of a stable solution of 5-aminolaevulinic acid for intracutaneous injection in photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.* (2002) 17, 208-215.
- Del C Battle AM. Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy, a model for carcinogenesis. *J. Photochem. Photobiol.* (1993) 20, 5-22.
- Diamond I, Granelli SG, McDonagh AF, Nielsen S, Wilson CB, Jaenicke R. Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet* (1972) 2, 1175-1177.
- Diddens H, Hümpel B, Hüttmann G, Novo M. Chemische instabilität von 5-aminolaevulinsäure: pH und konzentrationsabhängigkeit, *Lazermedizin.* (1994) 10, 106-112.
- Dietel W, Bolsen K, Dickson E, Fritsch C, Pottier R, Wendenburg R. Formation of water-soluble porphyrins and protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic-acid-incubated carcinoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1996) 33, 225-231.
- Dilkes MG, DeJode ML, Gardiner Q, Kenyon GS, McKelvie P. Treatment of head and neck cancer with photodynamic therapy : results after one year. *J. Laryngol. Otol.* (1995) 109, 1072-1076.
- Dougherty TJ. Activated dyes as antitumor agents. *J. Natl. Cancer Inst.* (1974) 52, 1333-1336.
- Dougherty TJ, Potter WR, Weishaupt KR. Drugs comprising porphyrins. US Patent. (1987) 4, 649-151.
- Dougherty TJ. Photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* (1993) 58, 895-900.
- Elder GH. Enzymatic defects in porphyria : an overview. *Semin. Liver Dis.* (1982) 2, 87-99.
- Eleouet S, Rousset N, Carré J, Vonarx V, Vilatte C, Louet C, Lajat Y, Patrice T. Heterogeneity of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in human glioma cells and leukemic lymphocytes. *Neurol. Res.* (2000a) 22, 361-368.
- Eleouet S, Rousset N, Carré J, Bourré L, Vonarx V, Lajat Y, Beijersbergen van Henegouwen G, Patrice T. In vitro fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by δ -aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters. *Photochem. Photobiol.* (2000b) 71, 447-454.

- Elfsson B, Wallin I, Eksborg S, Rudaeus K, Ros AM, Ehrsson H. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. *Eur. J. Pharm. Sci.* (1998) 7, 87-91.
- Evensen JF, Moan J. Photodynamic action and chromosomal damage: a comparison of haematoporphyrin derivative (HpD) and light with X-irradiation. *Br. J. Cancer* (1982) 45, 456-465.
- Ferreira GC, Andrew TL, Karr SW, Dailey HA. Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex. *J. Biol. Chem.* (1988) 263, 3835-3839.
- Fink-Puches R, Hofer A, Smolle J, Kerl H, Wolf P. Primary clinical response and long-term follow-up of solar keratoses treated with topically applied 5-aminolevulinic acid and irradiation by different wavebands of light. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1997) 41, 145-151.
- Franck B, Stratmann H. Condensation products of the porphyrin precursor 5-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen. *J. Biol. Chem.* (1981) 256, 1119-1140.
- Fritsch C, Verwohlt B, Bolsen K, Ruzicka T, Goerz G. Influence of topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid on porphyrin metabolism. *Arch. Dermatol. Res.* (1996) 288, 517-521.
- Fritsch C, Stege H, Saalman G, Goerz G, Ruzicka T, Krutmann J. Green light is effective and less painful than red light in photodynamic therapy of actinic keratoses. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* (1997) 13, 181-185.
- Fritsch C, Goerz G, Ruzicka T. Photodynamic therapy in dermatology. *Arch. Dermatol.* (1998) 134, 207-214.
- Fuchs C, Riesenberger R, Siegert J, Baumgartner R. pH-dependent formation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX in fibrosarcoma cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1997) 40, 49-54.
- Fukuda H, Battle AM, Riley PA. Kinetics of protoporphyrin accumulation in cultured epithelial cells exposed to ALA. *Int. J. Biochem.* (1993) 25, 1407-1410.
- Gadmar OB, Moan J, Scheie E, Ma L-W, Peng Q. The stability of 5-aminolevulinic acid in solution. *J. Photochem. Photobiol. B.* (2002) 67, 187-193.
- Gaullier JM, Geze M, Santus R, Sae Melo T, Maziere JC, Bazin M, Morliere P, Dubertret L. Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX human keratinocytes and fibroblasts cultivated with 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.* (1995) 62, 114-122.
- Gibson SL, Havens JJ, Foster TH, Hilf R. Time-dependent intracellular accumulation of δ -aminolevulinic acid, induction of porphyrin synthesis and subsequent phototoxicity. *Photochem. Photobiol.* (1997) 65, 416-421.
- Gibson SL, Cupriks DJ, Havens JJ, Nguyen ML, Hilf R. A regulatory role for porphobilinogen deaminase (PBGD) in δ -aminolaevulinic acid (δ -ALA)-induced photosensitization? *Br. J. Cancer* (1998) 77, 235-243.

- Goldstein BD, Harber LC. Erythropoietic protoporphyria : lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis. *J. Clin. Invest.* (1972) 51, 892-902.
- Gollnick K. Type II photooxygenation reactions in solution. *Adv. Photochem.* (1968) 6, 1-122.
- Gollnick K, Franken T, Founda MFR, Paur HR, Helds S. Merbromin (mercurochrome) and other xanthene dyes: quantum yields of triplet sensitizer generation and singlet oxygen formation in alcoholic solutions. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1992) 12, 57-82.
- Gomer CJ, Dougherty TJ. Determination of [^3H]- and [^{14}C]-hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.* (1979) 39, 146-151.
- Gossner L, Stolte M, Sroka R, Rick K, May A, Gerhard Hahn E, Ell C. Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barret's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid. *Gastroenterology* (1998) 114, 448-455.
- Grandchamp B, Phung N, Nordmann Y. The mitochondrial localization of coproporphyrinogen III oxidase. *Biochem. J.* (1978) 176, 97-102.
- Grebenova D, Cajthamlova H, Bartosova J, Marinov J, Klamova H, Fuchs O, Hrkal Z. Selective destruction of leukaemic cells by photo-activation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1998) 47, 74-81.
- Gregorie HB, Horger EO, Ward JL, Green JF, Richards T, Robertson HC, Stevenson TB. Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms. *Ann. Surg.* (1968) 167, 820-828.
- Harris DA, Bashford CL. Spectrophotometry and spectrofluorimetry (a practical approach). IRL Press. (1988) pp 1-22.
- Hausmann W. The sensitizing action of haematoporphyrin. *Biochem. Z.* (1911) 30, 276-316.
- Hayata Y, Kato H, Konaka C, Ono J, Takizawa N. Hematoporphyrin derivative and laser photoirradiation in the treatment of lung cancer. *Chest* (1982) 81, 269-277.
- Hecht E. Optics Second edition. Addison - Wesley Publishing company (1987) pp 552-553.
- Hudson JB, Lopez-Bazzocchi I, Towers GHN. Antiviral activities of hypericin. *Antiviral Res.* (1991a) 15, 101-112.
- Hudson JB, Towers GHN. Therapeutic potential of plant photosensitizers. *Pharmac. Ther.* (1991b) 49, 181-222.
- Iinuma S, Farshi SS, Ortel B, Hasan T. A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br. J. Cancer* (1994) 70, 21-28.
- Jaffe EK, Rajagopalan JS. Nuclear magnetic resonance studies of 5-aminolevulinate demonstrate multiple forms in aqueous solution. *Bioorg. Chem.* (1990) 18, 381-394.

- Jeffes EW, McCullough JL, Weinstein GD, Fergin PE, Nelson S, Shull TF, Simpson KR, Bukaty LM, Hoffman WL, Fong NL. Photodynamic therapy of actinic keratosis with topical 5-aminolevulinic acid. A pilot dose-ranging study. *Arch. Dermatol.* (1997) 133, 727-732.
- Jones CM, Mang T, Cooper M, Wilson BD, Stoll HL. Photodynamic therapy in the treatment of Bowen's disease. *J. Am. Acad. Dermatol.* (1992) 27, 979-982.
- Jori G. Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol. B.* (1996) 36, 87-93.
- Juzeniene A, Juzenas P, Kaalhus O, Iani V, Moan J. Temperature effect on accumulation of protoporphyrin IX after topical application of 5-aminolevulinic acid and its methylester and hexylester derivates in normal Mouse Skin. *Photochem. Photobiol.* (2002) 76, 452-456.
- Kelly JF, Snell ME, Berenbaum MC. Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br. J. Cancer* (1975) 31, 237-244.
- Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX : basic principles and present clinical experience. *J. Photochem Photobiol. B.* (1990) 6, 143-148.
- Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically usefull photosensitizer for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1992) 14, 275-292.
- Kennedy JC, Marcus SL, Pottier RH. Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA) : mechanisms and clinical results. *J. Clin. Laser. Med. Surg.* (1996) 14, 289-304.
- Kessel D. Hematoporphyrin and HPD: Photophysics, photochemistry, and phototherapy. *Photochem. Photobiol.* (1984) 39, 851-859.
- Kessel D. In vitro photosensitization with a benzoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* (1989) 49, 579-582
- Kessel D. Symposium-in-print: subcellular localization of photosensitizing agents. *Photochem. Photobiol.* (1997) 65, 387-388.
- Klock J, Akkermans W, Beijersbergen Van Henegouwen GMJ. Derivates of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy ; enzymatic conversion into protoporphyrin. *Photochem. Photobiol.* (1998) 67, 150-154.
- Kondo M, Daimon M. Porphobilinogen deaminase (PBGD). *Nippon Rinsho* (1999) 57, 352-355.
- Kostenich G, Orenstein A, Roitman L, Malik Z, Ehrenberg B. In vivo photodynamic therapy with the new near-IR absorbing water soluble photosensitizer lutetium texaphyrin and a high intensity pulsed light delivery system. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1997) 39, 36-42.
- Kriegmair M, Baumgartner R, Knuchel R, Stepp H, Hofstadter F, Hofstetter A. Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J. Urol.* (1996) 155, 105-110.

Krammer B, Uberriegler K. In vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1996) 36, 121-126.

Laustriat G. Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie* (1986) 68, 771-778.

Leunig A, Staub F, Peters J, Heimann A, Kempfski O, Goetz AE. An vitro model to study cellular photosensitizer uptake and photodynamic dose-response relationships of tumor cells. *Res. Exp. Med.* (1993) 193, 361-370.

Leunig A, Rick K, Stepp H, Gutmann R, Alwin G, Baumgartner R, Feyh J. Fluorescence imaging and spectroscopy of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX for the detection of neoplastic lesions in the oral cavity. *Am. J. Surg.* (1996) 172, 674-677.

Li W, Zhang WJ, Ohnishi K, Yamada I, Ohno R, Hashimoto K. 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in multidrug resistant leukemia cells. *J. Photochem. Photobiol. B.* (2001) 60, 79-86.

Lipson RL, Baldes EJ, Gray MJ. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer* (1967) 20, 2255-2257.

Lui H, Salasche S, Kollias N, Wimberly J, Flotte T, McLean D, Anderson RR. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical aminolevulinic acid : a clinical and histologic study. *Arch. Dermatol.* (1995) 131, 737-738.

Luksiene Z, Eggen I, Moan J, Nesland JM, Peng Q. Evaluation of protoporphyrin IX production, phototoxicity and cell death pathway induced by hexylester of 5-aminolevulinic acid in Reh and HPB-ALL cells. *Cancer Letters* (2001) 169, 33-39.

Masson MD. Cellular aspects of photodynamic therapy for cancer. *Rev. Contemp. Pharmacother.* (1999) 10, 25-37.

McCaughan JS, Guy JT, Hicks W, Laufmann L, Nims TA, Walker J. Photodynamic therapy for cutaneous malignant neoplasms. *Arch. Surg.* (1989) 124, 211-216.

Meyer-Betz F. Investigations on the biological (photodynamic) action of haematoporphyrin and other derivatives of the blood and bile pigments. *Deutsch. Arch. Clin. Med.* (1913) 112, 476-503.

Moan J. Properties for optimal PDT sensitizers. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1990) 5, 521-524.

Moan J, Streckyte G, Bagdonas S, Bech O, Berg K. Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid. *Int. J. Cancer* (1997) 70, 90-97.

Moan J, Berg K, Gadmar OB, Lani V, Ma LW, Juzenas P. The temperature dependence of protoporphyrin IX production in cells and tissues. *Photochem. Photobiol.* (1999) 70, 669-673.

Morton CA, MacKie RM, White-Hurst C, Moore JV, McColl JH. Photodynamic therapy for basal cell carcinoma : effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response (letter). *Arch. Dermatol.* (1998) 134, 248-249.

Nauta JM, Van Leengoed HL, Star WM, Roodenburg JL, Witjes MJ, Vermey A. Photodynamic therapy of oral cancer – a review of basic mechanisms and clinical applications *Eur. J. Oral Sci.* (1996) 104, 69-81.

Neckers DC. Rose bengal. *J. Photochem. Photobiol. A.* (1989) 47, 1-29.

Nelson JS, Kimel S, Brown L, Berns MW. Glucose administration combined with photodynamic therapy of cancer improves therapeutic efficacy. *Lasers Surg. Med.* (1992) 12, 153-158.

Novo M, Hüttnann G, Diddens H. Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumors. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1996) 34, 143-148.

Ochsner-Bruderer M. Zinc(II)-phthalocyanine, a photosensitizer for photodynamic therapy of tumors. Habilitation thesis. University of Basel, Basel, Switzerland (1994).

Oleinick NL, Evans HH. The photobiology of photodynamic therapy for cancer. *Radiation Res.* (1998) 150, 146-156.

Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use. *J. Natl. Cancer Inst.* (1993) 85, 443-456.

Peng Q, Warloe T, Moan J, Heyerdahl H, Steen HB, Nesland JM, Giercksky KE. Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloulcerative basal cell carcinoma. *Photochem. Photobiol.* (1995) 62, 906-913.

Peng Q, Warloe T, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Giercksky KE, Nesland JM. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Cancer* (1997a) 79, 2282-2308.

Peng Q, Berg K, Moan J, Kongshaug M, Nesland JM. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Principles and experimental research. *Photochem. Photobiol.* (1997b) 65, 235-251.

Policard A. Studies of experimental tumours under Wood's light. *Comp. Rend. Soc. Biol.* (1924) 91, 1423-1428

Raab O. On the effect of fluorescent substances on infusoria. *Z. Biol.* (1900) 39, 524-546.

Regula J, Macrobert AJ, Gorchein A. Photosensitization and photodynamic therapy of oesophageal, duodenal and colorectal tumors using δ -aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX : a pilot study. *Gut* (1995) 36, 67-75.

Ren QG, Wu S-M, Peng Q, Chen JY. Comparison of 5-aminolevulinic acid and its hexylester mediated photodynamic action on human hepatoma cells. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* (2002) 34, 650-654.

Richter AM, Jain AK, Canaan AJ, Waterfield E, Sternberg ED, Levy JG. Photosensitizing efficiency of two regioisomers of the benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA). *Biochem. Pharmacol.* (1992) 43, 2349-2358.

Röder B, Wabnitz H. Time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin, mesoporphyrin, pheophorbide a and chlorine e6 in ethanol and aqueous solution. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1987) 1, 103-113.

Rose H, Wagner H. The effect of hypericin as a sensitizer of biological systems against visual and ionizing radiation. *Radiobiol. Radiother.* (1965) 6, 477-483.

Schick E, Kaufmann R, Ruck A, Hainzl A, Boehncke WH. Influence of activation and differentiation of cells on the effectiveness of photodynamic therapy. *Acta Derm. Venereol.* (1995) 75, 276-9.

Schweitzer VG, Visscher D. Photodynamic therapy for treatment of AIDS-related oral Kaposi's sarcoma. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* (1990) 102, 639-649.

Scotto AW, Chang LF, Beattie DS. The characterization and submitochondrial localization of delta-aminolevulinic acid synthase and an associated amidase in rat liver mitochondria using an improved assay for both enzymes. *J. Biol. Chem.* (1983) 258, 81-90.

Sheridan JW, Bishop CJ, Simmons RJ. Biophysical and morphological correlates of kinetic changes and death in a starved human melanoma cell line. *J. Cell Sci.* (1981) 49, 119-137.

Shioi Y, Nagamine M, Kuroki M, Sasa T. Purification by affinity chromatography and properties of uroporphyrinogen I synthase from *Chlorella regularis*. *Biochim. Biophys. Acta* (1980) 616, 300-309.

Spikes JD. Chlorins as photosensitizers in biology and medicine, *J. Photochem. Photobiol. B.* (1990) 6, 259-274.

Spörri S, Chopra V, Egger N, Hawkins HK, Motamedi M, Dreher E, Schneider H. Effects of 5-aminolaevulinic acid on human ovarian cancer cells and human vascular endothelial cells in vitro. *J. Photochem. Photobiol. B.* (2001) 64, 8-20.

Steinbach P, Weingandt H, Baumgartner R, Kriegmair M, Hofstädter F, Knüchel R. Cellular fluorescence of the endogenous photosensitizer protoporphyrin IX following exposure to 5-aminolevulinic acid. *Photochem. Photobiol.* (1995) 69, 887-895.

Stockert JC, Juarranz A, Villanueva A, Canete M. Photodynamic damage to HeLa cell microtubules induced by thiazine dyes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* (1996) 39, 167-169.

Stringer MR, Collins P, Robinson DJ, Stables GI, Sheehan-Dare RA. The accumulation of protoporphyrin IX in plaque psoriasis after topical application of 5-aminolevulinic acid indicates a potential for photodynamic therapy. *J. Invest. Dermatol.* (1996) 107, 76-81.

Stummer W, Stocker S, Wagner S, Stepp H, Fritsch C, Goetz C, Goetz AE, Kieffmann R, Reulen DHJ. Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence. *Neurosurg.* (1998a) 42, 518-526.

Stummer W, Stocker S, Novortny A, Heimann A, Sauer O, Kempfski O, Plenila N, Wietzorrek J, Reulen DHJ. In vitro and in vivo porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1998b) 45, 160-169.

Svanberg K, Andersson T, Killander D, Wang I, Stenram U, Andersson-Engels S, Berg R, Johansson J and Svanberg S. Photodynamic therapy of non-melanoma malignant tumours of the skin using topical δ -amino levulinic acid sensitization and laser irradiation. *Br. J. Dermatol.* (1994) 130, 743-751.

Svanberg K, Wang I, Rydell R. Fluorescence diagnostics of head and neck cancer utilizing oral administration of δ -aminolevulinic acid in 5th International Photodynamic Associations Biennial Meeting, (1995) *Proc. SPIE*, 2371. D.A. Cortese (ed.) pp. 129-141.

Szeimies RM, Sassy T, Landthaler M. Penetration potency of topical applied δ -aminolevulinic acid for photodynamic therapy of basal cell carcinoma. *Photochem. Photobiol.* (1994) 59, 73-76.

Szeimies RM., Calzavara-Pinton P, Karrer S, Ortel B, Landthaler M. Topical photodynamic therapy in dermatology. *J Photochem. Photobiol. B.* (1996a) 36, 213-219.

Szeimies RM, Karrer S, Sauerwald A, Landthaler M. Photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic keratoses : an initial clinical study. *Dermatology* (1996b) 192, 246-251.

Thomas JP, Girroti AW. Glucose administration augments in vivo uptake and phototoxicity of the tumor-localizing fraction of hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* (1989) 49, 241-247.

Vaux DL, Korsmeyer SJ. Cell death in development. *Cell* (1999) 96, 245-254.

Villanueva A, Canete M, Trigueros C, Rodriguez Borlado L, Juarranz A. Photodynamic induction of DNA protein cross-linking in solution by several sensitizers and visible light. *Biopolymers* (1993) 33, 239-244.

Vonarx V, Eléouet S, Carré L, Ioss P, Gouyette A, Leray AM, Merle C, Lajat Y, Patrice T. Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid bioadhesive gel formulation for the photodynamic treatment of lesions of the gastrointestinal tract in mice. *J. Pharm. Pharmacol.* (1997) 49, 652-656.

Von Tappeiner H, Jesionek A. Therapeutic experiments with fluorescent substances. *Münch. Med. Wochenschr.* (1903) 47, 2042-2044.

Von Tappeiner H, Jodlbauer A. On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes. *Arch. Clin. Med.* (1904) 80, 427-487.

Waring P, Kos FJ, Mullbacher A. Apoptosis or programmed cell death. *Med. Res. Rev.* (1991) 11, 219-236.

Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of murine tumors. *Cancer Res.* (1976) 36, 2326-2329.

Wilson BD, Mang T, Stoll H, Jones C, Cooper M, Dougherty TJ. Photodynamic therapy for the treatment of basal cell carcinoma. *Arch. Dermatol.* (1992) 128, 159-1601.

Winkelman JW, Arad D, Kimel S. Stereochemical factors in the transport and binding of photosensitizers in biological systems and in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B.* (1993) 18, 181-189.

Wolf P, Rieger E, Kerl H. Topical photodynamic therapy with endogenous porphyrins after application of 5-aminolevulinic acid : an alternative treatment modality for solar keratoses, superficial squamous cell carcinomas, and basal cell carcinomas. *J. Am. Acad. Dermatol.* (1993) 28, 17-21.

Young SW, Woodburn KW, Wright M, Mody TD, Fan Q, Sessler JL, Dow WC, Miller RA. Lutetium texaphyrin (PCI-0123): a near-infrared, water-soluble photosensitizer. *Photochem. Photobiol.* (1996) 63, 892-897.

ANNEXES

Annexe 1

Indications et molécules en cours d'essais cliniques ou ayant l'AMM
dans le domaine de la PDT

Composé	Nom	Prod/Marketing	λ max absorption	Phase de développement
Porfimer sodium	Photofrin® Photobarr® AMM	QLT, AXCAN	630 nm	<i>Autorisation de mise sur le marché</i> France (avril 1996), USA (décembre 1995) rechutes de cancers bronchiques et œsophagiens <i>Essais cliniques</i> cancers bronchiques et œsophagiens, cancers de la vessie, gliomes
acide δ - aminolévulinique (ALA)	Levulan® AMM	DUSA pharmaceuticals Schering AG MEDAC	630 nm	<i>Autorisation de mise sur le marché</i> USA (décembre 1999) kératoses actiniques multiples <i>Essais cliniques</i> I/II: psoriasis, carcinome baso-cellulaire, maladie de Bowen, Barrett
Benzoporphyrine dérivée monoacide A (BPD-MA) ou Verteporfin	Visudyne® AMM	Sanofi, Novartis	690 nm	<i>Autorisation de mise sur le marché</i> USA (nov 99), France (AMM 2000) DMLA <i>Essais cliniques</i> I/II : agent-anti HIV, cancers cutanés (non mélanotiques), affections gynécologiques II: oncologie cutanée III: immunosuppresseur
Méta-tétra hydroxyphényl chlorine (m-THPC)	Foscan® AMM	Biolitec	652 nm	<i>Essais cliniques, Autorisation de mise sur le marché 2001 en ORL</i> II: cancers du sein, gastro, pancréas III: cancers laryngés, tête, cou, avec chirurgie et radiothérapie pour cancers avancés
ALA methyl ester	Metvix® AMM	Photocure	632 nm	<i>Essais cliniques et Approuvé Suède Dermatologie</i> carcinome baso-cellulaire 2001 Metvix® approuvé en 2002 pour le traitement des états précancéreux de la peau et des KA et distribué par Galderma- L'Oréal
	Hexvix®			<i>Essais cliniques</i> III : photodiagnostic du cancer de la vessie
	Benzvix®			<i>Essais cliniques</i> I/II : photodiagnostic du cancer de l'appareil digestif
Lutetium- téxaphyrine	Lutrin®	Pharmacyclics	732 nm	<i>Essais cliniques</i> II: cancer du sein, prostate
	Antrin®	Pharmacyclics		II: athérosclérose
	Optrin®	Alcon		II: DMLA

Tin éthylétiopurpurine (SnET ₂)	Purlytin®	Miravant Pharmacia & Upjohn	660 nm	Essais cliniques I/II: cancers cutanés ; II/III: cancer du sein métastaté cutané, carcinome baso- cellulaire, sarcome de Kaposi ; III: dégénérescence maculaire
WST09	Tookad®	NEGMA	760 nm	Essais cliniques : I/II: prostate
Talaporfin sodium, Mono-L-aspartyl chlorin e6 NPe6/LS11		Light Sciences Corporation	664 nm	Essais cliniques : I/II: métastases du foie dues à un cancer colorectal I/II: cancers rectal en récides I/II: sarcome I/II: cancers tête et cou I/II: cancers du poumon I/II: cancers de la prostate en récides I/II: cancers du pancréas
HPPH, pyropheophorbide- alpha LS216		Light Sciences Corporation	664 nm	Essais cliniques : I/II: cancers avancés de l'oesophage cancers précoces et Barrett (DHG) prévus
MV9411		Miravant		Essais cliniques : II: psoriasis
MV0633		Miravant		Pré-clinique : athérosclérose, resténose
MV2101		Miravant		Pré-clinique : prévention des sténoses lors de greffes
MV6401		Miravant		Pré-clinique : traitement des cellules cancéreuses et néovascularisation
Zn-phthalocyanine			670 nm	Essais cliniques : athérosclérose, maladies dermatologiques (formulation topique), maladies oculaires
?	PH-10	Photogen	520-580	Pré-clinique: psoriasis
TH 9402	Theralux	Cellmed Bioscience		Pré-clinique: purge de moelle
ATXs10		Photochemical co./Hamamatsu	670 nm	Preclinique DMLA
	Sylsens	Photobiochem N.V.		Recherche Stérilisation ex vivo
Dérivés alkyls de sensibilisants existants		Photopharmica		Recherche
		Photobiotics		Recherche Applications endovasculaires et réactions auto-immunes
Phthalocyanine		Destiny Pharma		Recherche Maladies inflammatoires

Sources : EMEA/FDA/PBS

Annexe 2 : Publication

Soumise fin 2004 au Journal of Photochemistry and Photobiology B :
Biology

Influence of storage conditions on delta amino levulinic acid induced toxicity and phototoxicity in vitro

Aurelie FURIGA, Ludovic BOURRE, Sonia THIBAUT, Youenn LAJAT, Thierry PATRICE

Laboratoire de Photobiologie des Cancers, Département Laser, Hôpital Laënnec, 44093 Nantes cedex 01, France

Abstract

Photodynamic therapy (PDT), a new treatment modality against cancers of small volume is based on the combined effect of a non toxic photoreactive drug (photosensitizer) given to patients topically or systemically and light delivered to the tumour to be treated. Light exposure induces cancer cell death after free radicals production. Delta amino levulinic acid had been found efficient for the treatment of actinic keratoses in dermatology (Levulan, Metvix). However ALA-PDT efficacy can be decreased due to a low penetration in skin depth or its poor stability when in solution. With the aim of developing a more stable formulation for biological or clinical use, we studied the influence of various parameters (concentration, solvents, pH, storage duration, temperature) over this instability through the analysis of PpIX production or ALA-PpIX efficacy. Each of the analysed parameters had been found to greatly influence ALA-PDT. Both the PpIX fluorescence and phototoxicity had been found maximal when cancer cells were incubated with ALA dissolved in water, stored at 4°C, and added immediately after preparation to cells. ALA concentration was of little influence on ALA efficacy. Thus a standardisation for the conditions of ALA use and storage seems necessary in order to avoid the great heterogeneity of results obtained and keep efficacy at the highest possible level through experimental or clinical assays.

Keywords : ALA : delta amino levulinic acid ; PP IX : Protoporphyrin IX ; LD : lethal dose ; MTT : 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide ; PDT : photodynamic therapy ; PBS : Phosphate Buffer Saline ; RPMI : Roswell Park Memorial Institute

1.Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is used successfully for the treatment of a variety of neoplastic [1, 2, 3] and non-neoplastic diseases [4]. PDT is based on the photoactivation, using a given light wavelength adapted to a sensitizer relatively retained by cancer cells, which produces highly reactive oxygen species that can destroy tumor cells [5,6]. Photosensitizers can also be used for tumor detection because of their properties when excited at an appropriate absorption wavelength [7-9].

Delta-aminolevulinic acid (ALA) is the metabolic precursor of protoporphyrin IX (Pp IX) in the heme biosynthesis pathway. Administration of ALA, bypasses the negative feedback control exerted by heme on the enzymatic step in ALA synthesis. Kennedy *et al.* [10], in 1990, were the first to apply 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy (PDT) topically in a clinical setting. Since then, ALA-induced PDT has been used experimentally in a variety of dermatologic indications.

ALA is administered through various routes : topically as a cream applied on the lesion to be treated, orally in fruit juice or other solutions, and intravenously [16]. When ALA is dissolved, it is found to be light-sensitive and unstable, in a manner depending on pH and other factors [17]. The stability properties of ALA in clinically used formulations or in cell incubation media are not presently well described in literature, although a number of reports refer to the instability of ALA in aqueous solutions under different physical and chemical conditions [18]. The chemical stability of ALA has in previous studies been assessed by visual colour changes during the observation period [19], by absorption spectroscopy following the change in absorbance caused by the formation of a mixture of condensation products of ALA [18] and by following the degradation of the parent compound by reversed-phase liquid chromatography [20].

Various vehicles or preparations for ALA administration as well as ALA derivatives have been proposed to overcome the poor penetration of ALA. Whatever the formulation ALA known to fastly degrade has to be administered at appropriate pH time and concentration in the proper solvent the compound should be administered at appropriate pH, time and concentration in a proper vehicle. However these parameters have so far been only poorly investigated.

This is thus the aim of the present study to quantify ALA degradation in view of developing a simple preparation for clinical or experimental use. To achieve this aim, ALA stability had been evaluated by changing the concentration, the solvent, the temperature and the time of incubation after solutions preparation.

ALA stability has been indirectly evaluated by using cells culture as an efficacy marker by measuring the percentage of cell surviving after incubation with ALA. C6 cells were chosen because of possible ALA-PDT applications for brain tumor treatment and intraoperative detection [21].

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

5-aminolevulinic acid hydrochloride 98% (ALA) was purchased from Sigma (St. Quentin Fallavier, France) . It was dissolved at a concentration range of 0-200 µg/ml either in sterilised water routinely used for injections (pH 7), in PBS (pH 7.3) or in RPMI 1640 growth medium without red phenol (pH 7.4). All chemicals used were of analytical purity. All reagents before and during solubilization had been kept at their final temperature of use.

2.2. Aminolevulinic acid storage

a- For PP IX fluorescence imaging analysis in C6 cells

After preparation and before use ALA solutions (100 and 200 µg/ml final concentrations in wells), were stored in sealed tubes in the darkness at 4°C (refrigerator), or at 37°C (incubator with unmodified air atmosphere). These solutions were added to wells containing cells in culture media immediatly after their preparation (T0), or after 60 minutes (T60). pH solution was not affected by ALA addition whatever the concentration.

b- For toxicity and phototoxicity studies

After preparation and until use ALA solutions (0, 20, 50, 100 and 200 µg/ml final concentrations in wells), were stored in sealed tubes in the darkness at 4°C (refrigerator), at 21°C (controlled room temperature) or at 37°C (incubator with unmodified air atmosphere). These solutions were added to wells containing cells in culture media immediatly after their preparation (T0), after 20 minutes (T20) or after 60 minutes (T60).

c- Influence of solvent concentration

In order to analyse the influence of the overall amount of solvent added to cells on their survival after or without light exposure we used a ratio reagent to cell culture media ratio of 2.5 µl to 100 mimicking thus the dilution after systemic injection in humans (an infusion of 100 ml in a blood diffusion volume of approximately 4 liters) instead of the classical in vitro experimental conditions of 11 µl to 100.

After preparation and before use ALA solutions (0, 20, 50, 100 and 200 µg/ml final concentrations in wells), were stored in sealed tubes in the darkness at 4°C (refrigerator), or at 37°C (incubator with unmodified air atmosphere). These solutions were added to wells containing cells in culture media immediatly after their preparation (T0), or after 60 minutes (T60).

2.3. Cell culture

The cell model used consisted of C6 murine glioma cells (ATCC, CCL 105) obtained from the ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD). The cells were allowed to grow to confluence in 25 cm² tissue culture flasks with 6.5 ml Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Cambrex, France) not containing phenol red and supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin and 50 mg/ml streptomycin. The cells, which were grown in a humidified CO₂ atmosphere at 37°C, were adherent to the culture support. They were subcultured by dispersal with 0.025% trypsin in 0.02% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for a contact time dependant on the cells used, and replated at a 1 : 3 dilution three times per week to maintain cells in the exponential growth phase.

2.4. Fluorescence imaging

Fluorescence imaging was performed to visualise PP IX distribution and cellular uptake after incubation with ALA.

After trypsinisation, C6 cells were seeded at 10^5 cells/ml on round glass slides. After 24 h, cells were incubated with the ALA solutions that had been submitted to the various storage conditions as described above (100 or 200 $\mu\text{g/ml}$) at 37°C and for 2 h. Analysis of PP IX fluorescence (emitting at 630 nm) was performed after 450 to 480 nm excitation by a 150 W Xenon lamp. A black-and-white video camera, used for highly sensitive photon detection (Kappa CF 8/4, Fisher Scientific S. A., France), was connected to a light microscope (Olympus BX 40, France) equipped with a 100 X oil-immersion lens.

Cellular uptake was determined using a fluorescence image. Ten points per cell and a total of 10 cells were analysed per condition. Fluorescence was expressed in grey scale using Kappa ImageBase software. Control cells not incubated with any additional reagent either than culture media were also analysed. They did not emit any fluorescence (Data not shown).

2.5 Toxicity and phototoxicity studies

C6 cells were seeded at 10^5 cells/ml of RPMI 1640 medium without phenol red and with 10% FCS in 96-well plates after trypsinization. After 24 h, cells had been given with ALA solutions in order to reach the final concentrations to cells in wells of 0, 20, 50, 100 and 200 $\mu\text{g/ml}$ according to the experiments performed (described above in the section 2.2 of the material & methods). Cells were incubated for 2 h with sensitizer whatever the experiment.

After removal of culture medium, cells were irradiated with a 630 nm diode laser (Diomed). Laser beams were transmitted to the target by a silica-silicon step-index optical fibre (core diameter 400 μm) (Quartz et Silice, France) maintained at a appropriate distance to irradiate cells in a 6-mm diameter well. Power (200 mW) was calibrated with a power meter (Coherent, Orsay, France), and the exposure time was adjusted to obtain an energy density of 25 J/cm^2 .

2.6. Cell death estimation

Cell viability was measured by the MTT colorimetric assay. Optical density measurements had been performed 23 h after the end of the experiment. At the time of counting, wells had been washed with 100 μl of medium with 10% FCS, and 15 μl of a phosphate-buffered saline (PBS)-MTT solution (5 mg/ml of PBS) were added. Four hours later, acid-isopropanol (150 μl of 0.04 N HCl in isopropanol) was used according to the method described by Mossmann *et al.* [22]. Microplates were then read in optical densities at 570 nm with a microplate reader (Dynex Technologies, USA). The experimental references consisted of wells containing media without phenol red but with 10% FCS. For 6 wells per plates 15 μl of MTT solution were also added to be used to determine the « blanks » for absorbance measurements.

Phototoxicity results are expressed as the percentage of treated cells viability as compared to control cells in the same conditions but incubated in media without any drug.

All results are reported as the mean of three separate experiments. Four data sets were recorded for each condition of each experiment.

3. Results

3-1 pH of ALA solutions

[ALA] $\mu\text{g/ml}$	H2O	PBS	RPMI
0	6.5	7.1	7.4
100	3.7	6.9	7.3
200	3.6	6.75	7.2

Table 1: pH of ALA solutions at the beginning of the experiment and at room temperature. Only non significant changes had been noticed after 60 or 120 minutes in solutions containing or not ALA. Whatever the pH addition of 11 μl of any ALA solutions to wells containing cells in RPMI (100 μl) had no influence of the cell medium pH (7.4).

3-2 PP IX fluorescence analysis

Fluorescence (Fig. 1) after 100 $\mu\text{g/ml}$ was found to be only slightly increased when cells were incubated with 200 $\mu\text{g/ml}$ and this whatever the solvent used or the conditions of storage suggesting that the metabolic capabilities of ALA transformation into PP IX had been reached. However fluorescence was found higher whatever the ALA concentration when ALA had been dissolved in water than in PBS and RPMI respectively. For example, intensity of PPIX fluorescence was of 99.4 (a.u.) for water, 71.3 in PBS and 60.4 in RPMI when

cells were incubated with ALA concentration of 100 µg/ml at T0 and 4°C. This results are statistically significant (Student's t-test, $P < 0,05$). When ALA solutions were kept at 4°C, fluorescence intensity was higher than for a storage temperature of 37°C and fluorescence was also higher when solutions had been used immediately after preparation.

3.3 ALA induced toxicity and phototoxicity

Toxicity in darkness was always nonsignificant for C6 cells.

Five stock solutions with different initial concentrations of ALA were incubated for obtaining five final concentrations of 0, 20, 50, 100 and 200 µg/ml.

For all the conditions tested, the phototoxicity induced by the various solutions of ALA was proportional to the ALA concentration without any aberrant phototoxicity at the highest concentrations tested that could have suggested quenching phenomenon. However a phototoxicity of more than 80% was difficult to achieve even for 200 µg/ml within the range of conditions tested (fig. 2, 3 and 4).

3.4. Effects of solvent

ALA was dissolved in three different solvents : water, PBS and RPMI 1640 without phenol red. If we consider experiments at T0 and at 37°C, as a « reference » as it would be the case for extemporaneous preparation and administration, LD50 for water was 81,2 µg/ml, 100 µg/ml for PBS and 152 µg/ml for RPMI (fig. 5). Statistical examination revealed statistically significant difference between LD50 in water and in RPMI. There was no statistically difference between water and PBS at T0 and 37°C, but there was a statistically difference between these two solvent at 21°C ($P < 0,01$)

3.5. Effects of temperature during storage

Solutions of ALA were incubated at 4°C at 21°C or at 37°C. Whatever the solvent tested, when the temperature increased during storage, the ALA induced phototoxicity decreased. In water, the LD50 at T0 at 4°C was 43,3 µg/ml, 45,8 µg/ml at 21°C and 81,2 µg/ml at 37°C. In PBS, at T0, at 4°C the LD50 was 43,9 µg/ml, 87,2 µg/ml at 21°C and at 37°C is 100 µg/ml. Finally, in RPMI, the LD50 at T0, and at 4°C was 65 µg/ml, it is 97 µg/ml at 21°C and 152 µg/ml at 37°C. There was a difference between values of LD50 at 4°C and this at 37°C of 37,9 µg/ml for water, 56,1 µg/ml for PBS and 87 µg/ml for RPMI. These difference between LD50 at 4°C and at 37°C are statistically significant for all the solvent tested (Student t-test, $P < 0,05$).

3.6. Effects of storage duration

ALA solutions were given to cells immediately after preparation (T0), after 20 minutes (T20) and after 60 minutes (T60). During each incubation, the tubes containing the solutions were kept in darkness at the temperature of the experiment (4, 21 or 37°C).

In each experiment, it appeared that more the solutions were prepared and incubated shortly after preparation, more the LD50 decreased, and that had been observed for all the temperatures and the solvents tested. In the water at 21°C, LD50 was 45,8 µg/ml at T0, 58,5 µg/ml at T20 and 67,5 µg/ml at T60. In PBS at 21°C, LD50 was 87,2 µg/ml at T0, 98,3 µg/ml at T20 and 145 µg/ml at T60. Finally, in RPMI, LD50 at 21°C was 97 µg/ml at T0, 200 µg/ml at T20 and more than 200 µg/ml at T60.

Statistical examination revealed statistically significant difference at 21°C between LD50 at T0 and T60 for all the solvent tested ($P < 0,01$).

The ratio of LD 50 observed at room temperature between T0 and T60 is 1,47 for ALA in water, 1,67 for ALA in PBS and reaches more than 2 in RPMI.

3.7. Combinative parameters

When we compared the results obtained in water at 4°C at T0, with those obtained in the RPMI at 37°C at T60, we observed a difference of LD50 of more than 156,7 µg/ml (43,3 µg/ml for water and more than 200 µg/ml for RPMI). In sight of these results it seems that parameters have a cumulative effect ; more we use together the "good parameters", better the results obtained will be, and conversely.

3.8 Influence of solvent concentration

When using a reagent to cell media ratio of 2.5 to 100 instead of the classical 11 to 100 the results of the above sections were found perfectly correlated, dilutions in water inducing a better phototoxicity than those in PBS or RPMI respectively. This suggests strongly that ALA efficacy itself varies according to storage conditions instead of a direct influence of the solvent used on ALA transformation by cells (fig. 6).

4. Discussion

During the last years, photodynamic therapy has developed to become a routinely used new clinical treatment modality for cancer. However, exogenous photosensitizers used for PDT can cause a prolonged skin phototoxicity. Considerable interest has thus recently been directed towards developing new PDT regimens that rely on an endogenously synthesised sensitizer. This procedure named ALA/PPIX-PDT has several advantages over the others and has been proved successful for the treatment of many tumours like skin and gastrointestinal malignancies [23-26] although it still suffers from uncertainties.

First of all, PPIX accumulates effectively in tumour cells and offers better photoselectivity [27, 28]. The body rapidly eliminates PPIX which limits the risk of skin photosensitivity to 1 or 2 days (compared to 1 or 2 months with other photosensitizers). Finally, it is possible according to the clinical situation to administer ALA via various routes, orally, topically, intravenously and by intramuscular injections.

For skin applications ALA is used the more usually topically as a cream. Skin penetration being sometimes too low, an injectable solution of ALA had been developed as for most other cancer applications. Several authors stressed the fact that the ALA was unstable in solution [20, 29, 30].

In 2002, de Blois *et al.* [31], have investigated the influence of pH, concentration and temperature on the degradation of ALA in aqueous solution in order to optimise the formulation of the injection.

During the preparation of aqueous solution of ALA, the solutions turned from colourless to yellow within minutes as they were buffered to neutral pH. Furthermore, the colour of the solutions became more intense with time and their pH decrease significantly even in the presence of a phosphate buffer [30]. These changes revealed the occurrence of a chemical reaction of ALA which is not desirable for clinical application owing to the practical problems derived and, more important, owing to the potential toxicity of the reaction products and the possible decrease in the efficacy of the instillation. Previous studies have shown that ALA reacts nonenzymatically in aqueous solution to yield several condensation products. Frank and Stratmann [32] showed that in alkaline solutions two condensation products were formed. The ratio of about 1:10 was largely independent on the reaction conditions. The minor product was identified as porphobilinogen and the predominant product as 2,5-(β -carboxyethyl)dihydropyrazine (CHPY). Butler and George [33] have identified three condensation products of ALA depending on the reaction conditions : at moderate pH and under anaerobic conditions CHPY was formed, which yields 2,5-(β -carboxyethyl)pyrazin (CPY) on oxidation. CHPY was formed together with the pseudoporphobilinogen in strongly alkaline solutions. Under physiological conditions, 4-7% ALA might exist as a dihydropyrazin and the mole fraction of this compound is dependent on the concentration of ALA [34].

Novo *et al.*, [18], showed that whatever the pH, CHPY concentration increased within the first 15 minutes of the reaction and that later CHPY formation was higher in solutions at pH 4 than pH 5.2. CPY, the other degradation product is also likely to increase with high pH (7.4) as compared to lower ones. These data are quite in agreement with our findings that are probably the cellular expression of in vitro chemical changes making ALA less incorporated and/or metabolised into PPIX in living cells.

Elfsson *et al.* [20], in 1998, investigated the temperature dependence of the condensation reaction of ALA within the temperature range 37-85°C at pH 7.53. The Arrhenius plot was linear and hence prediction of stability at lower temperature was possible. This is why we decided to make our experiments at temperatures lower or equal to 37°C, namely, 0°C, 21°C and 37°C. And indeed, our results seem in agreement with the predictions of Elfsson since the lower the temperature is, the more the LD50 is low it-also. We can thus say that it would be necessary to prepare various dilutions of the solution of ALA at the lowest possible temperature.

Gadmar *et al.* [35] in 2002, have monitored the degradation of ALA in solution by measuring a degradation product absorbing photons around 278 nm, and by measuring the ability of the ALA solution to stimulate PPIX production in cells. They find that the 278-nm absorption band increased with storage time at 37°C and that the ability of the ALA solutions to produce PPIX in cells decayed with storage time. The shape of the absorption spectrum did not change with storage time. This indicates that there was no change in the composition of absorbing products formed. Novo *et al.* [18] identified the peak at 275 nm as 2,5-(β -carboxyethyl)pyrazine based on UV spectra and they seemed to find spectral changes after only 3 min. The visually observed colour changes in such solutions certainly are almost instantaneous, suggesting that there is a rapid initial reaction. Therefore we chose to test the effect of the ALA according to if the solution had been prepared more or less a long time before its incubation with the cells. However if clearly ALA efficacy in cells decreased with temperature and storage time we could not evidence any pH change.

Our experiments were led with the aim of determining the conditions for which the ALA in solution would be the least possible degraded. We thus studied the effect of solutions of ALA in various solvents left at rest to degrade themselves spontaneously. With the difference of the other authors, we sought to evaluate the impact of this degradation on the residual phototoxicity induced by the more or less out-of-date ALA instead of studying the residual concentration of PPIX or the eventual ALA degradation products. This parameter seems to us the ultimate one for experimental or clinical situations but to our knowledge had never been studied.

We chose to test on a cell line known to be sensitive to ALA-PDT [36]. We have assayed ALA solutions made of three solvents, sterilised water for injections, PBS and RPMI selected for their routine something that brought us out of any artefact of toxicity due to the solvents.

The make-ready time of the reagents in cell culture or for clinical injections is shorter than one hour; this is why we used times of degradation of the ALA solutions of 0 (extemporaneous preparation), 20 and 60 minutes. The cells were maintained under optima conditions for culture to avoid any artefact, the only variable as compared to controls being the solution of ALA added to the cells.

A short and non exhaustive analysis of the literature (Table 2) shows that, when ALA PPIX PDT had been studied by many authors, materials and methods sections (including preparation of solutions or light delivered to cells) and thus results are very heterogeneous making it pretty difficult to compare reliably. If in addition we consider that a number of cell models (with their intrinsic doubling times or ALA metabolic properties) had been used we are at the end faced to a problem of reproducibility. However it seems although the references cited are not exhaustive that despite the number of variable parameters ALA dilutions in cell media prior to incubation with cells impairs the most the subsequent PDT results. A relative standardisation of PDT procedures as well as a really full description of the experimental conditions appears necessary. This could be a role to be played by scientific associations to propose such a list of experimental parameters.

Cells lines	ALA concentrations	Light for LD50	Solvent	LD50	References
PAM ET NBT-II	130 µg/ml		0.9% NaCl	130 µg/ml	Iinuma <i>et al.</i> [37]
C6	25-200 µg/ml	514 nm 25 J/ cm ²	0.9% NaCl 4°C	45 µg/ml	Eleouet <i>et al.</i> [36]
LNCaP PC-3	130 µg/ml 130 µg/ml	630nm 1,0J/cm ² 630 nm 3 J/ cm ²	0.9 % NaCl	130 µg/ml	Momma <i>et al.</i> [38]
C6	25-150 µg/ml	514 nm 25 J/ cm ²	Water 4°C	75 µg/ml	Carré <i>et al.</i> [39]
ProB cells	0-200 µg/ml	514 nm 25 J/ cm ²	Water 21°C	150 µg/ml	Bourré <i>et al.</i> [40]
K 562	6.5 µg/ml	380nm 2 J/cm ²	Water (uncertain)	6.5 µg/ml	Hanania <i>et al.</i> [41]
V79	65 µg/ml	340-420nm, 16 J/cm ²	PBS	65 µg/ml	Schevchuk <i>et al.</i> [42]
Cells cultured from tumours grown on mice or rats	17,42, 84 µg/ ml	30mJ / cm ²	α-MEM- FBS	84 µg/ml	Gibson <i>et al.</i> [43]
ScL1, ScL2	30-300 µg/ml	600-700nm 30J/ cm ²	Cell medium (RPMI?)	300 µg/ml	Schick <i>et al.</i> [44]
MGH-U1	260 µg/ml	>450 nm 6 J/ cm ²	RPMI	84 µg/ml	Bech <i>et al.</i> [45]
NCTC 2544	130 µg/ml	436 nm 5 J/ cm ²	DMEM+FBS	130 µg/ml	Gaullier <i>et al.</i> [46]
HEL DAUDI JURKAT HL60	130 µg/ml	400-550 nm 4-13 J/cm ² 1,74 J/cm ² 0,79J/cm ² 0,78J/cm ²	RPMI 1640	130 µg/ml	Grebenova <i>et al.</i> [47]
WiDR		630 nm 75J/cm ²	RPMI	120 µg/ml	Moan <i>et al.</i> [48]

Table 2 Non exhaustive list of references showing the heterogeneity of ALA induced phototoxicity on various cell models. Incubation times had not been taken into account.

The results obtained within the present study with a solution of ALA diluted in sterilised water for injections seemed better than those with PBS which is itself better than RPMI. In the literature, the best solvent was found to be PBS for Diddens *et al.* [30]. However Bunke *et al.* [29] in 2000 demonstrated on the contrary an increased ALA stability in aqueous solutions of low pH (pH of 5,5 or lower) and at low temperature was deduced from changes in the yellowish colour and UV spectrum.

These last results seem more in agreement with the results obtained in our experiments. In the literature, other formulations for ALA had been studied including nonaqueous solutions, oil-in-water and water-in-oil emulsions, microemulsions, and hydrogels, as well as the addition of antioxidants to aqueous solutions but none of these approaches seemed to improve ALA stability.

Whatever the solvent used temperature between preparation and time of use and of course delay duration before use are also of critical importance. These parameters are simply never mentionned as considered as self-understood but speed of ALA degradation is really high and influence on results not neglectable.

The development of stable ALA formulations for clinical or experimental use requires knowledge of degradation mechanisms and kinetics of the compound. A standardisation of ALA conditions of use and storage could strongly influence the comprehension of clinical results including diagnostic procedures as well as experimental data. ALA degradation which occurs in less than 1 hour can vary by a factor 5 according to the conditions of use on at least C6 cells. This standardisation is probably also more important during in vitro or systemic injections as compared to topical applications although this has to be carefully checked. On an other hand it is known that a great heterogeneity exists concerning the metabolic capabilities of ALA transformation into PP IX from one cell to another. All these parameters influence eventually concomitantly PDT efficacy and in an unpredictable manner not only experimentally but also clinically. This strongly suggests that all parameters of treatment including storage and solubilisation should be clearly recorded and stated within any report involving the use of ALA. Again scientific associations could push for a more standardized description of the procedures used.

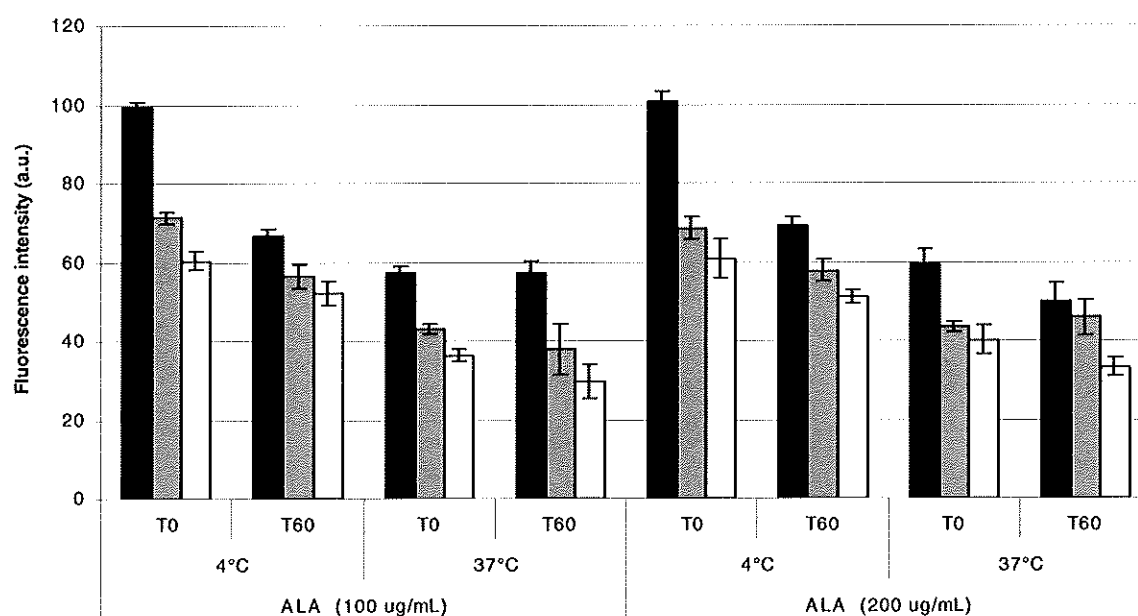


Figure 1 : PP IX fluorescence in C6 cells after incubation for 2 hours with ALA (100 or 200 µg/mL final concentration dissolved in water (black) , PBS (grey) or RPMI (white) and added to cells immediately or after 60 minutes of storage at 4°C or 37 °C.

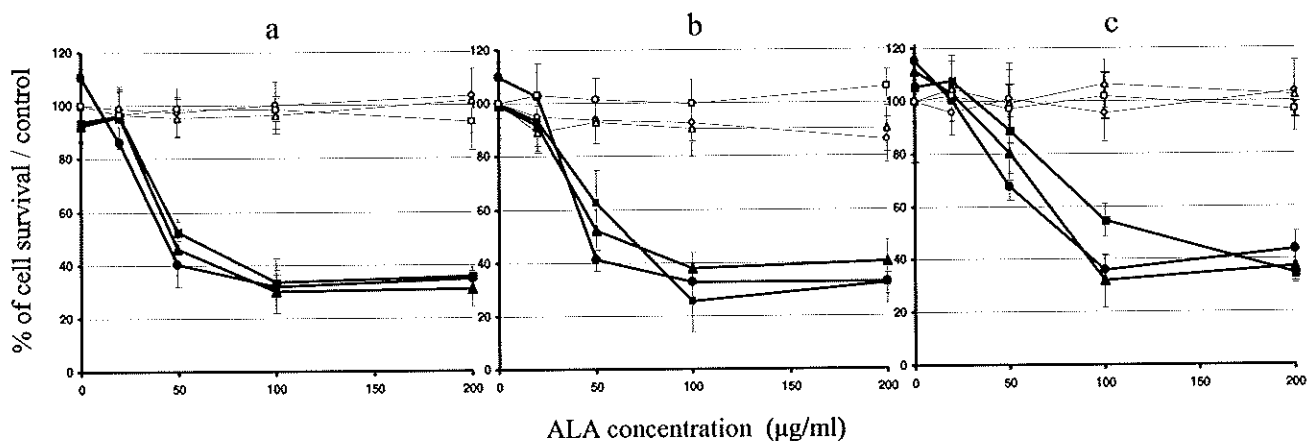


Figure 2 : Toxicity (open figures) and phototoxicity (filled figures) of C6 cells incubated for 2 h with ALA (0, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) dissolved in sterilised water for injection stored for T0 (●), T20 (▲) and T60 (■) delays before addition to cells. Solutions were stored in darkness at 4°C (a), 21°C (b) or at 37°C (c). Errors bars reflect standard deviations.

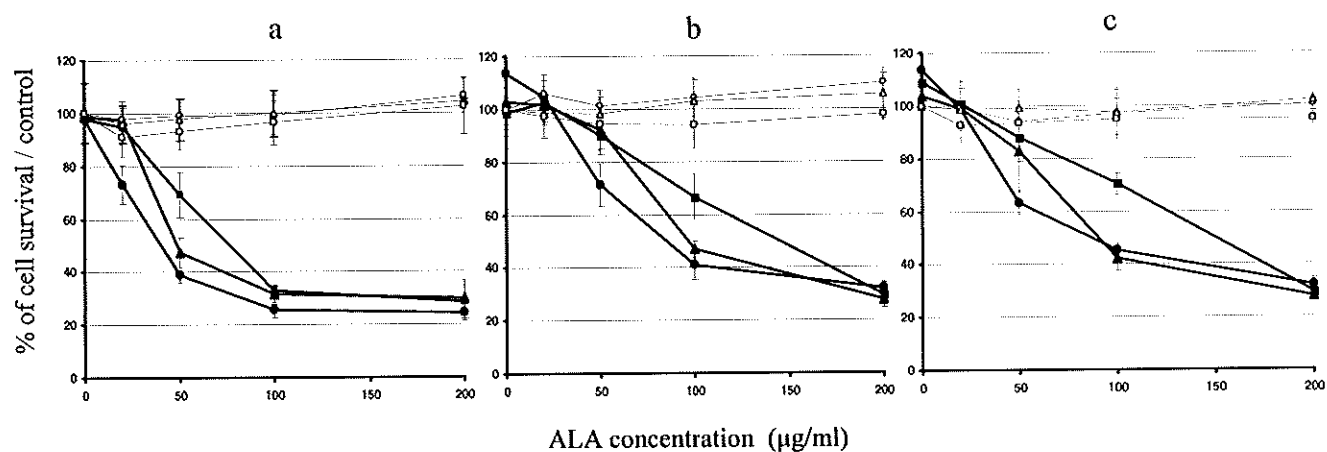


Figure 3 : Toxicity (open figures) and phototoxicity (filled figures) of C6 cells incubated for 2 h with ALA (0, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) dissolved in PBS stored for T0 (●), T20 (▲) and T60 (■) delays before addition to cells. Solutions were stored in darkness at 4°C (a), 21°C (b) or at 37°C (c). Errors bars reflect standard deviations

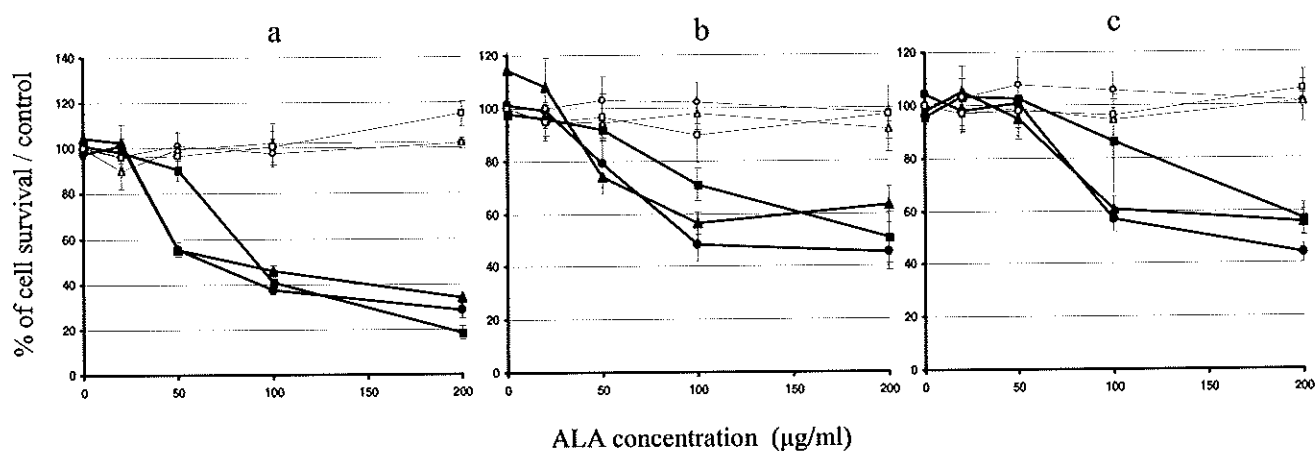


Figure 4 : Toxicity (open figures) and phototoxicity (filled figures) of C6 cells incubated for 2 h with ALA (0, 20, 50, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$) dissolved in RPMI stored for T0 (●), T20 (▲) and T60 (■) delays before addition to cells. Solutions were stored in darkness at 4°C (a), 21°C (b) or at 37°C (c). Errors bars reflect standard deviations

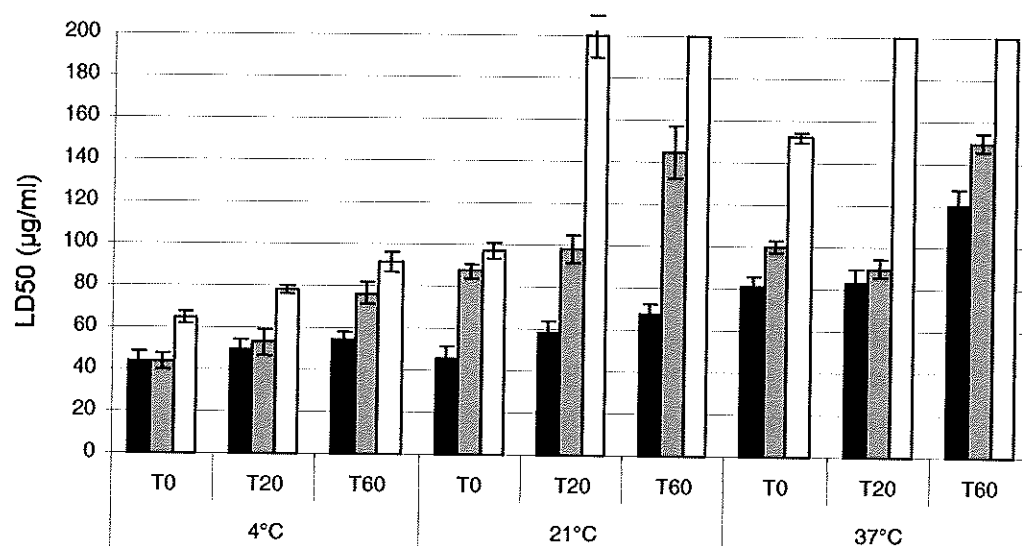


Figure 5 : LD 50 in C6 cells after ALA induced PDT (incubation time 2 hours) according to the different storage conditions used. ALA was dissolved in water (black), PBS (grey) or RPMI (white). Solutions were kept at 4, 21 or 37°C for 0, 20 or 60 minutes before addition to cells. Ratio of concentration ALA-reagent to culture media was 11 to 100.

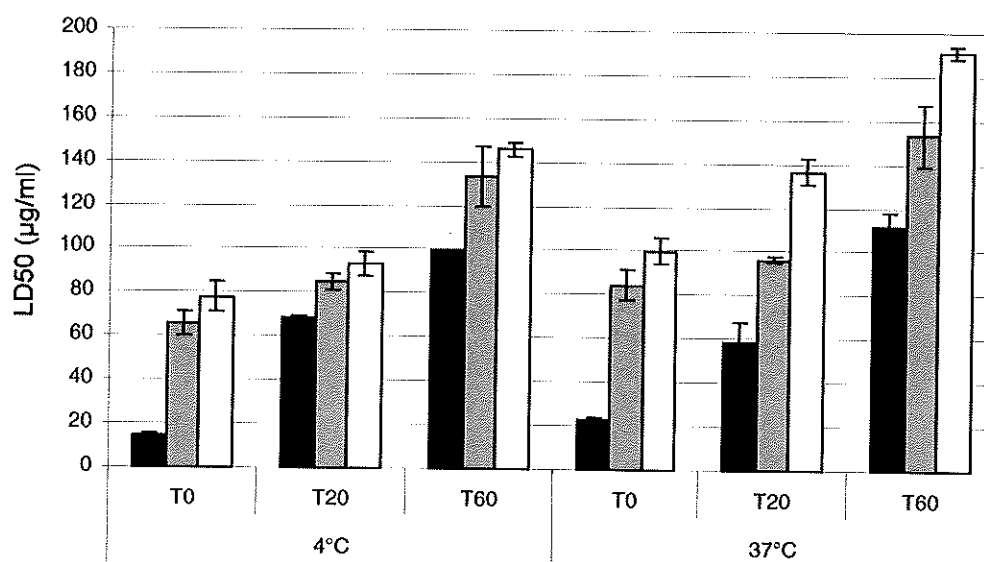


Figure 6: LD 50 in C6 cells after ALA induced PDT (incubation time 2 hours) according to the different storage conditions used. ALA was dissolved in water (black), PBS (grey) or RPMI (white). Solutions were kept at 4, 21 or 37 °C for 0, 20 or 60 minutes before addition to cells. Ratio of concentration ALA-reagent to culture media was 2.5 to 100.

5. References

- [1] M.A. Biel, Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancers, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14 (1996) 239-244.
- [2] J.S. McCaughan, Photodynamic therapy of endobronchial and esophageal tumors : An overview, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14 (1996) 223-233.
- [3] H. Kostron, A. Obwegeser and R. Jakober, Photodynamic therapy in neuro surgery : A review, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 36 (1997) 157-168.
- [4] R. Fink-Puches, A. Hofer, J. Smolle, H. Kerl and P. Wolf, Primary clinical response and long-term follow-up of solar keratoses treated with topically applied 5-aminolevulinic acid and irradiation by different wavebands of light, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 41 (1997) 145-151.
- [5] K.R. Weishaupt, C.J. Gomer and T.J. Dougherty, Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of murine tumors, *Cancer Res.* 36 (1976) 2326-2329.
- [6] M.T. Foulter, V. Vonarx-Coinsman, L. Xavier de Brito, L. Morlet, N. Robillard and T. Patrice, DNA or cell kinetics flow cytometry analysis of 33 small gastrointestinal cancers treated by photodynamic therapy, *Cancer* 73 (1994) 1595-1607.
- [7] W. Alian, A. Andersson-Engels and K. Svanberg, Laser-induced fluorescence studies of meso-tetra(m-hydroxyphenyl) chlorin malignant and normal tissues in rats, *Br. J. Cancer* 70 (1994) 880-885.
- [8] L. Morlet, V. Vonarx, M.T. Foulter, A. Gouyette, C. Stewart, P. Lenz and T. Patrice, In vitro and vivo spectrofluorimetry of a water-soluble meta-(tetrahydrophenyl)chlorin (m-THPC) derivative, *J. Photochem Photobiol. B : Biol.* 39 (1997) 249-257.
- [9] D. Braichotte, G. Wagnieres, J.M. Philippon, R. Bays, H.B. Ris, P. Monnier, A. Chatelain and H. Van Der Bergh, Clinical LIF pharmacokinetic measurements with Photofrin II for optimising the photodetection of early cancer, *SPIE* 1645 (1992) 229-240.
- [10] J.C. Kennedy, R.H. Pottier and D.C. Pross, Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX : basic principles and present clinical experience, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 6 (1990) 143-148.
- [11] F. Cairnduff, M.R. Stringer, E.J. Hudson, D.V. Ash and S.B. Brown, Superficial photodynamic therapy with topical 5-aminolevulinic acid for superficial primary and secondary skin cancer, *Br. J. Cancer* 69 (1994) 605-608.
- [12] K. Svanberg, T. Andersson, D. Killander, I. Wang, U. Stenram, S. Andersson-Engels, R. Berg, J. Johansson and S. Svanberg, Photodynamic therapy of nonmelanoma malignant tumours of the skin using topical δ -amino levulinic acid sensitization and laser irradiation, *Br. J. Dermatol.* 130 (1994) 743-751.
- [13] J. Regula, A.J. MacRobert, A. Gorchein, A. Buonaccorsi, S.M. Thorpe, G.M. Spencer, R.W. Hatfield and S.G. Bown, Photosensitisation and photodynamic therapy of oesophageal duodenal and colorectal tumors using 5-amino levulinic acid-induced protoporphyrin IX_a pilot study, *Gut* 36 (1995) 67-75.
- [14] M. Kriegmair, R. Baumgartner, R. Knuechel, H. Stepp, A. Hofstadter and A. Hofstetter, Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence, *J. Urol.* 155 (1996) 105-110.
- [15] C. Fritsch, G. Goerz and T. Ruzicka, Photodynamic therapy in dermatology, *Arch. Dermatol.* 134 (1998) 207-214.
- [16] Q. Peng, T. Warloe, K. Berg, M. Moan, M. Kongshaug, K.E. Giercksky and J.M. Nesland, 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy, Clinical research and future challenges, *Cancer* 79 (1997) 2282-2308.
- [17] C.S. Loh, A.J. MacRobert, J. Bedwell, J. Regula, N. Krasner and S.G. Bown, Oral versus intravenous administration of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy, *Br. J. Cancer* 68 (1993) 41-51.
- [18] M. Novo, G. Hüttnann, H. Diddens, Chemical instability of 5-aminolevulinic acid used in the fluorescence diagnosis of bladder tumors, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 34 (1996) 143-148.
- [19] S.C. Chang, A.J. MacRobert and S.G. Bown, Biodistribution of protoporphyrin IX in rat urinary bladder after intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid, *J. Urol.* 155 (1996) 1744-1748.
- [20] B. Elfsson, I. Wallin, S. Eksborg, K. Rudaeus, A.M. Ros and H. Ehrsson, Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution, *Eur. J. of Pharm. Sci.* 7 (1998) 87-91.
- [21] J.C. Kennedy, S.L. Marcus, R.H. Pottier, Photodynamic therapy (PDT) and photodiagnosis (PD) using endogenous photosensitization induced by 5-aminolevulinic acid (ALA) : mechanisms and clinical results, *J. Clin. Laser. Med. Surg.* 14 (1996) 289-304.
- [22] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.* 65 (1983) 55-63.
- [23] L. Gossner, M. Stolte, R. Sroka, K. Rick, A. May, E. Gerhard Hahn, C. Ell, Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid, *Gastroenterology*, 114 (1998) 448-455.
- [24] C.A. Morton, R.M. MacKie, C. White-hurst, J.V. Moore, J.H. McColl, Photodynamic therapy for basal cell carcinoma : effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response (letter), *Arch. Dermatol.* 134 (1998) 248-249.
- [25] C. Fritsch, G. Goerz, T. Ruzicka, Photodynamic therapy in dermatology, *Arch. Dermatol.* 134 (1998) 207-214.

- [26] W. Li, W.J. Zhang, K. Ohnishi, I. Yamada, R. Ohno and K. Hashimoto, 5-Aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy in multidrug resistant leukemia cells, *J. Photochem. Photobiol. Biol.* 60 (2001) 79-86.
- [27] A.M. Del C Battle, Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy, a model for carcinogenesis, *J. Photochem. Photobiol.* 20 (1993) 5-22.
- [28] J. Moan, G. Streckyte, S. Bagdonas, O. Bech, K. Berg, Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid, *Int. J. Cancer.* 70 (1997) 90-97.
- [29] A. Bunke, O. Zerbe, H. Schmid, G. Burmeister, H.P. Merkle and B. Gander, Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid, *Journal of pharmaceutical sciences* 89 (2000) 1335-1341.
- [30] H. Diddens, B. Hümpel, G. Hüttmann and M. Novo, Chemische instabilität von 5-aminolaevulinsäure: pH und konzentrationsabhängigkeit, *Lasermedizin* 10 (1994) 106-112.
- [31] A.W. De Blois, R.J.E. Grouls, E.W. Ackerman and W.J.A. Wijdeven, Development of a stable solution of 5-aminolaevulinic acid for intracutaneous injection in photodynamic therapy, *Lasers Med. Sci.* 17 (2002) 208-215.
- [32] B. Franck and H. Stratmann, Condensation products of the porphyrin precursor 5-aminolevulinic acid to coproporphyrinogen, *J. Biol. Chem.* 232 (1981) 1119-1140.
- [33] A.R. Butler and S. George, The nonenzymatic cyclic dimerisation of 5-aminolevulinic acid, *Tetrahedron* 48 (1992) 7879-7886.
- [34] E.K. Jaffe and J.S. Rajagopalan, Nuclear magnetic resonance studies of 5-aminolevulinate demonstrate multiple forms in aqueous solution, *Bioorganic chemistry* 18 (1990) 381-394.
- [35] O.B. Gadmar, J. Moan, E. Scheie, L.W. Ma and Q. Peng, The stability of 5-aminolevulinic acid in solution, *J. Photochem. Photobiol. B : Biol.* 67 (2002) 187-193.
- [36] S. Eleouet, N. Rousset, J. Carré, L. Bourré, V. Vonarx, Y. Lajat, G. Beijersbergen van Henegouwen and T. Patrice, In vitro fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by δ -aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters, *Photochem. Photobiol.* 71 (2000) 447-454.
- [37] S. Iinuma, S.S. Farshi, B. Ortel, T. Hasan, A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin, *Br. J. Cancer* 70 (1994) 21-28.
- [38] T. Momma, M.R. Hamblin, T. Hasan, Hormonal modulation of the accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin and phototoxicity in prostate cancer cells, *Int J Cancer.* 72(6) (1997) 1062-9.
- [39] J. Carré, S. Eleouet, N. Rousset, V. Vonarx, D. Heyman, Y. Lajat and T. Patrice, Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in C6 glioblastoma cells after delta-aminolevulinic acid incubation : effect of a protoporphyrinogen oxidase inhibitor, *Cellular and Molecular Biology* 45 (1999) 433-444.
- [40] L. Bourré, N. Rousset, S. Thibault, S. Eleouet, Y. Lajat and T. Patrice, PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis, *Apoptosis* 7 (2002) 221-230.
- [41] J. Hanania, Z. Malik, The effect of EDTA and serum on endogenous porphyrin accumulation and photodynamic sensitization of human K562 leukemic cells, *Cancer Lett.* 65(2) (1992) 127-31.
- [42] I. Shevchuk, V. Chekulayev, J. Moan, K. Berg, Effects of the inhibitors of energy metabolism, Isoniazide and levamisole, on 5-aminolevulinic-acid-induced photochemotherapy, *Int J Cancer.* 67 (1996) 791-9.
- [43] S.L. Gibson, J.J. Havens, T.H. Foster and R. Hilf, Time-dependent intracellular accumulation of δ -aminolevulinic acid, induction of porphyrin synthesis and subsequent phototoxicity, *Photochem. Photobiol.* 65 (1997) 416-421.
- [44] E. Schick, R. Kaufmann, A. Ruck, A. Hainzl, W.H. Boehncke, Influence of activation and differentiation of cells on the effectiveness of photodynamic therapy, *Acta Derm Venereol.* 75 (1995) 276-9.
- [45] O. Bech, D. Phillips, J. Moan, A.J. MacRobert, A hydroxypyridinone (CP94) enhances protoporphyrin IX formation in 5-aminolaevulinic acid treated cells, *J. Photochem. Photobiol. B.* 41 (1997) 136-44.
- [46] J.M. Gaullier, M. Geze, R. Santus, T. Sae Melo, J.C. Maziere, M. Bazin, P. Morliere, L. Dubertret, Subcellular localization of and photosensitization by protoporphyrin IX human keratinocytes and fibroblasts cultivated with 5-aminolevulinic acid, *Photochem. Photobiol.* 62 (1995) 114-22.
- [47] D. Grebenova, H. Cajthamlova, J. Bartosova, J. marinov, H. Klamova, O. Fuchs, Z. Hrkal, Selective destruction of leukaemic cells by photo-activation of 5-aminolaevulinic acid-induced protoporphyrin IX, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 47 (1998) 74-81.
- [48] J. Moan, G. Streckyte, S. Bagdonas, O. Bech, K. Berg, Photobleaching of protoporphyrin IX in cells incubated with 5-aminolevulinic acid, *Int. J. Cancer.* 70 (1997) 90-7.

Nom - Prénoms : FURIGA - Aurélie, Bernadette, Louissette

Titre de la Thèse : Influence des conditions de conservation et d'utilisation sur l'efficacité de l'acide delta-aminolévulinique (ALA) utilisé en photochimiothérapie

Résumé de la Thèse :

La photochimiothérapie (PDT), traitement contre le cancer des petites tumeurs solides localisées, est basée sur l'action combinée d'un médicament (photosensibilisant) non toxique administré chez un patient par voie locale ou générale et de la lumière visible délivrée localement au niveau de la tumeur. Le rayonnement lumineux provoque la mort des cellules tumorales après libération d'espèces radicalaires toxiques. L'acide delta-aminolévulinique (ALA) est le précurseur métabolique d'un photosensibilisant naturel endogène, la protoporphyrine IX (PpIX). L'ALA-PDT a montré de très bons résultats lors d'essais cliniques pour le traitement des kératoses actiniques (Levulan®). Malheureusement, cette thérapeutique peut perdre de son efficacité de part la faible pénétration de l'ALA au travers de la peau et son instabilité en solution.

En vue de développer une forme la plus stable possible en solution utilisable en biologie ou en clinique, nous avons étudié l'influence de différents facteurs (concentration, solvants, pH, durée de conservation et température) sur cette instabilité à travers l'analyse de la production de la PpIX et de son efficacité photosensible. L'ensemble de ces facteurs a montré une influence considérable sur l'efficacité de l'ALA. Nous avons obtenu une intensité de fluorescence de la PpIX ainsi qu'une phototoxicité induite par l'ALA maximales pour des cellules cancéreuses incubées avec une solution d'ALA préparée dans de l'eau stérile, conservée à faible température (4°C) et ajoutée aux cellules immédiatement après sa préparation. La concentration en ALA n'a pas montré d'influence sur son instabilité pour les doses utilisées (0-200 µg/ml).

Une standardisation des conditions d'utilisation et de conservation de l'ALA semble ainsi nécessaire à réaliser afin d'éviter l'hétérogénéité des résultats observés lors des différentes études et de maintenir au mieux l'efficacité de l'ALA lors d'utilisations expérimentales ou cliniques.

MOTS CLES :	ACIDE DELTA-AMINOLEVULINIQUE PROTOPORPHYRINE IX PHOTOCHEMIOThÉRAPIE	PHOTOTOXICITE INSTABILITE HÉTÉROGÉNÉITÉ
--------------------	---	---

JURY

PRESIDENT : M. Jean-François BIARD, Professeur de Pharmacognosie
Faculté de Pharmacie de Nantes

ASSESEURS : M. Thierry PATRICE, Professeur de Physiologie - Anatomie
Faculté de Pharmacie de Nantes
Mme Béatrice RICHARD, MCU en Sciences Biologiques
Faculté d'Odontologie de Bordeaux
16, cours de la Marne 33082 BORDEAUX CEDEX

Adresse de l'auteur : 33, avenue Henri Barbusse 33700 MERIGNAC