

THESE
pour le
DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE

**L'utilisation des indirubines en photochimiothérapie :
Evaluation de vingt-neuf molécules**

Présentée et soutenue publiquement par

Marie-Anne POINCELOT

Le 26 octobre 2007 devant le jury ci-dessous

Président : M. Gilles Barnathan, Professeur, Nantes
Membres du jury : M. Thierry Patrice, Professeur, Nantes
Mme Hélène Robillard, Docteur en Pharmacie.
M. David Olivier, Vétérinaire, chercheur INSERM
Directeur de thèse : M. Thierry Patrice, Professeur, Nantes

ABBREVIATIONS

ALA	Acide δ -aminolévulinique
AMM.	Autorisation de Mise sur le Marché
ALAD	ALA déshydratase
BPD	Benzoporphyrine dérivée
CDK	Kinases cycline-dépendantes
Ce6	Chlorine e6
DL	Dose Létale
D.M.L.A.	Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
FCS	Fœtal Calf Serun (sérum de veau fœtal)
FDA	Food and Drug Administration
HPD	Hématoporphyrine dérivée
LASER	Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation
Lu-Tex	Lutetium Texaphyrin
MC540	Mérocyanine 540
m-THPC	méta-TétraHydroxyPhényle Chlorine
O₂	Oxygène
Pb	Paire de bases
PBG	Porphobilinogène
PBGD	Porphobilinogène déaminase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PDD	Photodiagnostic
PDT	PhotoDynamic Therapy (Photochimiothérapie)
PpIX	Protoporphyrine IX
ROS	Reactive Oxygen Species (Radicaux libres)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	5
---------------------	----------

GENERALITES	11
--------------------	-----------

I La photochimiothérapie	12
---------------------------------	-----------

I . 1.	Définition et principe	12
I . 2.	Les photosensibilisants	15
I . 2.-1.	Les porphyrines et leurs analogues	17
I . 2.-2.	Les photosensibilisants non porphyriniques	27
I . 3.	Les réactions photochimiques	32
I . 3.-1.	Type I	32
I . 3.-2.	Type II	33
I . 3.-3.	Type III	34
I . 4.	Aspects cellulaires de la PDT des cancers	34
I . 4.-1.	PDT et mort cellulaire	34
I . 4.-2.	PDT et cibles cellulaires	35
I . 5.	Les applications cliniques	38
I . 5.-1.	Les applications en Cancérologie	38
I . 5.-2.	Les applications non anticancéreuses	39

II Lumière et fluorescence	42
-----------------------------------	-----------

II . 1.	La lumière	42
II . 1.-1.	Nature de la lumière	42
II . 1.-2.	Transitions électroniques	43
II . 2.	Emission de fluorescence	45
II . 3.	La relaxation vibrationnelle	47
II . 4.	La conversion interne	47
II . 5.	Conversion intersystème	48
II . 6.	Phosphorescence	48

Matériel et Méthodes	49
-----------------------------	-----------

I Matériel	51
-------------------	-----------

I . 1.	Les photosensibilisants : Les indirubines	51
I . 2.	Les kinases	53
I . 3.	Les modèles cellulaires	54
I . 3.-1.	F98	54

I . 3.-2.	SH-SY5Y _____	55
I . 3.-3.	HCT116 _____	55
I . 4.	Appareillage _____	56
I . 4.-1.	Les lasers _____	56
I . 4.-2.	Le spectrophotomètre d'absorption _____	57
I . 4.-3.	Le spectrofluorimètre à cuve _____	57
I . 4.-4.	Le photomètre d'absorption _____	57
II	Méthodes _____	58
II . 1.	Spectrophotométrie d'absorption et stabilité en solution _____	58
II . 2.	Spectrofluorimétrie _____	58
II . 3.	Détermination des ROS _____	59
II . 4.	Détermination de la toxicité et de la phototoxicité et mort cellulaire à court terme _____	60
II . 4.-1.	Implantation et incubation _____	60
II . 4.-2.	Irradiation _____	61
II . 4.-3.	Mesure de la viabilité cellulaire _____	61
II . 5.	Analyse de protéines kinases et mort cellulaire à long terme _____	62
II . 5.-1.	Méthodes d'analyse des activités anti-kinases _____	62
II . 5.-2.	Mesure de la viabilité cellulaire à long terme _____	63
II . 6.	Expression des résultats _____	63
Résultats	_____	64
I	Spectrophotométrie d'absorption et stabilité en solution _____	65
II	Fluorescence et production de ROS _____	67
III	Détermination de la toxicité et de la phototoxicité _____	69
IV	Analyse de l'activité anti-kinases _____	71
Discussion	_____	73
Conclusion	_____	79
ANNEXES	_____	81
BIBLIOGRAPHIE	_____	86

INTRODUCTION

Le cancer demeure aujourd'hui la principale crainte des français : Quatre français sur cinq considèrent le cancer comme le principal risque sanitaire pouvant les affecter ou affecter leurs proches. Les cancers sont la seconde cause de mortalité en France après les maladies cardio-vasculaires. Environ 10 % de l'ensemble des nouveaux cas annuels touchent les français âgés de 15 à 44 ans. Plus de 60 % des cancers surviennent entre 45 et 74 ans. Le cancer du poumon est le plus préoccupant en raison de son pronostic, qui reste très sévère (7 % de survie à cinq ans), et de sa fréquence, qui en font le cancer le plus grave en terme de mortalité dans cette classe d'âge. Enfin, plus d'un cancer sur quatre survient après 75 ans.

Un grand nombre de recherches ont permis de mettre en évidence des agents déterminants dans le déclenchement du processus cancéreux. Nous citerons les agents chimiques (composants de la fumée de tabac, benzène, amiante ...), les cancérogènes viraux (lymphome de Burkitt et Epstein Barr Virus ...), physiques (Ultra-violet, rayon X ...) et la prédisposition génétique.

Le cancer est donc aujourd'hui un problème majeur de santé publique. Le nombre de cas de cancers dans le monde est considérable. L'incidence des cancers est de 750 000 morts par an en Europe.

En valeur absolue, le nombre de cas de cancers va augmenter dans le monde : augmentation des facteurs de risque, augmentation de la population, vieillissement de la population. Une augmentation de 27% du nombre de cas de cancers est prévue en Europe pour 2010 par rapport à 1985 [Carruths, 1998a]. Cette augmentation déjà préoccupante dans les pays industrialisés va devenir très grave dans les pays en voie de développement, avec une augmentation prévue de 116% en Afrique et de 92% en Asie pour cette même période [Carruths, 1998b].

Malheureusement, les traitements restent encore trop souvent impuissants. Actuellement, le traitement des tumeurs repose sur la chirurgie, l'immunothérapie, l'hormonothérapie, la radiothérapie et la chimiothérapie.

Mais la chimiothérapie et la radiothérapie sont le plus souvent très mal supportées par le malade, les effets secondaires étant importants que ce soit au niveau physique (vomissements...) que moral (chute des cheveux, appréhension du traitement...). Dans de nombreux cas l'efficacité est moyenne et temporaire, de plus le coût des traitements

est très élevé. Il est actuellement considéré que le coût moyen par patient d'un traitement anticancéreux en Europe est de 3900 \$ US pour la radiothérapie, 9100 \$ US pour la chirurgie ou bien encore 15600 \$US pour la chimiothérapie (1991) [Carruths, 1998c].

L'utilisation de la photochimiothérapie ou Photodynamic therapy (PDT) dans le traitement des tumeurs malignes suscite actuellement de grands espoirs.

Cette méthode physico-chimique est basée sur l'action combinée d'un médicament photosensible non toxique, injecté par voie générale au patient, et de la lumière visible, délivrée localement au niveau de la tumeur à l'aide d'un laser.

Le traitement consiste à irradier à l'aide de fibres optiques la tumeur préalablement traitée par le photosensibilisant qui se fixe préférentiellement sur celle-ci. Le rayonnement, d'une longueur d'onde adaptée au spectre d'absorption lumineuse du produit, active la substance. La substance activée libère alors des espèces radicalaires toxiques qui vont altérer des cibles cellulaires vitales pour la tumeur et ainsi, provoquer la mort des cellules cancéreuses.

La PDT possède trois avantages par rapport aux traitements conventionnels:

- Une relative sélectivité des sensibilisants vis-à-vis des tissus cancéreux est obtenue par une rétention plus longue du photosensibilisant dans la tumeur (physico-chimie, vascularisation). De plus, la phototoxicité est limitée à la zone irradiée par le laser, évitant ainsi les dommages au tissu sain voisin non irradié [Gomer, 1991]. Enfin, les tissus sains réparent mieux les lésions que les tissus cancéreux.
- La photochimiothérapie, peu invasive, peut s'appliquer à toute pathologie présentant une prolifération cellulaire et permet d'apporter une réponse thérapeutique originale dans certains cas (par exemple la dégénérescence maculaire liée à l'âge ou DMLA).
- La plupart des sensibilisants, excités par une longueur d'onde ultraviolette ou bleue, réémettent une fluorescence intense dans le rouge ou le proche infrarouge (IR) ce qui permet de réaliser de véritables cinétiques tant tissulaires que cellulaires, et de les utiliser à des fins de diagnostic topographique. C'est ce qui explique l'implication massive des sociétés d'optique médicale dans le domaine du photodiagnostic.

Les dérivés de porphyrine sont actuellement les seuls photosensibilisants utilisés couramment en clinique pour traiter le cancer par photochimiothérapie. Leur

phototoxicité, leur fluorescence et leur rétention sélective dans les tissus néoplasiques expliquent l'intérêt que ces molécules suscitent dans leur domaine.

Cependant, l'utilisation de ces photosensibilisants pose un problème de photosensibilité cutanée pouvant durer plusieurs mois, nécessitant de la part du patient une attention particulière vis à vis de l'exposition à la lumière solaire.

Ainsi la définition de nouvelles structures au sein de la famille des photosensibilisants doit être envisagée afin de diminuer la demi-vie de ces médicaments au sein de l'organisme, permettant ainsi une réduction de la photosensibilisation cutanée, mais aussi une diminution du temps d'hospitalisation du patient ainsi que des coûts de traitements.

Devant ce besoin de produits nouveaux, il est nécessaire de se tourner vers des pigments d'origine marine : les indirubines.

Les indirubines sont des isomères de l'indigo, ce sont des composés richement pigmentés. Ces bis-indoles peuvent être obtenus à partir de nombreux végétaux, de mollusques, d'urine de mammifères, et de sources bactériennes variées.

Le « Murex », mollusque de la famille des muricidés, produit le fameux rose Tyrien. Ce pigment pourpre est connu depuis l'époque pré-romaine et, dans le pourtour méditerranéen, il y a des traces d'une réelle industrie aux environ du XIII^{ème} siècle [Mc Govern & Michel, 1985a]. L'indigo, un des colorant les plus ancien du monde, est utilisé depuis des millénaires. Il a une histoire exotique, et a fait l'objet de commerce mondial depuis l'Antiquité pour être utilisé comme teinture, pigments pour la peinture et pour la médecine. Au Japon, *Polygonum tinctorium* a été longtemps cultivée pour l'indigo qu'elle contenait.

Le terme « indirubine » fut utilisé pour la première fois en 1855 par Edward Schunck pour décrire « une chose de couleur rouge présente dans l'indigo et dans les plantes qui en contiennent » [Schunck, 1855]. Depuis, les « indirubines », c'est-à-dire les isomères de l'indigo et ses dérivés, ont fait l'objet de nombreuses études. L'indirubine fut d'abord chimiquement synthétisée par Adolf Von Bayer en 1881, peu après la synthèse chimique de l'indigo pour laquelle il reçut le Prix Nobel de Chimie en 1905.

L'indirubine est également l'ingrédient actif des remèdes de médecine traditionnelle chinoise (Danggui Longhui Wan) utilisés pour traiter des pathologies variées dont la leucémie myéloïde chronique [Hoessel *et al.*, 1999a] [Xiao *et al.*, 2002].

De plus, l'indirubine et ses dérivés font partie des premiers inhibiteurs des kinases cyclines - dépendantes (CDK) qui ont été découverts [Hoessel *et al.*, 1999b] [Knockaert *et al.*, 2004]. Les CDK ont une fonction essentielle dans la régulation du cycle de division cellulaire et sont impliquées dans les cancers [Marko *et al.*, 2001].

Elles jouent un rôle important dans le système nerveux et sont liées à de nombreuses pathologies neurodégénératives comme la Maladie d'Alzheimer [Leclerc *et al.*, 2001a] [Tsai *et al.*, 2004], la maladie de Parkinson [Smith *et al.*, 2004] et la maladie de Nieman-Pick [Zhang *et al.*, 2004] [Wang *et al.*, 2003a] ainsi que dans les lésions cérébrales ischémiques [Wang *et al.*, 2003b] ou traumatiques [Di Giovanni *et al.*, 2005].

Elles sont également impliquées dans le processus inflammatoire [Rossi *et al.*, 2006] et dans la sécrétion d'insuline par les cellules pancréatiques [Wei *et al.*, 2005].

En plus des CDK, il a été montré que les indirubines avaient pour cible les GSK-3, la glycogène phosphorylase b et le récepteur aryl hydrocarbène qui module les effets de beaucoup de xénobiotiques comme la dioxine [Damiens *et al.*, 2001] [Kosmopolou *et al.*, 2004].

Les indirubines sont donc très étudiées pour leurs propriétés pharmacologiques et constituent une nouvelle famille prometteuse d'agents neuroprotecteurs et anti-cancéreux [Meijer *et al.*, 2006a] [Ferandin *et al.*, 2006a].

Un livre reprenant les aspects culturels, chimiques, biologiques et pharmacologiques des indirubines a été récemment publié [Meijer *et al.*, 2006b].

Comme ces substances absorbent la lumière préférentiellement entre 400 et 600 nm, il serait intéressant de connaître leur photoréactivité potentielle après exposition à la lumière.

Après avoir décrit les paramètres mis en jeu en photochimiothérapie, tels que les réactions photochimiques, les photosensibilisants, les réactions photochimiques ainsi que la lumière et la fluorescence, nous présenterons les méthodes utilisées et les résultats obtenus concernant l'évaluation de 29 indirubines.

Nous avons réalisé trois sortes d'essais en vue d'une application photodynamique : Etude de leur absorption et de leur fluorescence, en présence ou en absence de FCS, de leur production de ROS et enfin, évaluation de leur toxicité et de leur phototoxicité en culture cellulaire, et ce, avec deux objectifs : d'une part, évaluer le risque phototoxique potentiel de ces composés richement pigmentés et d'autre part, évaluer l'efficacité potentielle de ces indirubines comme photosensibilisants.

Enfin, dans un dernier temps, nous discuterons nos résultats afin d'en dégager les points importants.

Ces expériences ont été réalisées en collaboration entre le département Laser du CHU de Nantes et l'Unité CNRS Cycle Cellulaire de la station biologique de Roscoff.

GENERALITES

I La photochimiothérapie

I. 1. Définition et principe

La photochimiothérapie (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".

Les propriétés bénéfiques de la lumière du soleil ont été notées depuis des siècles. Des études anthropologiques ont indiqué que dans l'Égypte 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 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, 1900]. Peu après en 1903, von Tappeiner et Jesionek ont publié un court article sur le traitement de l'herpès, du psoriasis et du cancer de la peau par application topique d'éosine suivie d'une exposition à la lumière [Von Tappeiner & 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 & Jodlbauer, 1904].

En 1911, Hausmann [Hausmann, 1911] et Meyer-Betz [Meyer-Betz, 1913a] ont fait un rapport sur la phototoxicité de l'hématoporphyrine et Policard en 1924 a attribué la fluorescence rouge induite par la lumière à une accumulation naturelle de photosensibilisants dans les tumeurs humaines [Policard, 1924]. Auler et Banzer [Auler & Banzer, 1942] ont confirmé ces observations et suggéré l'utilisation de porphyrines pour la détection précoce des maladies.

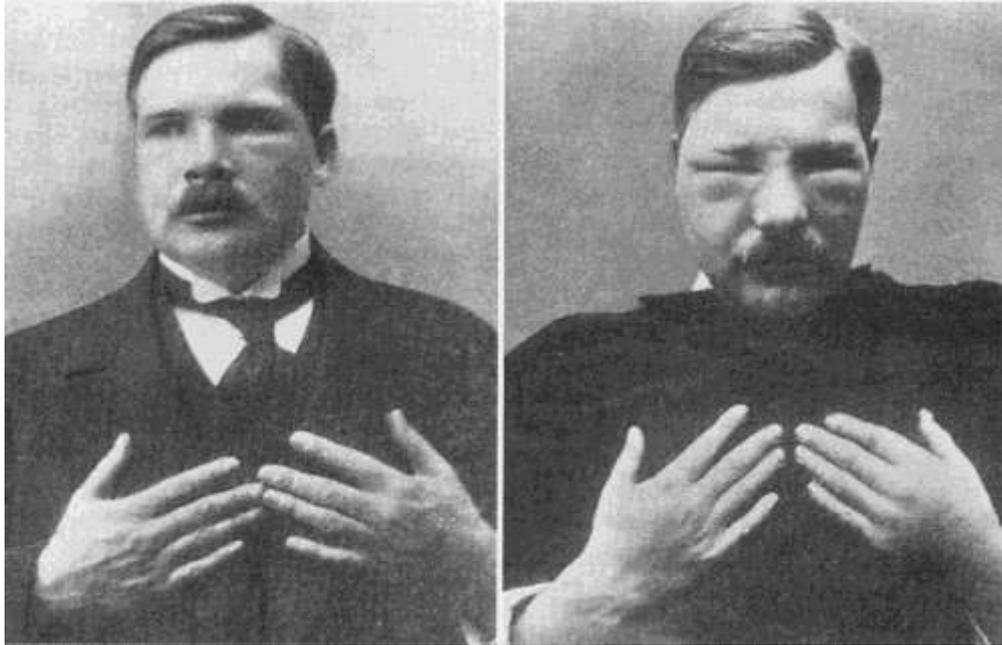


Figure 1 : F. Meyer-Betz avant et après une injection intraveineuse de 200 mg d'hématoporphyrine induisant une photosensibilité solaire [Meyer-Betz, 1913b].

Les premières études de photodiagnostic (PDD) ont été rapportées par Gregorie *et al.* [Gregorie *et al.*, 1968a] 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 (Tableau 1), montrant une corrélation de fluorescence de 75-85% avec les biopsies d'épithélioma 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.

Total: 226 patients	Positifs	Négatifs
173 lésions malignes	132 (76,3%)	41 (23,7%)
Epithélioma malpighiens: 123 patients	95 (77,3%)	28 (22,7%)
Adénocarcinomes: 37 patients	31 (83,9%)	6 (16,1%)
53 lésions bénignes	12 (22,6%)	41 (77,4%)

Tableau 1 : Fluorescence après injection d'hématoporphyrine [Gregorie et al., 1968b]

Même si Figge *et coll.* ont suggéré le traitement potentiel de certains cancers avec des porphyrines ou des métallo porphyrines depuis 1948 [Figge *et al.*, 1948], plus de 20 années se sont écoulées avant que Lipson rapporte la première utilisation de l'hématoporphyrine dérivée (HPD) en photochimiothérapie [Lipson *et al.*, 1967a].

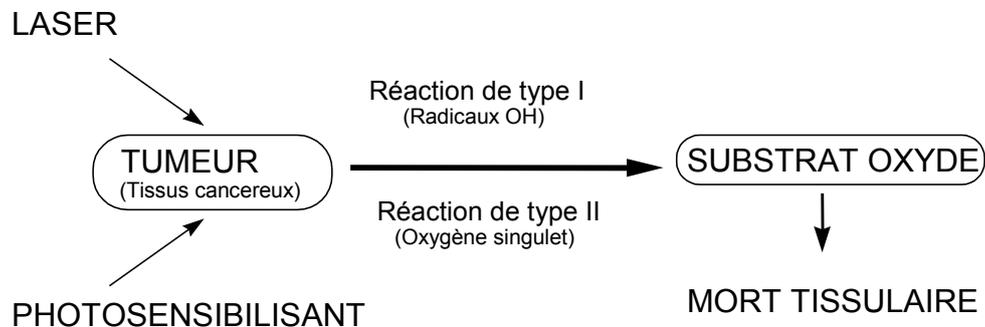


Figure 2: Principe de la Photochimiothérapie (PDT)

La venue sur le marché médical de lasers (inventé en 1960) dès les années 70 a donné un nouvel élan à la PDT, quand Dougherty *et al.*, Diamond *et al.* et Kelly *et al.* ont rapporté l'utilisation d'HPD et de lumière laser pour une destruction sélective de la tumeur [Dougherty, 1974] [Kelly *et al.*, 1975].

Le principe de ce traitement consiste à "illuminer" la tumeur préalablement traitée par une substance réagissant à la lumière 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 al., 1986] [Goldstein & Harber, 1972].

I. 2. Les photosensibilisants

Le premier photosensibilisant utilisé est un dérivé des porphyrines, l'hématoporphyrine dérivée (HPD) et a abouti sous une forme purifiée, au Photofrin®. L'autorisation de mise sur le marché (A.M.M.) obtenue en France (avril 1996) après les Etats-Unis (1995), le Japon (1994) ... a encouragé le développement de photosensibilisants plus efficaces.

Idéalement, un photosensibilisant est un bon agent photodynamique s'il vérifie plusieurs propriétés [Jori, 1996] :

* *physico-chimiques :*

- haute pureté chimique
- 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). 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 al.*, 1995].

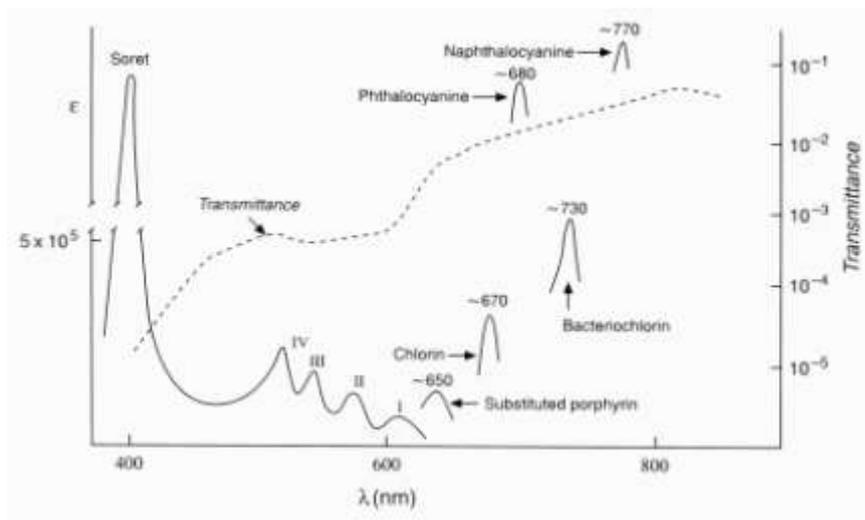


Figure 3: Représentation relative de l'absorption des photosensibilisants et de la quantité de lumière traversant un tissu humain d'1 cm d'épaisseur [Bonnett, 1999]

I. 2.-1. Les porphyrines et leurs analogues

Ce sont les travaux sur l'hémoglobine et la chlorophylle qui ont conduit à la découverte des porphyrines. Le groupe des porphyrines se rencontre dans de nombreux constituants naturels : hémoglobine, cytochromes, enzymes (comme la catalase et la peroxydase).

Les porphyrines sont caractérisées par un noyau tétrapyrrolique fermé (noyau porphine).

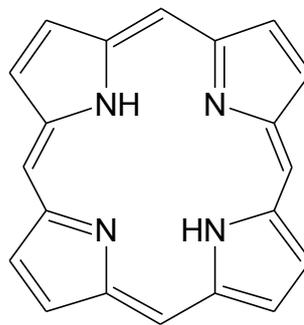


Figure 4 : Noyau porphine

a) L'hématoporphyrine dérivée

Pour augmenter les propriétés de localisation tumorale des porphyrines, Schwartz a synthétisé en 1959 l'hématoporphyrine dérivée (HPD), un composé complexe, hétérogène et pauvrement reproductible, constitué d'un mélange de différentes porphyrines formées par une variété de degrés d'oligomérisations (du monomère aux hexamères) et de structures chimiques (éther, ester et liaisons carbone entre les unités de porphyrines). Cependant les qualités de localisation tumorale de l'HPD ont clairement été démontrées [Lipson *et al.*, 1967b] [Gregorie *et al.*, 1968c].

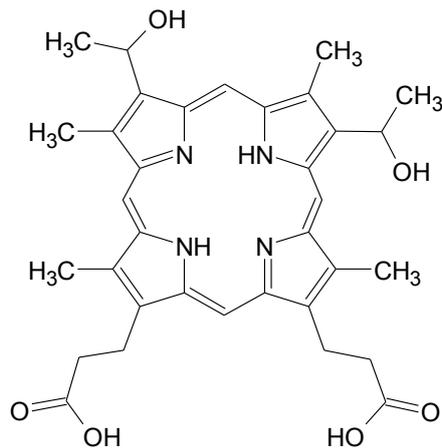


Figure 5 : L'hématoporphyrine

C'est en 1982 que Hayata et coll. ont rapporté les premiers essais cliniques avec l'HPD pour le traitement du cancer du poumon [Hayata, 1982].

b) Le Photofrin[®]

Le Photofrin[®] (Porfimer Sodium), est une forme partiellement purifiée. Celui-ci a reçu l'autorisation de mise sur le marché en France (avril 1996) pour deux applications cliniques [Buskard & Wilson, 1994a] (rechutes des cancers bronchiques et cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement loco-régional antérieur).

Obtenu par un principe de séparation, le Photofrin[®] contient principalement la fraction active de l'HPD [Byrne *et al.*, 1990] [Dougherty *et al.*, 1987]. Cependant ses composants variés sont caractérisés par différentes propriétés spectroscopiques, pharmacocinétiques et pharmacologiques.

Le Photofrin[®] est principalement constitué de monomères, incluant l'hématoporphyrine (Figure 5), les deux isomères de l'hydroxy éthyle vinyle deutéroporphyrine et la protoporphyrine IX, de dimères d'hématoporphyrine avec une liaison éther, ester ou carbone-carbone (Figure 6) et de très grands oligomères.

Figure 6 : Dimères du Photofrin : dihématoporphyrine avec une liaison A) éther , B) ester, C) carbone-carbone

c) Les photosensibilisants de seconde génération

Durant les années passées, une grande variété de substances incluant les chlorines, les benzoporphyrines, les purpurines, les phthalocyanines, les texaphyrines... a été proposée comme candidats potentiels pour la PDT [Rosenthal, 1991] [Woodburn *et al.*, 1997].

(1) Les chlorines

Les chlorines sont des porphyrines réduites et elles possèdent typiquement une bande de forte absorption dans le rouge entre 640 et 700 nm [Spikes, 1990a].

(a) La chlorine e6

La chlorine e6 (Ce6) appelée parfois phytochlorine, est dérivée de la chlorophylle a. Elle 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 & Wabnitz, 1987]. Le rendement de photoproduction d'oxygène singulet de la Ce6 (dans l'éthanol) est de 0,7.

La chlorine est localisée dans les lysosomes ce qui entraîne leur destruction après illumination et le relargage des enzymes qu'ils contiennent. Les dérivés de la Ce6, incluant la mono-L-aspartyl chlorine e6 (ACe6), la diaspartyl Ce6, la monoseryl Ce6 et autres dérivés amino acides, sont mieux retenus par les tumeurs et induisent une meilleure destruction tumorale que la Ce6 elle-même.

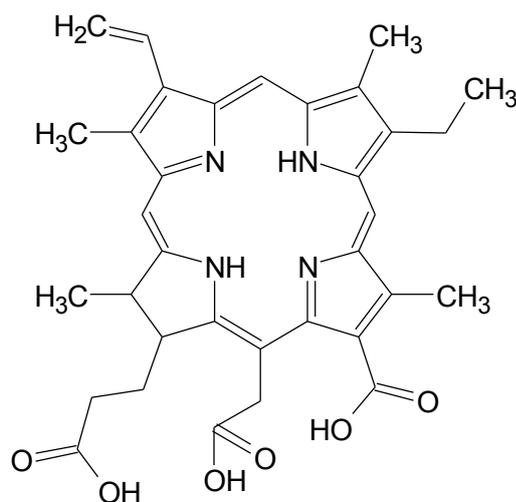


Figure 7 : Chlorine e6

(b) Les purpurines

Les purpurines sont des chlorines car elles ont un groupe pyrrole réduit. Comme plusieurs autres chlorines, les purpurines ont une forte bande d'absorption dans le rouge, région du spectre entre 630 et 715 nm et ont un rendement quantique d'oxygène singulet de 0,6-0,7 [Spikes, 1990b].

Les purpurines sont à base libre ou complexée avec un métal (argent, nickel, étain, zinc). Seules les métallo purpurines avec de l'étain (Sn) ou du zinc (Zn) sont efficaces. L'efficacité relative des meilleures purpurines suit cet ordre : SnET2 > SnNT2 > ZnET2 > ZnNT2. (NT2 : octaéthylpurpurine, ET2 : étiopurpurine) [Spikes, 1990c].

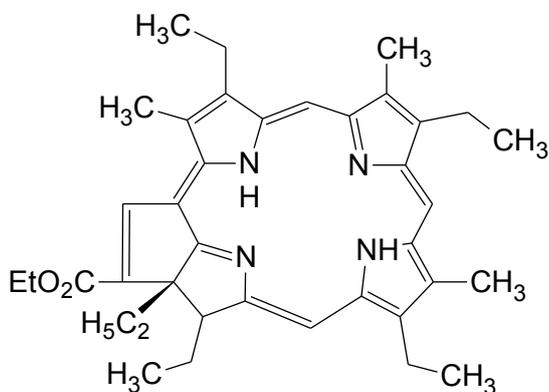


Figure 8 : Etiopurpurine

(c) La benzoporphyrine

Cette chlorine est synthétisée à partir de la protoporphyrine. Elle peut exister comme monoacide ou diacide mais la forme monoacide est considérablement plus active [Pass, 1993a]. Son caractère lipophile facilite son association avec la membrane cellulaire [Kessel, 1989].

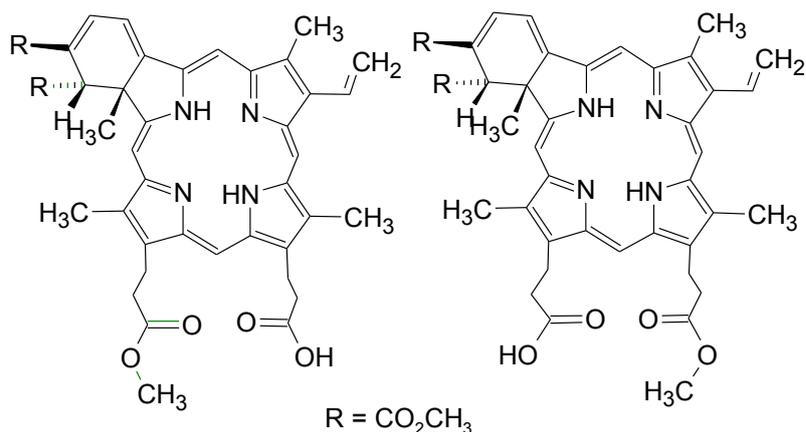


Figure 9 : Deux isomères de la benzoporphyrine dérivée monoacide A

L'avantage principal de la BPD est la présence de son pic d'absorption maximal à 690 nm, favorisant la pénétration tissulaire de la lumière. Si l'on compare les coefficients d'extinction molaire dans la bande 600-700 nm, la BPD est environ 4 fois plus efficace que le Photofrin[®] (pic à 623 nm) pour l'absorption de la lumière [Richter *et al.*, 1987].

(d) *La meta-tétra hydroxyphényle chlorine*

La meta-tétra hydroxyphényle chlorine (m-THPC) est une porphyrine réduite (chlorine) avec 4 fonctions phénols. Il en existe deux dérivés, la p-THPC et la o-THPC qui diffèrent par la position du OH sur le cycle. Ces substances montrent une activité prometteuse et une sélectivité tissulaire dans la photonécrose. La m-THPC s'est révélée être 25 à 30 fois plus puissante que l'HPD dans des essais *in vivo* de photosensibilisation de tumeurs.

Ces composés sont solubles dans des solvants polaires et ont une forte absorption dans le rouge (maximum à 652 nm) [Bonnett *et al.*, 1989].

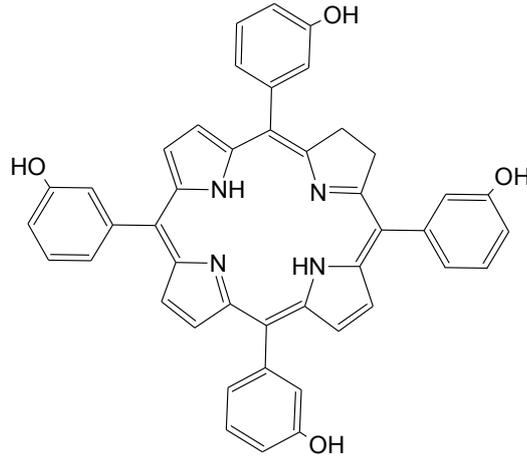


Figure 10 : Molécule de meta-tétra hydroxyphényle chlorine

(2) Les phthalocyanines

Les phthalocyanines sont des porphyrines synthétiques avec un coefficient d'extinction (absorption maximale) entre 675 et 700 nm [Pass, 1993b]. Ils peuvent être chélatés par un grand nombre de métaux, principalement l'aluminium et le zinc. La présence de ces complexes diamagnétiques améliore semble t-il la phototoxicité [Buskard & Wilson 1994b]. L'activité de la drogue dépend du degré d'agrégation (le plus agrégé est le moins efficace) et de la localisation subcellulaire [Van lier & Spikes, 1989].

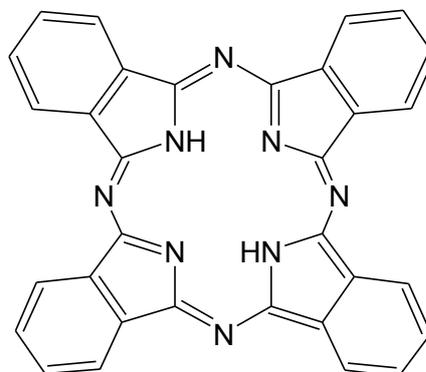


Figure 11 : Phthalocyanine

(3) Les texaphyrines

La plus connue et la plus utilisée des dérivés des texaphyrines est la lutétium texaphyrine (Lu-Tex). C'est un nouveau photosensibilisant absorbant dans le proche infra-rouge [Kostenich *et al.*, 1997]. C'est un photosensibilisant pur, soluble dans l'eau, avec une large bande d'absorption centrée sur 732 nm [Young *et al.*, 1996].

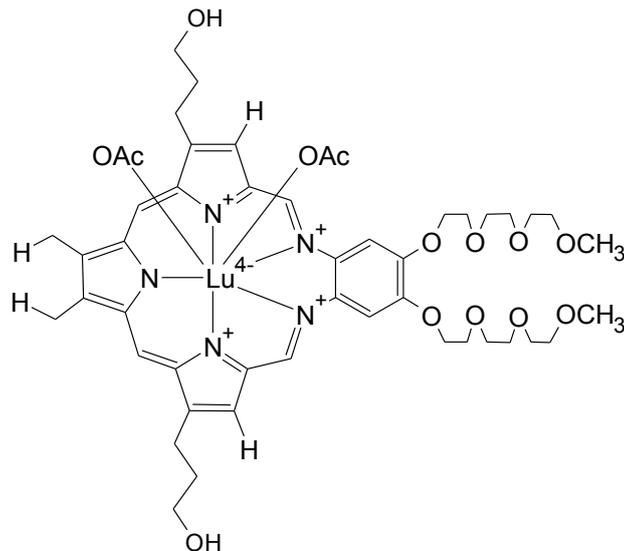


Figure 12 : Lutétium texaphyrine

(4) L'acide delta-aminolévulinique (ALA)

Au cours des cinq dernières années, l'ALA-PDT est devenu l'un des aspects incontournables de la recherche en PDT [Peng *et al.*, 1997a]. L'ALA n'est pas une drogue photosensibilisante en elle-même, mais un précurseur de photosensibilisant endogène.

En effet, la synthèse d'ALA constitue la première étape de la biosynthèse de l'hème, l'avant dernière étape étant la formation de protoporphyrine IX (PpIX), un photosensibilisant efficace. La dernière étape, la formation de l'hème, correspond à l'incorporation de fer dans la PpIX et se déroule dans la mitochondrie sous l'action d'une enzyme, la ferrochélatase. L'addition d'ALA exogène permet une accumulation de PpIX grâce à la capacité limitée de cette enzyme à la transformer en hème et donc une formation endogène du sensibilisant, la PpIX [Peng *et al.*, 1997b].

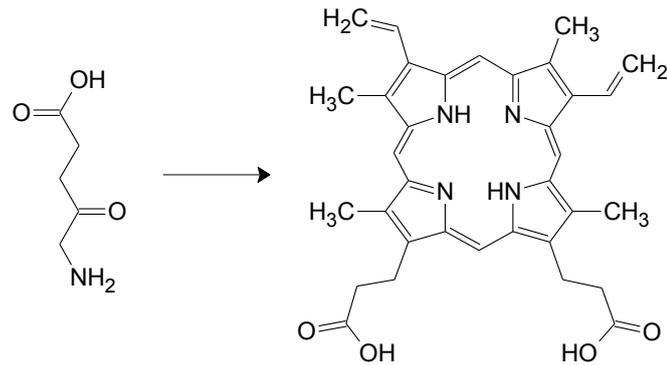


Figure 13 : Molécule d'acide δ - aminolévulinique (ALA) et de protoporphyrine IX (PpIX)

Biosynthèse de l'hème et régulation

L'hème, un pigment tétrapyrrolique contenant du fer, est un constituant de l'hémoglobine 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. 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).

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

L'enzyme suivante, l'ALA déshydratase (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 al.*, 1978]. L'enzyme décarboxyle et oxyde les chaînes propioniques d'anneaux A et B en groupes vinyles et la protoporphyrinogène IX est formée.

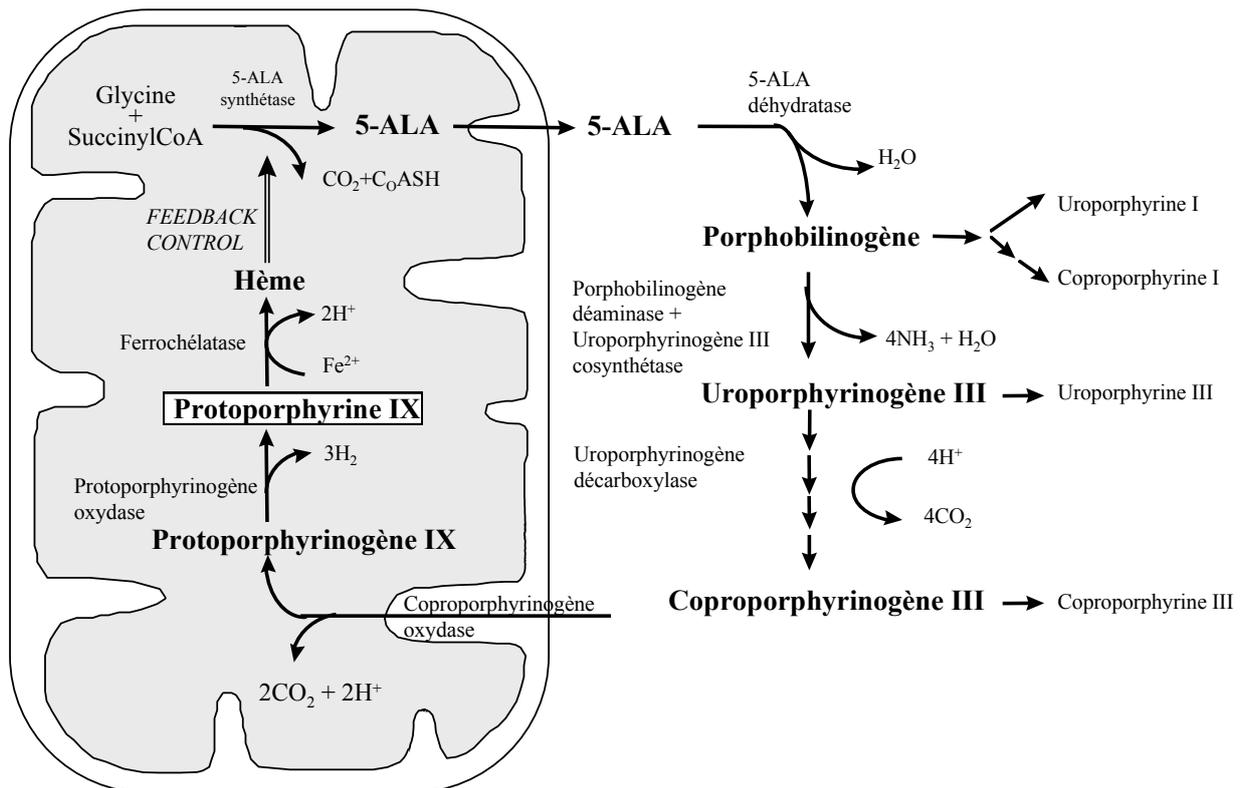


Figure 14 : Biosynthèse de l'hème

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 al.*, 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 [Diwu & Lown, 1994a].

I. 2.-2. Les photosensibilisants non porphyriniques

a) quinones

Les quinones sont obtenues de source naturelle ou par synthèse chimique.

(1) anthraquinones

Les anthraquinones (Figure) sont largement utilisées comme colorants, antibiotiques, capteurs d'énergie solaire et photosensibilisants. Elles 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 intermoléculaire, le solvant, la concentration...

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

(2) 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 composé d'un pic principal et d'un épaulement.

Elles sont des générateurs efficaces d'oxygène singulet avec un rendement comparable à celui des porphyrines.

(3) Hypericine

L'hypericine (Figure 17) est connue comme agent photodynamique depuis une trentaine d'années [Rose & Wagner, 1965], mais c'est récemment que son utilisation anticancéreuse et antivirale a été étudiée [Hudson *et al.*, 1991] [Hudson & Towers, 1991].

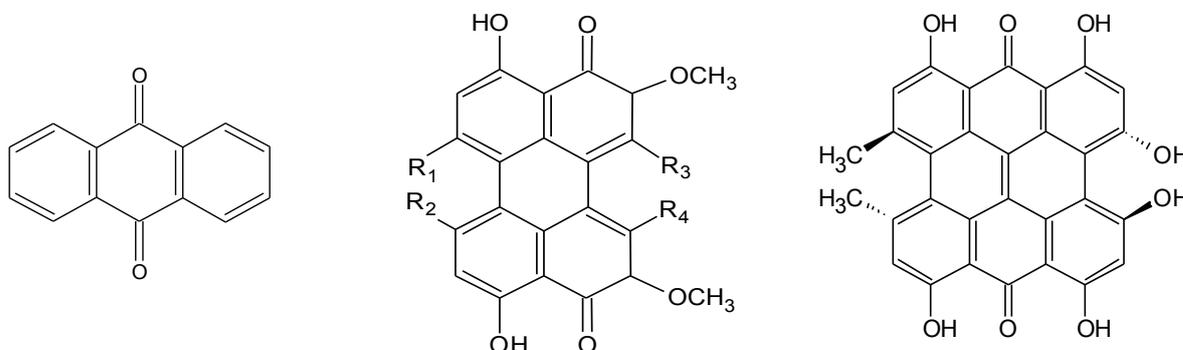


Figure 15 : Anthraquinone

Figure 16 : Perylenequinone

Figure 17 : Hypericine

b) xanthène

Les colorants xanthène peuvent être divisés en deux groupes principaux : les dérivés diphenylméthane (appelés pyronines) et les dérivés triphenylméthane (principalement les phthaléines). Les phthaléines peuvent également être divisées en

fluorescéine (groupe hydroxy), les rhodamines (groupe amino) et les composés mixtes (hydroxy et amino).

Parmi elles, les fluorescéines et rhodamines sont de bons sensibilisants et colorants biologiques.

(1) Fluorescéine

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

(2) Rhodamine

Les rhodamines sont utilisées comme colorants pour les lasers et comme agents photothérapeutiques potentiels. La plus importante est la rhodamine 123 (Figure), elle possède un maximum d'absorption à 500 nm avec un épaulement à 475 nm. Son émission de fluorescence maximum se situe à environ 530 nm avec un rendement quantique de fluorescence important (de 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.

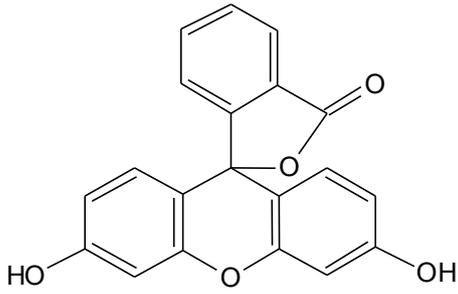


Figure 18 : Molécule de fluorescéine

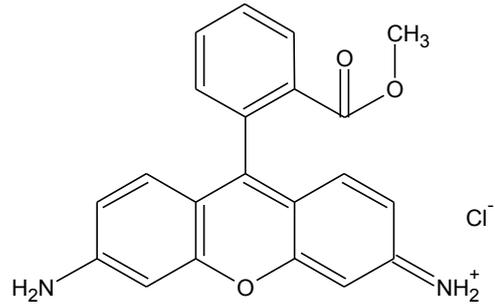


Figure19: Molécule de rhodamine 123

c) cyanines

A l'origine, les cyanines ont été développées pour les émulsions photographiques. Depuis le milieu des années 70, leur potentiel comme agent diagnostique et photothérapeutique a été reconnu. C'est leur grande affinité pour les cellules cancéreuses qui explique leur intérêt dans la PDT des tumeurs.

(1) 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.

Son rapport thérapeutique est relativement important par comparaison avec d'autres agents comme l'HPD. Cependant son absorption aux courtes longueurs d'ondes limite ses applications aux tumeurs superficielles, ou aux applications *in vitro* de la PDT (purge de moelle).

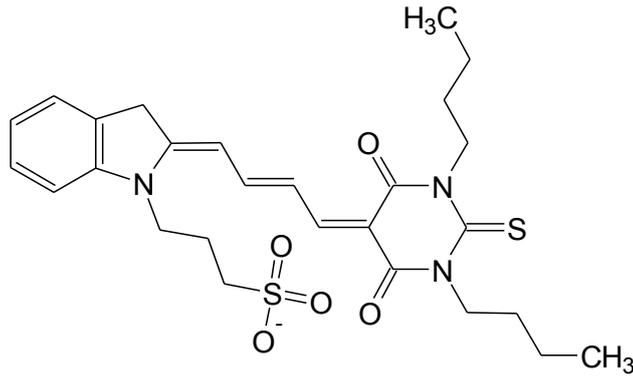


Figure 20 : Molécule de mérocyanine 540

(2) Autres

A la différence de la MC540, la plupart des cyanines utilisées en PDT sont des composés qui pénètrent plus facilement la membrane et avec une charge positive délocalisée.

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

d) Colorants cationiques

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

1.3. Les réactions photochimiques

La cytotoxicité par PDT est principalement liée à deux réactions photooxydatives (Figure).

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 [Pass, 1993c].

1.3.-1. Type I

Depuis les années 1940, il est connu que les radicaux libres jouent un rôle dominant dans l'action entraînée par les radiations ionisantes. En 1968, Gollnick a postulé que l'effet anti-tumoral de la PDT peut être initié par des réactions radicalaires [Gollnick, 1968].

Dans le processus de type I, les sensibilisants excités interagissent directement avec le substrat et/ou les molécules du solvant pour produire des espèces radicalaires dans l'atome d'hydrogène et/ou des réactions de transfert d'électrons. La majorité de ces radicaux réagissent instantanément avec l'oxygène et génèrent une variété d'intermédiaires de l'oxygène hautement réactifs, comme l' $\cdot\text{O}_2$, l' H_2O_2 et l' $\cdot\text{OH}$, c'est à dire des composés connus pour oxyder une variété de biomolécules [Ochsner, 1997(2)] [Bulkley, 1994]. En général les structures moléculaires qui sont rapidement oxydées (phénols, amines...) ou réduites (quinones...), facilitent la chimie de type I. Les radicaux

toxicologiquement appropriés sont principalement formés d'alcools endogènes ou d'acides aminés avec des chaînes externes riches en électrons [Foote, 1981].

En général la réaction photochimique de type I est favorisée en conditions anaérobies, alors que les fortes concentrations en O₂ peuvent forcer une réaction de type radicalaire 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.-2. Type II

Weishaupt a postulé en 1976 [Weishaupt *et al.*, 1976a] que l'interaction de photosensibilisants à l'état triplet excité pouvait interagir avec l'oxygène moléculaire et générer de l'oxygène singulet (¹O₂), une forme toxique de l'oxygène.

La plus commune des réactions de type II implique le transfert de l'excitation du photosensibilisant vers l'oxygène, pour produire un état excité électronique de l'oxygène (¹O₂), pouvant réagir avec des accepteurs variables en solution. Cette réaction est très rapide et est la plus répandue dans le phénomène de désactivation de l'état triplet. Moins efficacement, le photosensibilisant peut aussi transférer un électron à l'oxygène, produisant ainsi une molécule de photosensibilisant oxydée et un ion superoxyde (O₂^{-*}). 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 [Foote, 1976].

L'interaction de l'oxygène singulet avec les cibles intracellulaires entraîne par la suite des dommages aux membranes cellulaires, aux mitochondries, aux lysosomes et aux noyaux, et induit la nécrose tumorale.

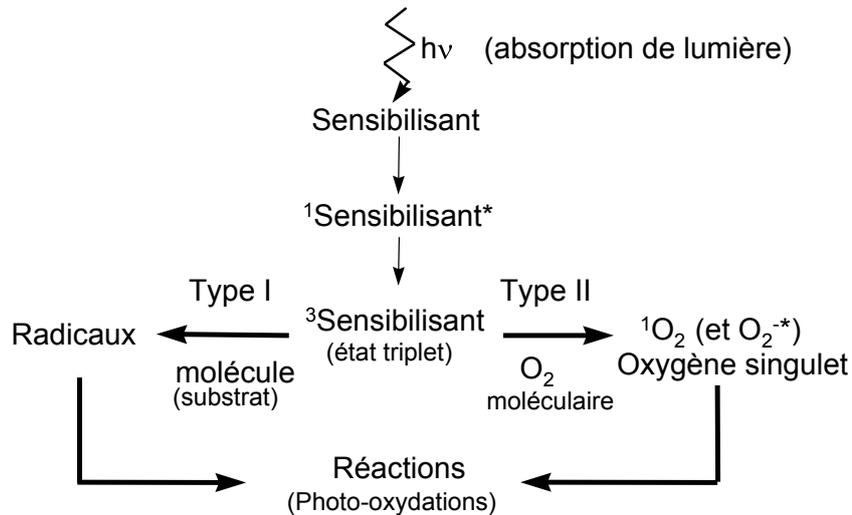


Figure 21 : Réactions photochimiques résultant de l'état triplet du sensibilisant

I. 3.-3. Type III

Un troisième mécanisme existe, il englobe toutes les réactions qui entraînent la photoaltération de biomolécules en l'absence d'oxygène. Cependant ces réactions requièrent un système anaérobie ou une concentration saturante en réactif.

I. 4. Aspects cellulaires de la PDT des cancers

I. 4.-1. PDT et mort cellulaire

La mort cellulaire induite par PDT est un processus complexe impliquant deux mécanismes principaux : l'apoptose et la nécrose [Bourré *et al.*, 2002]. 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 [Kerr & Wyllie, 1972] [Vaux & Korsmeyer, 1999].

L'apoptose est définie par des caractéristiques morphologiques précises comme le rétrécissement du noyau accompagné de la condensation nucléaire et de la boursoflure de la membrane plasmique. L'activation d'endonucléases durant ce processus d'apoptose génère le clivage de la chromatine en fraction oligonucléosomales ou multiples de 180-200 pb [Waring *et al.*, 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, 1981].

Les principales caractéristiques morphologiques de la nécrose sont le gonflement de la cellule puis sa rupture, la perte de 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, 1999a].

I. 4.-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 & Evans, 1998a] [Kessel, 1997]. En effet, généralement les sensibilisants cationiques ont une localisation nucléaire et mitochondriale, les sensibilisants lipophiles ont une affinité pour les structures membranaires et les sensibilisants solubles dans l'eau sont souvent localisés au niveau des lysosomes. Cependant, il n'y a pas seulement l'aspect coefficient de partition (lipide/eau) qui est important, d'autres facteurs tels que le poids moléculaire et la distribution des charges (symétrique/asymétrique) peuvent influencer la localisation.

Quelquefois, l'irradiation peut mener à une relocalisation du photosensibilisant [Moan *et al.*, 1994]. Le mécanisme d'action est lié à la localisation intracellulaire du photosensibilisant. Ceci est dû au fait que le photoproduit le plus actif $^1\text{O}_2$, à une durée

de vie très courte dans les cellules, moins de 0,05 μ s. Ainsi, $^1\text{O}_2$ diffuse à moins de 0,02 μ m du site de production [Moan & Berg, 1991]. Ceci est sûrement la raison pour laquelle le traitement PDT a un potentiel génotoxique si faible, la majorité des photosensibilisants utilisés en PDT étant localisés à l'extérieur du noyau. Le rendement quantique de photoinactivation des cellules varie suivant les sensibilisants. Les sensibilisants lipophiles ayant généralement un rendement quantique plus important que ceux solubles dans l'eau [Villanueva *et al.*, 1993a].

Le traitement PDT affecte aussi largement la division cellulaire [Berg *et al.*, 1990]. Ceci est probablement dû aux dommages des microtubules principalement, contribuant ainsi significativement à la mortalité cellulaire induit par la PDT.

Activité sur les organites cellulaires

- *Les mitochondries* : elles subissent une inactivation des divers constituants de la chaîne respiratoire (cytochrome C, 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 (boursouffure superficielle), chimique et fonctionnelle (par exemple, altération des systèmes de transport d'ions) [Masson, 1999b].

- *Les acides nucléiques* : il a été reconnu que la PDT pouvait être génotoxique et endommager les acides nucléiques [Villanueva *et al.*, 1993b] [Boegheim *et al.*, 1987]. 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, des pertes de fragments d'ADN, des associations avec des protéines ou la condensation de chromatine ont été observés.

- *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 & Evans, 1998b] [Grebenova *et al.*, 2000].

- *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 [Stockert *et al.*, 1996] [Winkelman *et al.*, 1993].

- *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 [Girotti, 2001].

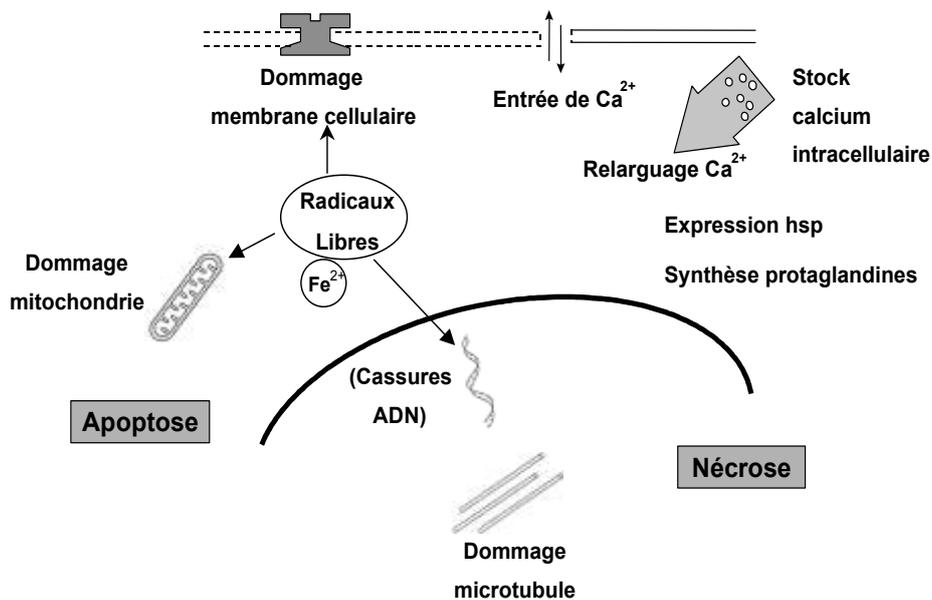


Figure 22 : cibles des espèces oxydantes produites par PDT

I. 5. Les applications cliniques

I. 5.-1. Les applications en Cancérologie

-Les applications diagnostiques

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 diagnostique ou per-opératoire (résection de tumeur assistée par fluorescence). Le Levulan[®] est actuellement en essais cliniques pour ces 2 applications : photodétection du cancer de la vessie et analyse tumorale topographique pendant la résection de tumeurs malignes du cerveau.

Il sera donc possible de détecter des cancers infra-cliniques de la vessie en endoscopie. En plus, le neurochirurgien aura la possibilité de détruire le tissu tumoral aussi complètement que possible pendant l'intervention. Ainsi le pronostic des tumeurs malignes du cerveau pourrait être amélioré (actuellement 11 mois de médiane de survie entre le diagnostic et le décès).

- Les applications thérapeutiques

Le Photofrin[®] 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'œsophage et du poumon, en Allemagne pour le cancer précoce du poumon, au Japon pour les cancers précoces du poumon, de l'œsophage, les cancers gastriques et les cancers ORL, et aux Etats Unis pour le cancer avancé de l'œsophage [Diwu & Lown, 1994b].

D'autres études avec le Photofrin[®] sont en cours pour des traitements curatifs (cancer de l'œsophage 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[®]) est en phase finale de mise sur le marché aux USA pour le traitement premier des cancers ORL et est autorisé à la vente 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 essai 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 l'Annexe 1.

Les indications en France sont très restrictives par rapport aux USA et au reste de l'Europe et 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.

1. 5.-2. Les applications non anticancéreuses

- La DMLA

Il s'agit d'une altération du fond d'œil 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 la partie la plus importante du champ de vision 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 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™, mise au point par les laboratoires Ciba Vision en collaboration avec la société QLT (Vancouver, Canada) spécialisée en laser pour PT, 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.

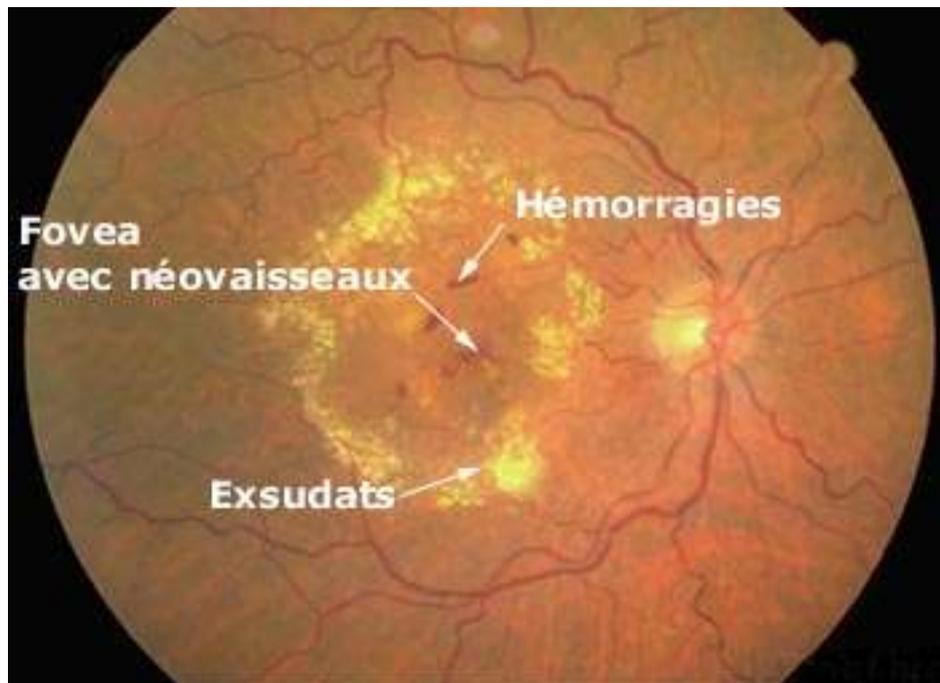


Figure 23 : Forme exsudative de DMLA accessible au laser

- Les kératoses actiniques

Les kératoses actiniques sont un état précancéreux causé habituellement par une exposition solaire, leur évolution maligne en carcinome malpighien apparaissant 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 de race blanche sur deux a

un épithélioma cutané à 50 ans. Si le pronostic est généralement favorable, l'incidence économique est cependant majeure.

Le levulan® 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.



Figure 24 : Aspect d'une kératose actinique

II Lumière et fluorescence

Dans les études sur la photochimiothérapie, la lumière tient une place primordiale. Comprendre les modifications au sein de la matière entraînées par l'absorption de lumière va nous permettre d'expliquer comment la lumière réagit avec le photosensibilisant pour, d'une part, induire des substances toxiques et d'autre part émettre de la fluorescence permettant d'en faire la photodétection. Ces notions nous permettront également de comprendre les principes du fonctionnement d'une source laser.

II.1. La lumière

II.1.-1. Nature de la lumière

C'est au cours du siècle dernier, que nous avons appris ce qu'était la lumière, les états excités et les radicaux formés par l'interaction de la lumière avec les molécules. La lumière correspond à la portion visible du spectre électromagnétique, c'est à dire les longueurs d'onde comprises entre 400 nm (violet) et 780 nm (rouge).

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 et à la fréquence 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.

II. 1.-2. Transitions électroniques

Si nous considérons un atome possédant seulement deux niveaux d'énergie, un niveau de haute énergie (E_1), et un niveau de basse énergie (E_0), nous retrouverons à l'état fondamental, la majorité des atomes N_0 dans le niveau E_0 .

L'apport d'énergie $h\nu$ (photon) égale à $E_1 - E_0$ à l'atome permet une transition électronique et donc le passage d'un électron de E_0 sur E_1 appelée absorption. Ce phénomène d'absorption de photons peut apparaître grâce à un apport d'énergie, qui peut être d'origine cinétique (chauffage, bombardement par des particules, etc...) ou d'origine électromagnétique.

Seul le niveau de plus basse énergie, c'est à dire l'état fondamental, est stable. Après un certain temps, l'électron de l'orbite supérieure finit donc par "retomber" spontanément à l'état fondamental et restituer alors une énergie parfois sous forme d'un photon de fréquence $h\nu = E_1 - E_0$ émis dans une direction quelconque. C'est une émission spontanée, effectuée à une ou plusieurs bandes de fréquence déterminées mais dans une direction et une phase totalement aléatoires.

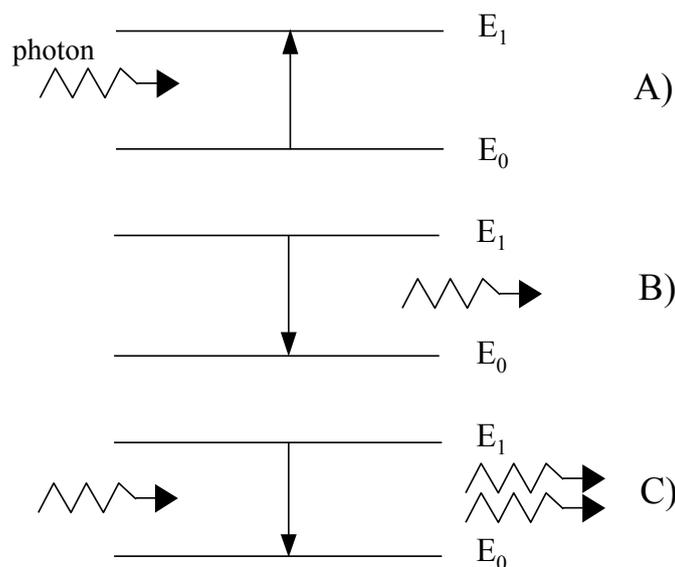


Figure 1 : Processus A) d'absorption, B) d'émission spontanée et C) d'émission stimulée.

En 1917, pour satisfaire à des formules qu'il avait établies, Einstein a supposé qu'à l'émission spontanée venait s'ajouter une émission induite (ou stimulée) car elle est provoquée par l'énergie électromagnétique dans la cavité, c'est à dire qu'un photon interagissant avec une particule peut stimuler l'émission d'un deuxième photon.

Les photons émis par émission stimulée sont en phase avec les photons d'excitation, se propagent dans la même direction, ont la même polarisation et la même énergie. Ainsi l'émission stimulée est une source de lumière cohérente. Cette propriété très remarquable fait que rien ne permet, après la transition induite, de distinguer l'onde induite de l'onde inductrice, puisque tous les paramètres qui les définissent (fréquence, phase, polarisation, etc...) sont identiques. L'émission stimulée est à la base du fonctionnement d'un LASER.

Après absorption lumineuse, une molécule peut être le siège de nombreuses transitions énergétiques. Certaines substances ont la propriété, après l'absorption d'énergie lumineuse, d'émettre dans toutes les directions de l'espace des radiations lumineuses dont la longueur d'onde, caractéristique de la substance, est différente de celle de la lumière excitatrice (plus courte). De tels phénomènes sont connus sous le nom de photoluminescence, terme qui regroupe la fluorescence et la phosphorescence [Hamon, 1990].

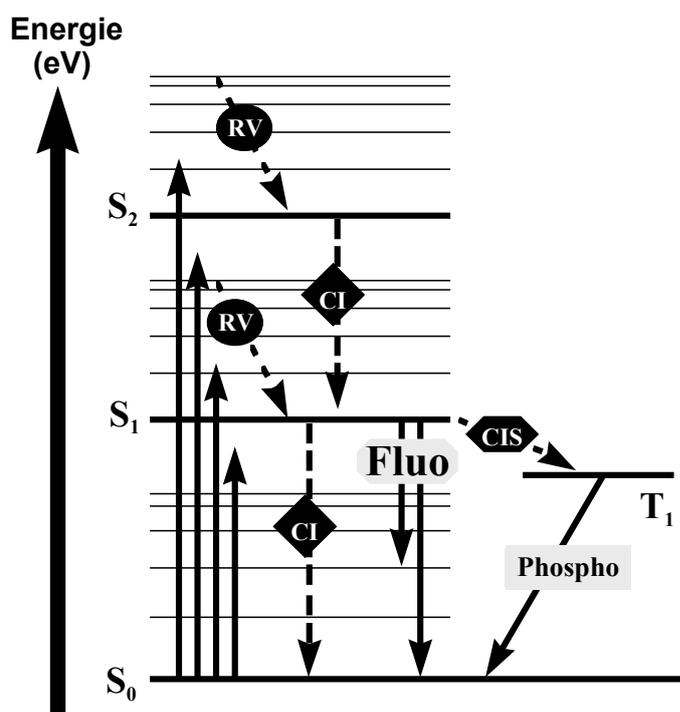


Figure 2 : Diagramme de Jablonski d'un photosensibilisant (anthracène)

S : état singulet,
T : état triplet,
RV : rotation vibrationnelle,
CI : conversion interne,
CIS : conversion intersystème,
fluor : fluorescence,
phospho : phosphorescence

A ces phénomènes de fluorescence s'ajoutent de nombreux processus de désactivation permettant le retour d'une molécule excitée à son état fondamental. Ceux-ci sont schématisés dans le diagramme de Jablonski, représentant ici l'ensemble des transitions énergétiques au sein de la molécule d'anthracène (photosensibilisant) (Figure 26).

II . 2. Emission 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 [Harris & Bashford, 1988] [Hecht, 1987].

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, donnent une fluorescence dans le domaine du visible.

L'observation des spectres de fluorescence se fait non pas dans la direction du faisceau lumineux excitateur, mais dans une direction perpendiculaire. La durée de vie de l'état singulet excité étant de 10^{-9} à 10^{-7} secondes, la durée de décroissance de l'émission de fluorescence sera du même ordre de grandeur. Si la fluorescence n'est pas

perturbée par des processus compétitifs, le temps de vie de fluorescence correspond au temps de vie intrinsèque de l'état excité aussi appelé temps de vie "naturel".

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.

L'intensité de la lumière émise par un échantillon est fonction de l'intensité de la lumière excitatrice et de la concentration de l'échantillon. Le rayonnement d'intensité I_0 ayant une incidence normale vis-à-vis de l'échantillon, l'intensité absorbée par une solution est donnée par la loi de Beer-Lambert :

$$dI/I_0 = -kc \, dl \quad \text{avec} \quad dl : \text{l'épaisseur traversée par le rayon incident}$$

$c : \text{la concentration molaire}$

On peut déduire, après intégration que l'énergie de fluorescence (lumière émise) est théoriquement inférieure à l'énergie d'excitation (loi de Stokes).

L'efficacité d'une molécule fluorescente est déterminée par son rendement quantique. C'est le rapport entre le nombre total de photons émis par fluorescence et le nombre total de photons absorbés initialement. Il est noté Φ . Dans le cas de molécules très fluorescentes, Φ est proche de 1 (par exemple la fluorescéine en milieu sodique : $\Phi=0,85$).

Il faut noter que l'environnement de la molécule peut fortement modifier son intensité de fluorescence. De nombreux phénomènes peuvent entraîner une inhibition plus ou moins importante de la fluorescence. Ils peuvent être classés en deux catégories, les phénomènes internes ou les phénomènes externes appelés aussi par leur terme anglais "Quenching". L'extinction de fluorescence est due à une influence physique ou chimique qui inhibe l'intensité de l'émission de fluorescence. Plusieurs processus peuvent être considérés :

- La molécule du fluorophore à l'état fondamental peut réagir avec une autre espèce moléculaire pour former un complexe dont le rendement quantique de fluorescence est faible ou nul.
- La molécule fluorescente excitée peut retrouver son état fondamental en interagissant avec une molécule inhibitrice proche, c'est à dire en lui transférant son énergie d'excitation.
- Les molécules d'un fluorophore en trop grande concentration peuvent absorber les radiations émises par leurs voisines.

II . 3. La relaxation vibrationnelle

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} secondes.

II . 4. La conversion interne

Ce phénomène consiste en une désactivation non radiative de l'état excité vers l'état fondamental. Toute l'énergie d'activation est transformée en chaleur. Ce processus est très rapide, de l'ordre de 10^{-12} secondes.

II . 5. Conversion intersystème

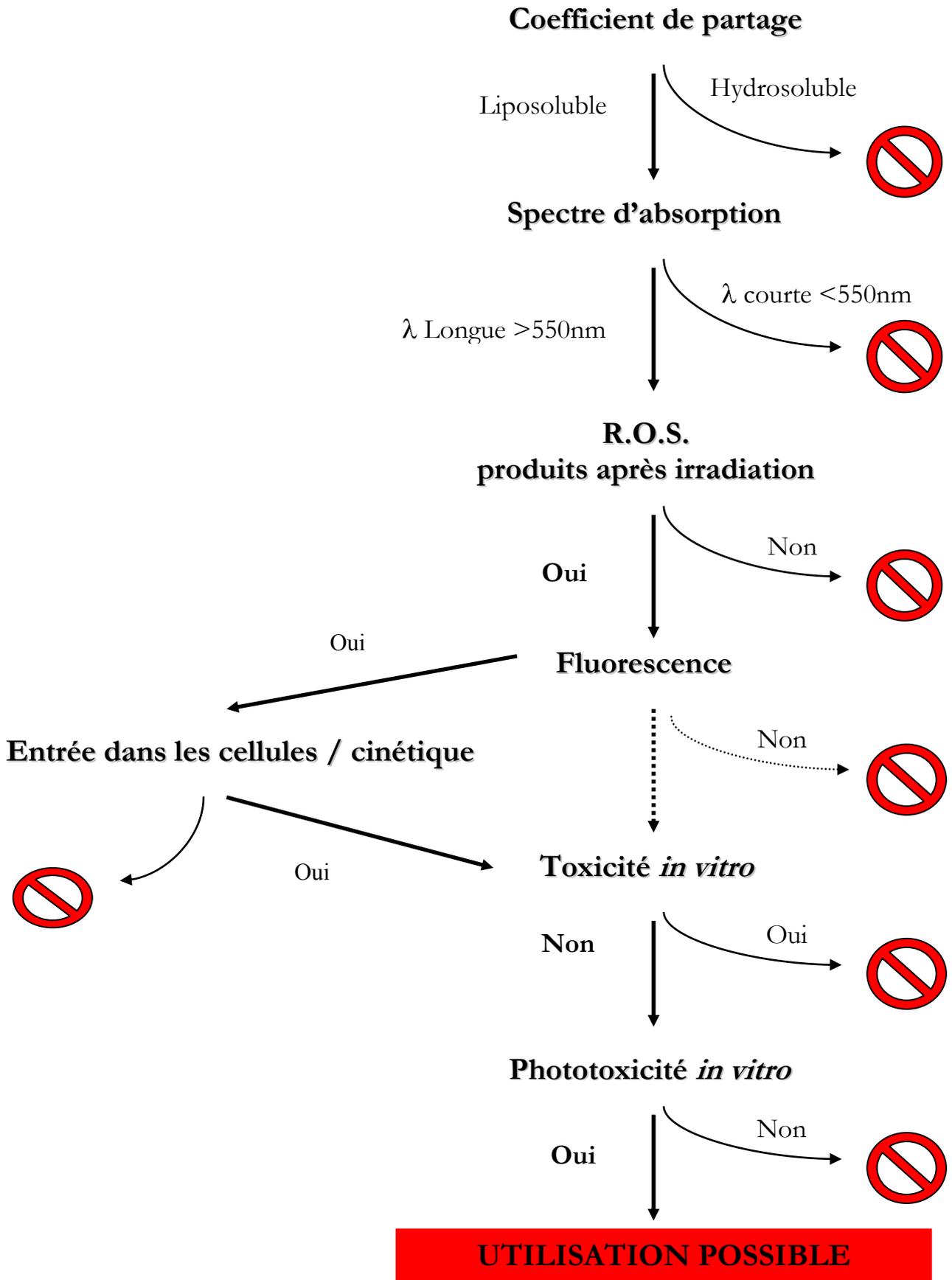
Bien que le passage à un état triplet soit peu probable par absorption directe d'énergie à partir de l'état fondamental, il existe un processus très efficace pour peupler un état triplet à partir de l'état singulet excité de moindre énergie. La durée de vie de ce processus appelé croisement intersystème dépendra de celle de l'état singulet excité 10^{-8} secondes. 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.

II . 6. Phosphorescence

Il y a un passage de la molécule par un état triplet métastable intermédiaire entre l'état excité et l'état fondamental. La transition radiative alors observée entre l'état triplet et l'état fondamental est connue sous le terme phosphorescence. Sa longueur d'onde est plus grande qu'en fluorescence et sa durée de vie plus longue [Kamoun *et al.*, 1997]. Elle a un temps de décroissance dépendant de la durée de vie de cet état (10^{-4} à 10^{-5} s), ceci explique que le phénomène d'émission de lumière persiste après excitation, ce qui n'est pas le cas de la fluorescence [Curie, 1946].

MATERIEL ET METHODES

Algorithme de screening des produits photosensibilisants



I Matériel

I. 1. Les photosensibilisants : Les indirubines

Les indirubines sont des composés très pigmentés dérivés de la dimérisation de l'isatine et de l'indoxyle, deux précurseurs retrouvés libres ou conjugués aux carbohydrates dans des végétaux producteurs d'indigo. Ces végétaux ont constitués la principale source de colorant bleu pendant des milliers d'années [Cooksey, 2001a].

Les indirubines marines sont contenues dans le pigment violet obtenu à partir des familles de mollusques marins les Muricidés et les Thaisidés [Mc Govern & Michel, 1985b].



Figure 27 : *Murex trunculus*, mollusque de la famille des Muricidés.

Le pigment n'existe pas tel quel dans le mollusque mais y est généré à partir de précurseurs, souvent appelés chromogènes, par une série de réactions enzymatiques et chimiques impliquant la lumière et l'oxygène. La composition du pigment dépend de l'espèce de mollusque utilisée et des conditions dans lesquelles il est produit. Le composant majeur du Rose Tyrien est le 6,6'-dibromoindigo avec un peu de 6-bromoindigo, excepté pour certains extraits de *Murex trunculus* qui contiennent surtout de l'indigo [Cooksey, 2001b].

Dans cette étude nous avons étudié les indirubines pour leurs propriétés photodynamiques. Vingt-neuf indirubines ont été synthétisées, leurs structures sont décrites Annexe 2.

Les indirubines 1 à 18 ont été synthétisées comme il est décrit par Ferandin et al [Ferandin *et al.*, 2006b].

Les indirubines 20 et 22 comme il est décrit par Ribas et al [Ribas *et al.*, 2006a], L'indirubine 19 comme il est décrit par Leclerc et al [Leclerc *et al.*, 2001b], l'indirubine 21 comme il est décrit par Polychonopoulos et al [Polychonopoulos *et al.*, 2004].

Les effets sur CDK5/p25 et GSK-3/ β ont été évalués ailleurs [Ferandin *et al.*, 2006c] [Ribas *et al.*, 2006b].

Les indirubines sont dissoutes dans une solution toute prête de DMSO (Diméthylsulfoxyde) à 10mM, puis conservées à -20°C . Des dilutions supplémentaires sont effectuées extemporanément dans l'eau et en tenant compte de la masse molaire respective de chacun des composés, les concentrations finales sont de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

C'est à cette concentration que sont effectuées les mesures pour l'obtention des spectres d'absorption et de fluorescence ainsi que les analyses de production de ROS.

Pour les essais sur cultures cellulaires, on utilise des concentrations de 1 à 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

La stabilité des indirubines a aussi été étudiée en milieu protéique, pour cela on utilise le FCS (Sérum de Veau Fœtal) à 10% (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). La dilution dans l'eau avec le FCS n'est pas optimale au regard de la formation d'agrégats cependant, c'est la seule dilution correspondant aux conditions utilisées lors des analyses sur les cellules : si un agrégat apparaît, il est probable qu'il apparaîtrait aussi *in vivo*. Ainsi, étudier ces indirubines dans une solution de sérum est un moyen aisé pour sélectionner directement celles qui seront biodisponibles.

I. 2. Les kinases

Les réactifs biochimiques : Ortho-vanadate de sodium, EGTA, EDTA, Mops, β -glycerophosphate, henylphosphate, sodium fluoride, DTT (dithiothreitol), glutathione-agarose, glutathione, BSA (bovine serum albumin), nitrophenylphosphate, leupeptine, aprotinine, pepstatine, soybean trypsin inhibitor, benzamidine, histone H1 (type III-S) sont obtenus chez Sigma Chemicals.

Le [γ - ^{33}P]-ATP est obtenu chez Amersham.

Le peptide GS-1 (YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQSpEDEEE) a été synthétisé par l'unité de synthèse de peptides, Institut de sciences biomoléculaire, Université de Southampton, Southampton SO16 7PX, U.K.

Le cocktail inhibiteur de protéases provient de Roche (Neuilly sur Seine France).

Le sérum de veau foetal (FCS) provient de chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Les réactifs qui n'ont pas été cités, proviennent de Sigma (Saint Quentin, France).

- Tampon A

10 mM de MgCl_2 , 1 mM d'EGTA, 1 mM de DTT, 25 mM de Tris-HCl pH 7.5, 50 μg d'heparine/mL.

- Tampon C

60 mM de β -glycerophosphate, 15 mM de p-nitrophenylphosphate, 25 mM de Mops (pH 7.2), 5 mM d'EGTA, 15 mM de MgCl_2 , 1 mM de DTT, 1 mM de vanadate de sodium, 1 mM de phenylphosphate, 10 μg de leupeptine/mL, 10 μg d'aprotinine/mL, et 100 μM de benzamidine.

La protéine CDK5/p25 a été reconstituée en mélangeant des quantités égales de CDK5 recombinant de mammifères et de p25 exprimés chez E.Coli comme des protéines de fusion Glucathion-S-transférase (GST). Elle a ensuite été purifiée par chromatographie d'affinité sur glucathion-agarose (Vecteurs généreusement fournis par Dr. L.H. Tsai). p25 est une version tronquée de p35, l'activateur CDK5 de 35kDa.

GSK-3 α/β a été purifié à partir de cerveau de porc par chromatographie d'affinité. La protéine a été analysée, suivant une dilution dans 1 mg de BSA par mL de DTT 10 mM, avec 5 μ L de substrat de peptide 4 μ M, dans le tampon A, en présence de 15 μ M [γ -³³P]ATP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/mL) dans un volume final de 30 μ L. Après trente minutes d'incubation à 30°C, 25 μ L de liquide surnageant sont traités comme décrit plus haut.

I. 3. Les modèles cellulaires

I. 3.-1. F98

Pour les études de mort cellulaire à court terme, le modèle cellulaire utilisé est la lignée cellulaire F98 de gliome de rat (CRL 2397) obtenue chez l'ATTC (American Type Culture Collection Rockville, MD). Ces cellules sont autorisées à croître en confluence sur 25 cm² dans des flasques de culture de tissus avec 6,5 mL de RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 médium (Cambrex, France) ne contenant pas de rouge phénol et supplémenté avec 10% de FCS, 2 mM de L-glutamine, 50 U/mL de pénicilline et 50 mg/mL de streptomycine.

Les cellules se sont multipliées dans une atmosphère saturée en CO₂ à 37°C, elles sont adhérentes au support de culture. Pour maintenir les cellules dans une phase de croissance exponentielle, elles sont sous-cultivées trois fois par semaine. Les cellules sont dispersées après un contact de 5 min avec une solution à 0,025% de trypsine dans 0,02% d'EDTA (Ethylène-diamine-tetra-acetic-acid) puis réimplantées diluées au tiers.

Nous avons choisi la lignée cellulaire F98 car elle est à la fois chimio- et radio-résistante et donne préférentiellement des tumeurs solides quand elle est greffée dans les cerveaux de rats [Barth, 1998a]. L'utilisation de modèle de même origine cellulaire permet une meilleure comparaison entre les résultats *in vitro* et *in vivo*.

I. 3.-2. SH-SY5Y

Pour les études de mort cellulaire à long terme et les analyses sur les kinases, une lignée cellulaire de neuroblastome humain SH-SY5Y a été cultivée dans du DMEM (Biowhittaker) supplémenté avec de la L-glutamine médium 2 mM (Eurobio, Courtaboeuf, France) obtenue chez Invitrogen (Cergy Pontoise, France), des antibiotiques et 10% en volume de FCS (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). Les conditions générales de culture étant une atmosphère de 5 %en CO₂ et une température de 37°C.

I. 3.-3. HCT116

La lignée cellulaire HCT116 d'adénocarcinome humain a été généreusement fournie par Dr. B. Vogelstein (Howard Hughes Medical Institute, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, The Johns Hopkins School of Medicine, Baltimore, MD 21231, USA).

Les cellules HCT116 ont été cultivées dans du Mc Coy's 5A (Biowhittaker) additionné d'antibiotiques et de 10% de FCS. Les conditions générales de culture étant une atmosphère de 5 %en CO₂ et une température de 37°C.

Le matériel de culture et les autres ustensiles en plastique ont été fournis par Corning (Corning, NY, USA).

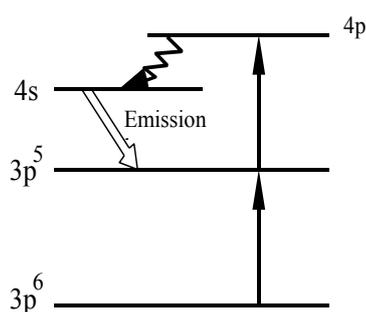
Les substances étudiées ont été testées sur des cultures en croissance exponentielle aux temps et concentrations indiqués. Des tests de contrôle ont aussi été réalisés en utilisant des dilutions appropriées de DMSO.

I. 4. Appareillage

I. 4.-1. Les lasers

Les lasers (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation) ou oscillateurs de lumière nécessitent un milieu actif qui peut amplifier la lumière. Ce dernier est placé entre deux miroirs se faisant face, ces miroirs constituant la cavité optique. La lumière, spontanément émise puis réfléchié maintes fois au travers du milieu laser, s'amplifie à chaque passage par émission stimulée [Orszag & Hepner, 1980]. Grâce à un miroir semi-transparent à la sortie de la cavité, nous pouvons récupérer le faisceau laser.

Le laser à argon peut osciller simultanément à plusieurs fréquences avec des puissances de sortie différentes comme l'indique le tableau ci-dessous. Nous avons utilisé la longueur d'onde 488 nm d'un laser argon Innova 70 (Cohérent SA) comme source excitatrice de fluorescence.



Longueur d'onde en nm	Puissance de sortie en mW
514,5	3200
501,7	300
496,5	1100
488,0	3000
476,5	1100
472,7	50
465,7	30
457,9	600
454,5	10

Figure 28 : Modèle d'excitation du laser ionique

Tableau 2 : Longueurs d'onde et puissance de sortie du laser à argon.

I. 4.-2. Le spectrophotomètre d'absorption

Le spectrophotomètre double faisceau Techcomp® 8500 UV/VIS (Bioblock Scientific, France) couvre une bande spectrale de 190 à 1100 nm grâce à un monochromateur holographique alimenté par une lampe tungstène-halogène et une lampe deutérium.

Le spectrophotomètre d'absorption permet de réaliser des analyses photométriques qualitative et quantitative dans les régions de l'ultraviolet et du visible par l'obtention de spectres d'absorption des photosensibilisants dans différents solvants.

L'obtention des spectres d'absorption permet entre autres de déterminer les longueurs d'onde où la molécule est théoriquement la plus excitable. Elle permet aussi d'observer d'éventuelles modifications spectrales dans les différents solvants rendant compte de la stabilité du produit.

I. 4.-3. Le spectrofluorimètre à cuve

Le spectrofluorimètre utilisé est un Varian® Cary Eclipse. La longueur d'onde d'excitation est sélectionnée par un monochromateur à partir d'une lampe à Xénon 150 W avec stabilisateur d'arc.

L'émission de fluorescence est détectée par un photomultiplicateur après passage dans un monochromateur.

Le voltage PMT est toujours réglé sur fort (« high »).

I. 4.-4. Le photomètre d'absorption

Opsys MR (Dynex Technologies, USA) est un photomètre d'absorption 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). La lumière excitatrice provenant d'une lampe halogène au tungstène traverse verticalement le puits contenant la solution pour finalement atteindre le détecteur.

II Méthodes

Tous ces essais sont utilisés en routine dans notre laboratoire et ont été décrits ailleurs [Bourré *et al.*, 2003].

II . 1. Spectrophotométrie d'absorption et stabilité en solution

Les spectres d'absorption sont obtenus sur une plage de longueurs d'onde allant de 400 à 600 nm. Les solutions d'indirubines utilisées ont une concentration finale de 10 µg/ml.

Tous les spectres d'absorption sont enregistrés de la solution toute prête de DMSO, avec addition de FCS extemporanée ou après 24h (10% de FCS sur la concentration finale), jusqu'à la concentration finale de 10 µg/mL.

L'étude de la stabilité est réalisée en fonction du temps à une température de 30°C.

L'effet du FCS a été analysé et par l'expérience nous avons appris qu'il peut parfois modifier significativement l'absorption ou la fluorescence.

II . 2. Spectrofluorimétrie

Les spectres de fluorescence sont réalisés sur une plage de longueurs d'onde allant de 550 à 850 nm en utilisant une lumière excitatrice à 485 nm.

Malgré leurs coefficients d'extinction molaire très différents, toutes les indirubines en solution à la concentration de 10µg/ml, ont ensuite été irradiées à la longueur d'onde de leur maximum d'absorption avec une densité énergétique de 20 J/cm² pour les essais de production de ROS. La production de ROS estimée par la fluorescence de l'acide

aminophtalique (Luminol oxydé) variant de 219 à 0 (0 signifiant que le composé n'est pas photoréactif.).

II. 3. Détermination des ROS

Nous avons utilisé une méthode chimique de dosage des ROS produits pendant l'irradiation utilisant le luminol comme révélateur. J'ai participé à l'optimisation de cette méthode avec le chercheur INSERM du laboratoire.

La solution du composé testé a été diluée dans l'eau avec 10% de FCS pour obtenir une concentration finale de 10 µg/mL. Le Luminol 3-Aminophtalhydrazide (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) a été dissout dans un tampon phosphate 0,1 M à pH 12,4 pour une concentration finale de 0,5 mg/mL. Cette solution est conservée dans le noir à 30°C et utilisée dans la journée. Un millilitre de cette solution de Luminol est ajouté dans une cuve de spectrofluorimètre d'un centimètre de côté qui contient les solutions des composés à tester (décrites plus haut). Puis ces cuves sont exposées à une densité énergétique de 20J/cm² avec une lumière de longueur d'onde le maximum du spectre d'absorption, ce qui induit une production de ROS par les composés testés.

Une cuve témoin contenant 500 µL de la solution testée et 1 mL de solution de Luminol est conservée dans le noir. Une seconde cuve témoin est préparée avec seulement 500 µL de solvant, 10% de FCS et 1 mL de solution de Luminol puis irradiée.

Les ROS produits oxydent le Luminol en acide aminophtalique fluorescent (pic à 485 nm). Les spectres de fluorescence des solutions contenant les composés, du FCS et/ou du Luminol sont enregistrés avec un spectrofluorimètre Varian® Cary Eclipse qui nous permet d'évaluer immédiatement le niveau de fluorescence de 4 cuves simultanément avec une température contrôlée à 30°C (Varian® Cary PCP 150 Peltier Device). L'excitation de l'acide aminophtalique a été notée à 395 nm et la fluorescence enregistrée à 485 nm 15 minutes après l'irradiation.

La valeur du test de production de ROS avec Luminol est la différence entre la fluorescence de l'acide aminophtalique de la cuve irradiée et sa fluorescence dans la cuve témoin qui ne contient pas le produit testé. Cependant, une faible photoréactivité a pu être observée dans la cuve témoin, elle serait due à la présence de petits amas de résidus de porphyrine dans le sérum utilisé pour la culture cellulaire.

Meilleure est la valeur au test de production de ROS avec Luminol, meilleure est la réactivité du produit. Une valeur de 0 au test de production de ROS correspond à une absence d'activité : la photoréactivité de la solution qui contient à la fois le composé testé et le sérum devient alors la même que celle de la solution contenant le sérum seul.

II. 4. Détermination de la toxicité et de la phototoxicité et mort cellulaire à court terme

II. 4.-1. Implantation et incubation

Les cellules F98 contenues dans un flacon de culture sont lavées avec 3 ml de tampon phosphate salin (PBS), décollées chimiquement par l'utilisation de trypsine EDTR (1 ml) puis lavées dans du milieu de culture (2 centrifugations 1500 tours/min, 10 min). Les cellules sont comptées avec un hémocytomètre puis réparties à 10^5 cellules/mL de RPMI 1640 médium sans rouge phénol avec 10% de FCS dans des plaques de 96 puits stériles à fonds plats. Quatre puits par condition sont prévus.

Vingt quatre heures après les cellules sont mélangées aux solutions d'indirubines dans le but d'atteindre les concentrations finales de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 $\mu\text{g/mL}$ en accord avec les expériences effectuées.

Les cellules sont incubées pendant un temps standard de 2h. Quand une toxicité cellulaire a été observée, des délais supplémentaires entre l'addition du composé et les mesures ont été testés.

II. 4.-2. Irradiation

Après un lavage léger et une réimplantation de la culture, les cellules sont irradiées avec un laser coloré (pompe à argon) émettant au maximum d'absorption de chaque composé mesuré en présence de FCS. Le faisceau du laser est focalisé dans une fibre optique en silice-silicone de 400 μm de cœur 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 (500 mW) est calibrée avec un mesureur de puissance (Coherent, France), et le temps d'exposition est ajusté pour obtenir une densité énergétique de 20 J/cm².

II. 4.-3. 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 déshydrogénases mitochondriales présentes dans les cellules vivantes. Vingt quatre heures après la fin du traitement photodynamique, la culture médium est déplacée et réimplantée avec 100 μL de RPMI médium sans FCS et 15 μl de MTT en solution (5 mg/ml) dans du PBS (Phosphate buffered saline). Après une incubation de quatre heures (37°C, 5% de CO₂), une solution de lyse à base de isopropanol acide (150 μL de 0,04 de N HCl dans l'isopropanol) a été ajoutée selon la méthode décrite par Mossmann et al [Mosmann, 1983].

Après l'homogénéisation de chacun des puits obtenue par sonification, un photomètre Opsys MR (Dynex Technologies, USA) 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.

Les résultats de phototoxicité sont exprimés en pourcentage de viabilité des cellules traitées par rapport aux cellules témoins. Les cellules témoins (100 %) étant les cellules sans photosensibilisant (incubées avec le solvant seul) et non irradiées. Tous les résultats sont reportés au moyen de trois expériences distinctes. Quatre ensembles de données ont été enregistrés pour chaque condition dans chaque expérience.

Tous les composés ont été testés pour leur toxicité cellulaire à court terme et leur phototoxicité sur les cellules F98.

Excepté pour l'irradiation, les analyses de toxicité à court terme sont effectuées exactement dans les mêmes conditions que celles de phototoxicité, sur la même solution de cellules.

Il est nécessaire de connaître la part de mort cellulaire qui est induite seulement par un effet photodynamique. Cette toxicité a été mise en évidence en comparant les témoins non traités aux cellules traitées pour toute la gamme de concentrations testées.

II . 5. Analyse de protéines kinases et mort cellulaire à long terme

II . 5.-1. Méthodes d'analyse des activités anti-kinases

Nous avons testé l'effet inhibiteur de kinases des indirubines et l'inhibition de croissance correspondante.

Les activités des kinases ont été analysées dans le tampon A ou C, à 30°C à une concentration finale d'ATP de 15 μ M. Les valeurs des « blancs » sont déduites et les activités calculées en fonction des pico-moles de phosphate ajoutées pour une incubation de 10 min. [Activité = nombre de pico-moles ajoutées.].

Les valeurs d'activité sont habituellement exprimées en pourcentage de l'activité maximale c'est-à-dire l'activité en absence d'inhibiteurs. Les contrôles sont effectués avec des dilutions appropriées de diméthylsulfoxyde.

L'activité kinase a été analysée dans le tampon C avec 1 mg d'histone H1 par mL, en présence de 15 μ M [γ -³³P] ATP (3000 Ci/mmol, 10mCi/mL) dans un volume final de 30 μ L. Après 30 min d'incubation à 30°C, 25 μ L de liquide surnageant ont été déposées sur des fragments de 2,5 x 3 cm de papier de phosphocellulose Whatman P81. Vingt secondes plus tard, les filtres ont été lavés 5 fois (pendant au moins 5 minutes à chaque fois) dans une solution de 10 mL d'acide phosphorique dans un litre d'eau. Les filtres mouillés ont été dénombrés en présence de 1 mL de fluide de scintillation ACS (Amersham).

II . 5.-2. Mesure de la viabilité cellulaire à long terme

La viabilité cellulaire a été déterminée en mesurant la réduction du MTS [3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5- (3-carboxymethoxyphenyl)-2- (4-sulfohenyl)-2H – tetrazolium] comme il a été décrit précédemment en détail [Eldar-Finkelman, 2002a].

II . 6. Expression des résultats

Tous les résultats sont la moyenne d'au moins 3 expériences séparées et pour chaque expérience, 4 données ont été enregistrées pour chaque condition expérimentale.

RESULTATS

I Spectrophotométrie d'absorption et stabilité en solution

Les spectres d'absorption ont été mesurés pour tous les composés et ont été résumés dans le Tableau 3. L'absorption est typique des indirubines et s'échelonne entre 420 et 600 nm avec un maximum entre 481 et 535 nm à l'exception de IND 23 absorbant à 560 nm.

Composé	Poids moléculaire (g/mol)	Absorption				Stabilité après 24h dans le FCS	
		Sans FCS		Après addition de FCS		Absorption résiduelle (%)	Remarque
		λ (nm)	Abs (OD)	λFCS (nm)	Abs FCS (OD)		
IND 1	489,35	514	0,81	538	0.53 (65.43%)	0.5 (94.61%)	Shift +24nm Nveau pic 580 nm
IND 2	452,90	525	0,12	522	0.12 (100%)	0.07 (56%)	
IND 3	505,35	522	0,33	522	0.34 (103.0%)	0.34 (98.81%)	
IND 4	468,90	531	0,1	531	0.11 (110%)	0.09 (84.5%)	
IND 5	499,83	512	0,48	518	0.41 (85.41%)	0.04 (100.91%)	
IND 6	466,90	518	0,09	520	0.1 (111.11%)	0.10 (98.71%)	Nveau pic 573 nm
IND 7	519,35	521	0,54	521	0.56 (103.70%)	0.53 (95.38%)	Shift +6nm Nveau pic 566nm
IND 8	482,90	519	0,31	519	0.36 (116.13%)	0.30 (83.66%)	Nveau pic, Nouveau max 533 nm
IND 9	486,35	517	0,34	535	0.36 (105.88%)	0.34 (94.54%)	Shift +5 nm
IND 10	500,35	485	0,15	481	0.17 (113.33%)	0.15 (89%)	
IND 11	449,90	535	0,49	537	0.2 (40.81%)	0.19 (94.75%)	
IND 12	463,90	485	0,1	485	0.09 (90%)	0.07 (78.39%)	
IND 13	539,80	510	0,6	525	0.43 (71.67%)	0.38 (89.3%)	
IND 14	466,90	513	0,46	518	0.39 (84.78%)	0.36 (92.78%)	
IND 15	463,35	513	0,67	526	0.57 (85.07%)	0.50 (87.88%)	Shift +8nm
IND 16	477,35	513	0,32	517	0.3 (93.75%)	0.27 (89.60%)	
IND 17	426,90	535	0,55	535 Nveau pic 582	0.52 (94.54%)	0.05 (101.18%)	
IND 18	440,90	524	0,07	524 Nveau pic 578	0.09 (128.57%)	0.07 (83.85%)	
IND 19	453,33	521	0,096	525	0.13 (135.42%)	0.17 (90.00%)	
IND 20	489,78	516	0,075	522	0.085 (113.33%)	0.06 (70%)	
IND 21	556,45	481	0,063	488	0.061 (96.82%)	0.05 (87%)	
IND 22	629,38	513	0,092	490	0.049 (53.26%)	0.04 (90%)	
IND 23	490,51	560	0,051	580	0.059 (115.69%)	0.04 (65%)	
IND 24	355,90	511	0,129	514	0.069 (53.49%)	0.06 (88%)	
IND 25	355,90	509	0,254	496 Nveau pic 694	0.3733 (146.97%)	0.36 (95.39%)	
IND 26	355,90	508	0,237	505	0.032 (13.50%)	0.003 (109%)	
IND 27	277,00	504	0,156	506	0.215 (137.82%)	0.21 (98.22%)	
IND 28	280,00	501	0,253	503	0.108 (42.69%)	0.01 (100.81%)	Shit +23nm
IND 29	506,00	502	0,248	524	0.063 (25.40%)	0.06 (95.93%)	

Tableau 3 : Résumé des valeurs d'absorption et de stabilité des indirubines étudiées

Les spectres d'absorption de douze indirubines montrent des changements majeurs quand ils sont analysés en présence de FCS (10% de la concentration finale), que ce soit immédiatement ou après 24h. Les changements consistent en déplacements de plus de 5 nm vers des longueurs d'onde plus longue (c'est-à-dire vers le rouge), en décroissances de plus de 15% de l'intensité d'absorption et, seulement en apparence, un nouveau pic après 24h (Figure 35) pour IND 1 (580 nm), IND 13 (533 nm), IND 12 (566 nm), IND 27 (571 nm), IND 11 (573 nm), IND 22 (582nm) et IND 6 (694nm) suggérant que ces composés réagiraient préférentiellement avec un ou plusieurs composés présents dans le FCS.

Ce point est d'une grande importance pour les étapes suivantes de nos expériences.

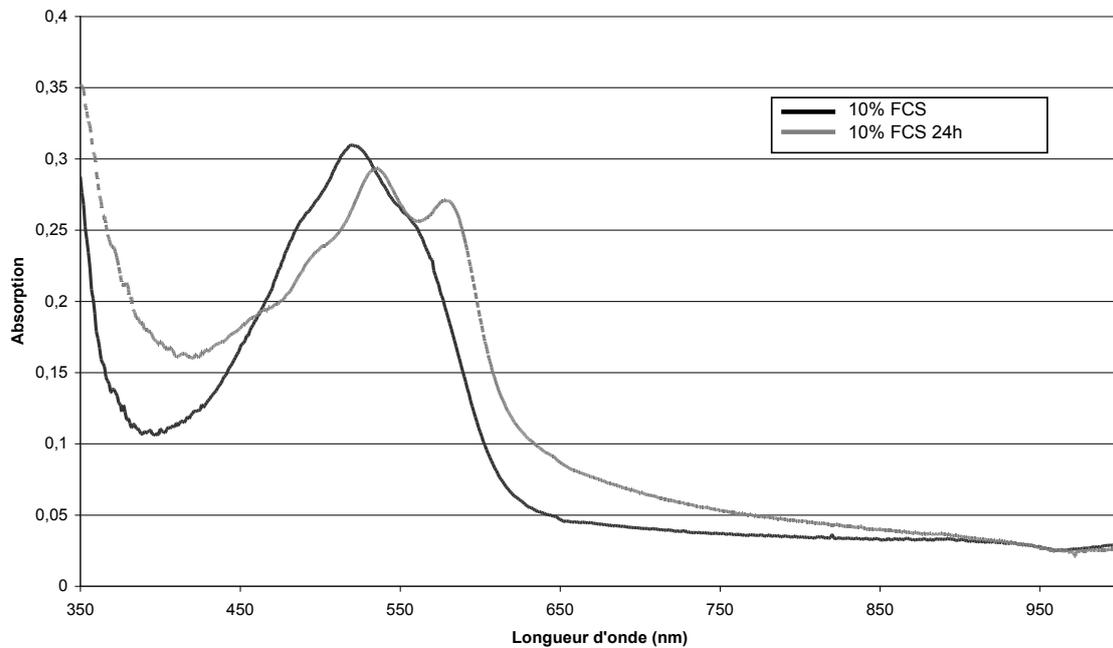


Figure 29 : Spectre d'absorption général des indirubines

II Fluorescence et production de ROS

Le spectre de fluorescence (Figure 29) a montré un pic principal plus ou moins étendu conduisant dans certains cas à un plateau, où deux pics séparés ont pu être identifiés.

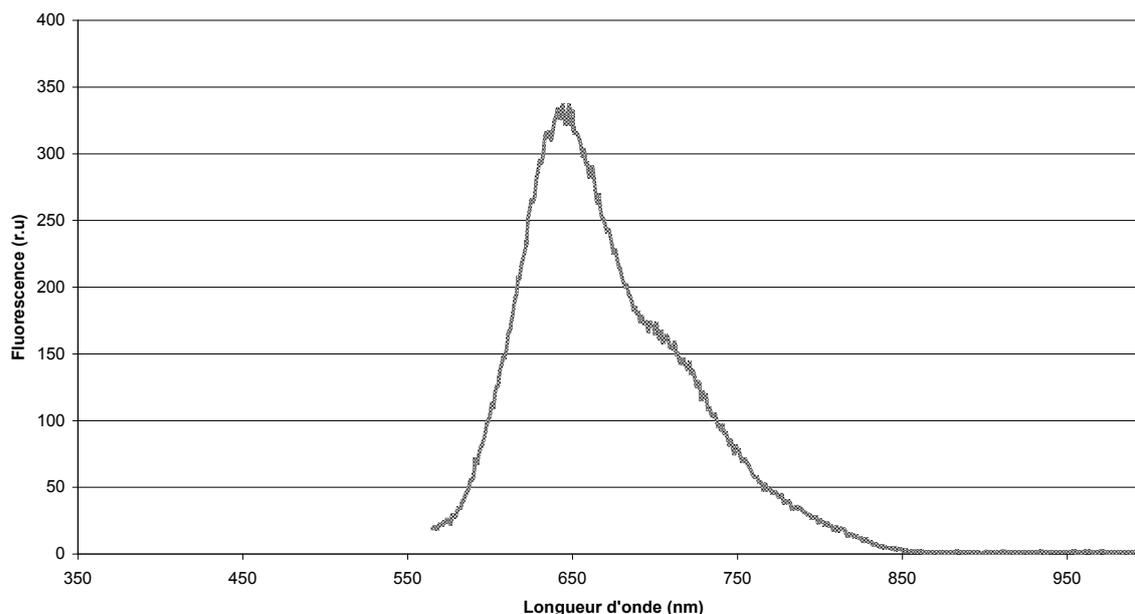


Figure 29 : Spectre de fluorescence général des indirubines étudiées

Onze composés sur vingt-neuf n'ont pas montré de fluorescence (IND 3, IND 5, IND 6, IND 12, IND 13, IND 14, IND 15, IND 26, IND 27, IND 28, IND 29). D'autres composés ont été trouvés seulement faiblement fluorescents, les rendant impossible à détecter directement.

Des changements dans les spectres de fluorescence ont été notés quand les enregistrements sont effectués en présence de FCS. Ces changements consistent en une intensité de fluorescence augmentant ou diminuant, accompagnée ou non d'un déplacement à la longueur d'onde de leur maximum de fluorescence (Tableau 4). Cependant, la forme générale du spectre de fluorescence ne change pas après l'addition de FCS. Habituellement, le spectre de fluorescence reflète le spectre d'absorption mais l'analyse de la forme du spectre de fluorescence a révélé que le nombre de pics

d'absorption ne correspondait pas au nombre de pics de fluorescence (n=6, spectre non montré), il en est de même que ce soit avant ou après l'addition de FCS.

Composé	Poids moléculaire (g/mol)	Fluorescence			
		Avant ajout de FCS		Après ajout de FCS	
		λ (nm)	Fluo (A.U.)	λFCS	Fluo FCS
IND 1	489,35	613	10	644	336
IND 2	452,90	675	187	630	187
		(+630)	(525 nm)	(+675)	(522 nm)
IND 3	505,35	679	281	672	274
IND 4	468,90	409	112	624	84
IND 5	499,83		0	622	67
IND 6	466,90	618	109	609	245
IND 7	519,35		0		0
IND 8	482,90		0		0
IND 9	486,35		0		0
IND 10	500,35		0		0
IND 11	449,90	646	465		0
IND 12	463,90	624	117	625	136
IND 13	539,80		0	639	228
IND 14	466,90	635	40	630	179
IND 15	463,35	606	177	611	374
IND 16	477,35	618	77	605	214
IND 17	426,90	643	455	639	453
IND 18	440,90	631	225	627	192
IND 19	453,33		0	592	140
			(521 nm)	639	128
IND 20	489,78		0	595	185
IND 21	556,45		0		0
IND 22	629,38		0		0
IND 23	490,51		0		0
IND 24	355,90		0		0
IND 25	355,90		0		0
IND 26	355,90		0	579	288
IND 27	277,00		0	580	107
IND 28	280,00		0		0
IND 29	506,00		0		0

Tableau 4 : Résumé des valeurs de fluorescence des indirubines étudiées

Les composés fluorescents dont la fluorescence croit (n=12) après l'addition de FCS seront observés comme produisant significativement une quantité plus importante de ROS que les composés non fluorescents (71.3 r.u. versus 16 r.u, p< 0.05) (Tableau 5).

III Détermination de la toxicité et de la phototoxicité

Tous les composés, qu'ils produisent des ROS *in vitro* ou non, ont ensuite été testés pour leur toxicité cellulaire à court terme et leur phototoxicité sur les cellules F98.

Nom	Fluorescence (A.U.)		Photoreactivité ROS	Cellules F98 (DL 50, µg/ml)	
	-FCS	+ FCS		Toxicité	Phototoxicité (20J/cm ²)
IND 1	10	336	219	4	2
IND 5	0	67	137	>5	4.5
IND 6	109	245	86	>5	>5
IND 12	117	136	23	>5	>5
IND 13	0	228	27	0.6	0.6
IND 14	40	179	107	1.5	1.5
IND 15	177	374	96	4	2.5
IND 16	77	214	50	2	1.5
IND 19	0	128	65	>5	3.5
IND 20	0	185	46	5	5
IND 27	0	107	0	>5	>5
IND 26	0	288	0	>5	3
Moyenne de la production de ROS			71,3		
Nom	-FCS	+ FCS	ROS	Toxicité	Phototoxicité (20J/cm ²)
IND 2	187	187	39	>5	>5
IND 3	281	274	0	>5	>5
IND 4	112	84	0	>5	>5
IND 11	465	0	70	>5	>5
IND 17	455	453	0	>5	>5
IND 18	225	192	17	>5	4
Moyenne de la production de ROS			21,0		
Nom	Composés non fluorescents		ROS	Toxicité	Phototoxicité (20J/cm ²)
IND 8			8	2	2
IND 9			12	>5	>5
IND 10			19	>5	>5
IND 21			0	>5	>5
IND 22			0	>5	>5
IND 28			0	>5	>5
IND 29			5	>5	>5
IND 24			0	>5	>5
IND 25			0	>5	>5
IND 7			116	>5	>5
IND 23			7	>5	>5
Moyenne de la production de ROS			16,0		

Tableau 5 : Valeurs de production de ROS, de toxicité, de phototoxicité mesurées pour les dérivés d'indirubines

Excepté pour l'irradiation, les analyses de toxicité à court terme sont effectuées exactement dans les mêmes conditions que celles de phototoxicité, sur la même solution de cellules. Il est nécessaire de connaître la mort cellulaire qui est induite seulement par un effet photodynamique. Cette toxicité a été mise en évidence en comparant les témoins non traités aux cellules traitées pour toute la gamme de concentrations testées.

La DL 50 (Dose létale pour 50% des cellules) varie de 0,6 µg/mL à plus de 5 µg/mL. Ainsi, il a été prouvé que les indirubines IND 18 (DL 50 = 0,6 µg/mL) et IND 19 (DL 50 = 1,5 µg/mL) étaient les plus cytotoxiques.

Vingt-trois indirubines sur vingt-neuf ont été trouvées non ou faiblement toxiques avec une valeur de DL 50 avoisinant les 5 µg/mL. Il y a phototoxicité quand l'irradiation lumineuse (adaptée au pic maximum d'absorption) induit une diminution de la survie des cellules significativement différente de celle observée en absence de lumière.

Comme prévu, seuls les composés fluorescents et producteurs de ROS ont été phototoxiques, à l'exception de IND 7 difficile à solubiliser. IND 1 a été l'indirubine la plus phototoxique avec une DL50 de 2 µg/mL, mais d'autres indirubines ont présenté une DL 50 significativement plus basse en présence de lumière (IND 7, IND 10, IND 20, IND 21, IND 23, IND 24).

IV Analyse de l'activité anti-kinases

Les dérivés d'indirubine ont été testés pour leur effet inhibiteur sur les CDK5 et les GSK-3 qui sont des cibles classiques de ces composés. Classés de l'absence d'activité avec une IC 50 forte (IND 3, IND 8, IND 12, IND 13, IND 14, IND 15, IND 16, IND 17) à une bonne activité avec une IC 50 faible (IND 4, IND 5, IND 6, IND 24, IND 25, IND 28, IND 29).

Composé	CDK5/p25 (IC 50 en μ M)	GSK-3 α/β (IC 50 en μ M)	SH-SY5Y (IC 50 en μ M)
IND 1	> 10	3.0	2.0
IND 2	> 10	7	2.3
IND 3	> 100	> 100	> 100
IND 4	0.100	0.022	12.0
IND 5	0.028	0.016	12.0
IND 6	0.083	0.005	9.5
IND 7	33.0	32.0	7.1
IND 8	> 10	> 100	Inactive (10)
IND 9	> 10	0.57	Inactive (10)
IND 10	> 10	> 10	4.0
IND 11	> 10	> 10	5.0
IND 12	> 10	> 10	Inactive (10)
IND 13	> 10	> 10	Inactive (10)
IND 14	> 10	11	Inactive (10)
IND 15	> 10	> 10	Inactive (10)
IND 16	> 10	9	Inactive (10)
IND 17	> 10	> 10	Inactive (10)
IND 18	> 10	> 10	6.0
IND 19	> 10	5	6.2
IND 20	> 10	> 10	1.0
IND 21	> 10	> 10	9.0
IND 22	> 10	8	2.0
IND 23	> 10	> 10	5.5
IND 24	0.15	0.026	5.5
IND 25	0.18	0.054	2.35
IND 26	0.30	0.014	>100
IND 27	0.43	0.033	>100
IND 28	0.041	0.050	9.0
IND 29	0.071	0.069	12.5

Tableau 6 : Activité des indirubines sur les protéines kinases et sur la lignée cellulaire SH-SY5Y de neuroblastome.

De nombreuses indirubines ont été synthétisées pour optimiser cette propriété inhibitrice de kinases. Une substitution par un brome en position 6 donne des composés avec une augmentation de leur selectivité sur GSK-3.

La toxicité sur la lignée cellulaire SH-SY5Y est très variable, et n'a pas pu être clairement corrélée avec l'activité anti-kinase. L'IND 20 a été identifié comme étant le composé le plus toxique, et neuf composés n'ont pas présentés de toxicité dans les conditions de l'expérience.

Il est surprenant d'observer que IND 7 (comparé à IND 4, IND 5 et IND 6) est un très faible inhibiteur de kinases mais est cependant un inducteur de mort cellulaire. C'est pourquoi, il a été décidé d'approfondir en détails les effets de ce composé.

Nous avons comparé les quatre indirubines (IND 4, IND 5 et IND 6 et IND 7) pour leur capacité à induire une mort cellulaire de la lignée de neuroblastome SH-SY5Y mesuré avec le test au MTS. Les résultats montrent que IND 7 donne, en terme de concentration, le meilleur taux de mort cellulaire. Mais son efficacité est sensible à la concentration en sérum, suggérant qu'elle se lierait aux protéines.

IND 22 a une activité inhibitrice marginale sur CDK 5 et GSK-3, elle induit un processus de mort cellulaire rapide, distinct de l'apoptose.

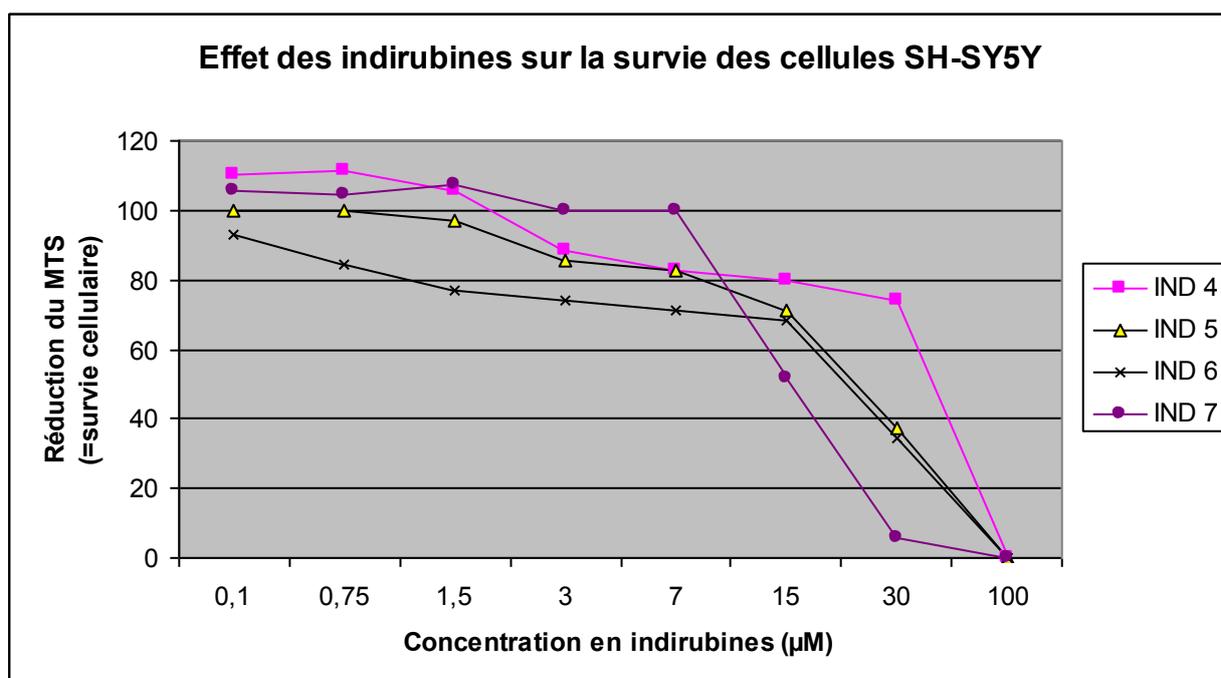


Figure 30 : Effet des indirubines sur la survie des cellules SH-SY5Y

DISCUSSION

Les indirubines ont fait l'objet de beaucoup de modifications chimiques dans le but d'augmenter leur profil de sélectivité, leur effet inhibiteur de kinase et leur solubilité.

En particulier, les modifications ont été effectuées sur les positions 3', 5', 6' sur un cycle indole et 5' ou 6' sur l'autre cycle indole.

Plus récemment, les modifications ont été réalisées en position 7, ce qui aboutit à des composés inactifs sur les kinases capable d'induire une mort cellulaire indépendante des capsases [Ferandin *et al.*, 2006d] [Ribas *et al.*, 2006c].

Comme conséquence de leur potentiel thérapeutique, un assez grand nombre d'analogues d'indirubines a donc été synthétisé et évalué pour diverses activités biologiques.

Parmi les composés testés, les indirubines IND 4, IND 5, IND 6, IND 28 et IND 29 ont montrés une bonne activité sur CDK5 et GSK-3, comme attendu dans l'approche modélisée qui prévoyait l'affinité de ces composés pour la poche du site de fixation de l'ATP.

Puisque la kinase GSK-3 est impliquée dans la mort cellulaire programmée et la tumorigénèse [Eldar-Finkelman, 2002b], l'activité anti-kinase observée avec IND 4, IND 19, IND 20 et IND 21 peut être exploitée dans une stratégie anti-cancéreuse ciblant différents processus du développement tumoral.

Les inhibiteurs nucléosidiques de GSK-3 sont aussi développés comme des médicaments potentiels contre le diabète, l'inflammation et les maladies infectieuses.

Dans la maladie d'Alzheimer, l'aggrégation de la protéine Tau (protéine d'association aux microtubules) est directement reliée à l'hyperphosphorylation de deux enzymes principaux, CDK5/p25 et GSK-3. GSK-3 étant une des enzymes responsables de l'apparition des épitopes spécifiques de la maladie d'Alzheimer dans la protéine Tau.

Les agrégats bêta-amyloïdes induisent une activation de GSK-3 et une apoptose qui peut être prévenue par le lithium [Meijer *et al.*, 2003].

Ces données expliquent pourquoi l'Unité Cycle Cellulaire (CNRS, Station Biologique de Roscoff, France) a commencé une évaluation de ces composés pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

L'association d'activités anti-CDK5 et anti- GSK-3 pourrait être exploitée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, dans laquelle ces deux kinases sont impliquées ainsi que dans d'autres processus pathologiques.

Toutes ces indirubines absorbent aussi fortement la lumière, il donc intéressant d'étudier la photoréactivité potentielle de ces dérivés dans le but d'identifier les dérivés qui auraient un potentiel anti-cancéreux dans le noir sans montrer des effets secondaires indésirables induits par la lumière et ainsi de sélectionner les indirubines ayant une haute photoréactivité pour une utilisation potentielle en photochimiothérapie.

La photochimiothérapie est un procédé thérapeutique relativement nouveau basé sur l'assimilation sélective par les tissus cancéreux de substances productrices de ROS, principalement l'oxygène singulet [Weishaupt *et al.*, 1976b]. Après une exposition lumineuse à une longueur d'onde adaptée correspondant au spectre d'absorption du produit on obtient ainsi la destruction des tissus malades par des processus de peroxydation [Girotti, 1985] [Tanelian *et al.*, 2000]. De nos jours, la photochimiothérapie a été développée pour de nombreuses applications clinique [Biel, 1996] [Kostron *et al.*, 1997] représentant un marché mondial potentiel estimé à 3 billions de dollars US [Patrice *et al.*, 2006]. Comme la photochimiothérapie agit autant sur les cellules cancéreuses que sur les tumeurs vasculaires il a été récemment suggéré d'utiliser des facteurs anti-angiogéniques ou des inhibiteurs de kinases comme adjuvants de la photochimiothérapie.

Beaucoup de molécules cliniquement développées pour la photochimiothérapie ont été brevetées il y a longtemps, il a donc un réel besoin de synthétiser de nouvelles molécules qu'elles soient destinées uniquement aux traitements de photochimiothérapie à de nouveaux concepts de traitements combinés incluant la photochimiothérapie.

Un autre but de notre travail a donc été d'identifier parmi les différents dérivés d'indirubines ceux qui déjà, en absence de lumière, inhibaient significativement la croissance cellulaire et dont l'efficacité augmentait en sa présence. Il fut intéressant de rechercher une relation entre la structure moléculaire et la photoréactivité dans cette série de composés relativement homogènes.

Tous les analogues d'indirubine absorbent la lumière entre 420 et 600 nm, leur maximum d'absorption se situant entre 481 et 535 nm. Ces valeurs sont en accord avec ce qui a été trouvé précédemment [Christie, 2006a] mais il n'a pas été possible d'établir une relation entre la structure chimique et le spectre d'absorption. Par ailleurs, l'addition de FCS induit des changements notables pour IND 1, IND 3, IND 14, IND 18, IND 20, IND 27, IND 29.

Concernant l'apparence de nouveaux pics d'absorption, IND 25, contrairement à IND 1, ne montre pas de nouveau pic après l'addition de FCS, on pourrait donc émettre l'hypothèse que la présence du brome en position 6, plutôt qu'en position 7, modifie l'affinité pour les protéines présentes dans le FCS, de la même façon que l'interaction avec les protéines kinases. Malheureusement le composé IND 27, analogue de IND 25 (brome en position 6) n'est pas disponible.

Le manque de correspondance évidente entre la structure chimique et le spectre d'absorption n'est pas surprenant puisque une telle relation était déjà hypothétique pour les indirubines non bromées [Christie, 2006b].

La fluorescence est faible mais détectable pour 12 composés mais, pour 17 indirubines la fluorescence est indétectable dans les limites de notre appareillage. Des changements de fluorescence ont été notés après addition de FCS : l'apparition de fluorescence pour 5 des 17 indirubines non- fluorescentes sans FCS.

Après l'addition de FCS, l'intensité de la fluorescence augmente pour 12 composés et réduit pour 4 autres, suggérant encore que l'affinité des indirubines pour les substances présentes dans les fluides biologiques est assez forte pour influencer leur physico-chimie. A ce niveau, nous sommes incapables de déterminer les facteurs de la structure chimique qui sont impliqués dans cette sensibilité à la présence de FCS.

Comme il était attendu, à l'exception de IND 12, il a été observé que l'intensité de production de ROS est corrélée à la capacité des composés à produire de la fluorescence. La principale production de ROS est maximale pour les composés donc l'intensité de fluorescence augmente en présence de FCS, et est significativement différente ($p < 0,05$) à la production de ROS par les composés non fluorescents.

Par comparaison avec les autres composés utilisés en routine comme photosensibilisant en photochimiothérapie, les indirubines sont de relativement faibles producteurs de ROS *in vitro* s'échelonnant de 219 (IND 1) à 0 mais le plus souvent entre 50 et 100.

Dans les mêmes conditions expérimentales, les dérivés d'hématoporphyrines affichent une production de ROS de 320 [Patrice & Olivier, résultats non publiés]. Cependant, étant donné l'utilisation potentielle des effets cytotoxiques et photocytotoxiques en association, il paraît intéressant d'étudier davantage la phototoxicité de ces indirubines. Ainsi, une faible phototoxicité pourrait être acceptable si une spécificité forte était mise en évidence.

La cytotoxicité a été évaluée sur la lignée cellulaire de gliome de rat chimio- et radio-résistante F98 [Barth, 1998b] [Ko *et al.*, 1980] [Tom, 2002]. Bien que nos témoins de toxicité (2 heures d'incubation) soient réalisés dans des conditions différentes des études classiques de cytotoxicité (24-48 heures d'incubation) destinées à détecter des inhibitions de croissance cellulaire induites par une activité anti-tyrosine kinase, une inhibition de croissance a été mise en évidence pour sept composés ayant tous un brome en position 7. Même si nous présentons une DL50 à 5 µg/mL, d'autres doses ont été déterminées pour plusieurs composés et les DL50 ont été trouvées proches de celles déjà publiées malgré les différences dans les procédures de traitements cellulaires [Ferandin *et al.*, 2006e] [Ribas *et al.*, 2006d].

Trois composés photoréactifs ont été détectés parmi les indirubines inhibitrices de croissance cellulaire qui sont substituées en 7 par un brome et 4 parmi les composés non-inhibiteurs (c'est à dire IND 23, IND 24 substitué par un brome en 6). Tous les composés phototoxiques excepté un seul (IND 7) sont des producteurs des ROS et sont fluorescents, leur fluorescence est augmentée en présence de FCS pour 6 composés sur 7 (à l'exception de IND 23). Néanmoins, il fut impossible d'identifier un seul critère de structure prédisant la phototoxicité de la molécule.

Par ailleurs, beaucoup d'autres paramètres comme l'assimilation du médicament, la stabilité, les interactions avec les cibles de protéines variées, la distribution intracellulaire, etc..., pourraient influencer la phototoxicité. Les indirubines ont une affinité pour les CDKs et GSK-3, localisées dans des compartiments intracellulaires, l'effet phototoxique pourrait donc être renforcé par la distribution intracellulaire des indirubines. Il fut impossible de corrélérer la phototoxicité et l'activité anti-kinase. Cela veut dire que les variations de phototoxicité ne sont pas dues principalement à la localisation du médicament sur des cibles spécifiques mais à différentes photoréactivités comme prédit par le test de ROS.

Pendant les analyses anti-kinases les artefacts, dus à la photoréactivité, auraient généré une corrélation positive entre le test de phototoxicité et les analyses anti-kinases, ce qui n'est pas le cas ici. Comme la fluorescence des indirubines était plutôt faible, il n'a pas été possible d'analyser la distribution de ces composés à l'intérieur des cellules et entre le noyau et le cytoplasme.

CONCLUSION

Dans cette étude, nous avons détecté les indirubines montrant des propriétés photoréactives notables. Cependant, il est impossible de déduire des caractéristiques d'absorption ou de fluorescence à partir de la structure chimique des dérivés d'indirubines analysés.

Tandis que les indirubines sont intensivement étudiées pour leur potentiel dans les traitements anti-cancéreux, davantage de développement pharmacologique devrait d'abord se focaliser, parmi tous les dérivés synthétisés, sur les dérivés non photoréactifs tels que IND 18, IND 19, et IND 13 inhibant la croissance cellulaire. Il y a plusieurs exemples dans la littérature où les médicaments ont été retirés de la clinique et du marché à cause de leurs effets photoréactifs indésirables. A l'inverse, les indirubines photoréactives apporteraient pourtant beaucoup en utilisation clinique (traitement des désordres hématologiques, de tumeurs solides...) dans un nouveau concept combinant les effets cytotoxiques et phototoxiques de ces molécules.

A cet égard, IND 1, IND 20, IND 21 et IND 10 paraissent être des composés prometteurs affichant les meilleurs ratios de toxicité et de phototoxicité. Des études additionnelles *in vivo* sur des tumeurs cérébrales orthotopiques sont sur le point de vérifier le concept du bénéfice thérapeutique possible des indirubines à la fois cytotoxiques et phototoxiques.

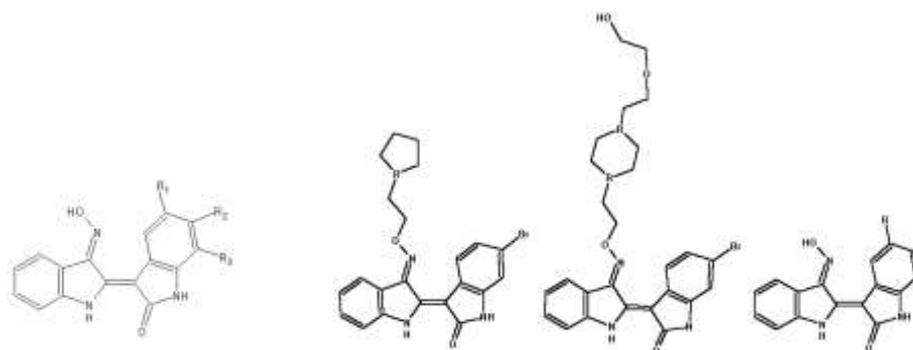
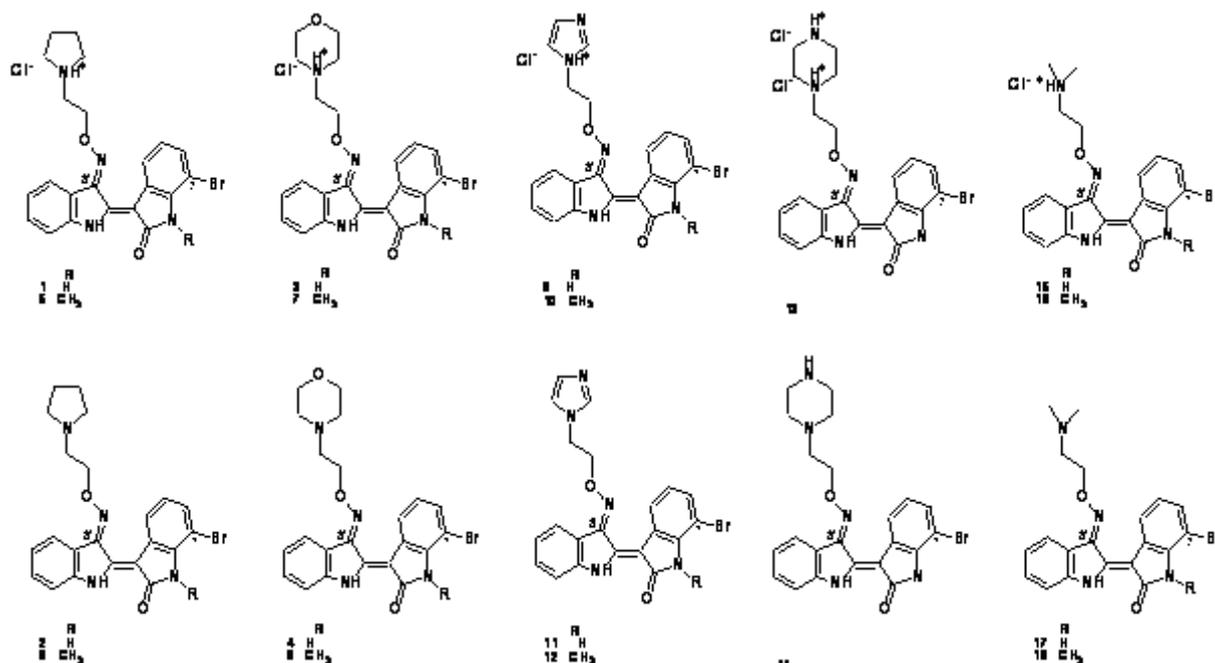
ANNEXES

Composé	Nom	Prod/Marketing	λ max absorption	Phase de développement
Porfimer sodium	Photofrin [®]	QLT pharmaceuticals, Sanofi OPI	630 nm	Approbation FDA France (avril 1996), USA (décembre 1995) rechutes de cancers bronchiques et œsophagiens Essais cliniques cancers bronchiques et œsophagiens, cancers de la vessie
acide 5-aminolévulinique (ALA)	Levulan [®]	DUSA pharmaceuticals Schering AG MEDAC	630 nm	Approbation FDA USA (décembre 1999) kératoses actiniques multiples Essais cliniques I/II: psoriasis, carcinome baso-cellulaire, maladie de Bowen
Benzoporphyrine dérivée monoacide A (BPD-MA) ou Verteporfin	Visudyne [®]	Sanofi, Cibavision	690 nm	Approbation FDA USA (nov 99), France (AMM 2000) DMLA Essais cliniques I/II : agent-anti HIV, cancers cutanés (non mélanotique), affections gynécologiques II: oncologie cutanée III: immunosuppresseur
Méta-tétra hydroxyphényl chlorure (m-THPC)	Foscan [®]	Scotia	652 nm	Essais cliniques, Approbation EMEA 2001 en ORL II: cancers du sein, gastro, pancréas III: cancers laryngés, tête, cou, avec chirurgie et radiothérapie pour cancers avancés
Lutetium-téxaphyrine	Lutrin [®] Antrin [®] Optrin [®]	Pharmacyclics Pharmacyclics Alcon	732 nm	Essais cliniques II: cancer du sein II: athérosclérose II: DMLA
Tin éthylétiopurpurine (SnET ₂)	Purlytin [®]	Pharmacia & Upjohn Miravant,	660 nm	Essais cliniques I/II: cancers cutanés ; II/III: cancer du sein métastasé cutané, carcinome baso-cellulaire, sarcome de Kaposi ; III: dégénérescence maculaire

Zn-phthalocyanine			670 nm	Essais cliniques : I: athérosclérose, maladies dermatologiques (formulation topique), maladies oculaires
Hypericine		Vim Rx Pharmaceuticals		Essais cliniques : I: psoriasis, cancers de la peau, verrues (formulation topique) I/II: agent antiviral hépatite C, HIV/SIDA, gliomes malins
Hypocrellines		Alta Rex Corp	630-700 nm	Préclinique
ATX-S10		Hamamatsu Photonics	672 nm	Préclinique
SQN-400		Scotia	740 nm	Préclinique
Al-phthalocyanine disulphonatée			685 nm	Préclinique
Si-naphthalocyanine		iso BOSINC	776 nm	Préclinique
Bactériopurpurines			800-820 nm	Préclinique
Mono-L-aspartylchlorine e6			664 nm	Préclinique
ALA methyl ester	<i>Metvix</i> <i>Hexvix</i> <i>Benzvix</i>	Photocure	632 nm	Essais cliniques et Approuvé Suède Dermatologie carcinome baso-cellulaire 2001
?	<i>PH-10</i>	Photogen	520-580	Préclinique , Psoriasis
ER-470		Et NBS Ergo Science		Préclinique

Annexe 1 : caractéristiques des principaux photosensibilisants [Ochsner, 1997(1)]

Annexes



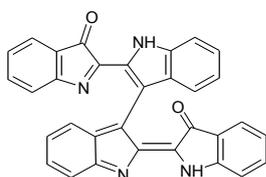
	R1	R2	R3
19	H	H	H
20	Br	H	H
21	H	Br	H
22	H	H	Br

	R
24	N
25	NH ⁺ , Cl ⁻

	R
26	N
27	NH ⁺ , Cl ⁻

	R
28	NH ₂
29	AcNH

23



N°	Composé	N°	Composé
1	IND 1	16	IND 21
2	IND 2	17	IND 22
3	IND 8	18	IND 23
4	IND 9	19	IND 4
5	IND 10	20	IND 5
6	IND 11	21	IND 6
7	IND 12	22	IND 7
8	IND 13	23	IND 3
9	IND 14	24	IND 24
10	IND 15	25	IND 25
11	IND 16	26	IND 26
12	IND 17	27	IND 27
13	IND 18	28	IND 28
14	IND 19	29	IND 29
15	IND 20		

Annexe 2 : Structure chimique des indirubines utilisées dans cette étude

	PDT	Chirurgie	Radiothérapie	Chimiothérapie
Biologie – Soins	581	581	0	0
Traitement	1949	1334	525	Navelbine: 1463/session Novantrone: 1417/session Taxol: 653/session
Hospitalisation	381/Jour 1-5 jours	686/Jour 10-15 Jours	0	656/Jour 3 jours x 4
Equipement (minimum)	38109	76219	381097	15243
Traitement et hospitalisation	3506	8231		15091

Annexe 3: Comparatif des coûts directs de traitements anticancéreux en euros

BIBLIOGRAPHIE

Auler H., Banzer G. (1942), "Investigations on the role of porphyrins in tumour-bearing humans and animals.", *Krebsforsch J.*, 53, 65-68.

Banks J.G., Board R.G., Carter J., Dodge A.D. (1985), "The cytotoxic and photodynamic inactivation of micro-organisms by rose bengal.", *J. Appl. Bacteriol*, 58, 391-400.

Barth R.F. (1998), "Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: The 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 Gliomas.", *J. Neurooncol.*, 36, 91-102.

Berg K., Moan J., Bommer J.C., Winkelman J.W. (1990), "Cellular inhibition of microtubule assembly by photoactivated sulphonated meso-tetraphenylporphines.", *Int. J. Radiat. Biol.*, 58, 475-487.

Biel M.A. (1996), "Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancers.", *J. Clin. Laser. Med. Surg.*, 14, 239-244.

Boegheim J.P.J., Dubbelmann T.M., Mullenders L.H., Van Steveninck J. (1987), "Photodynamic effects of haematoporphyrin derivative on DNA repair in murine L929 fibroblasts.", *Biochem. J.*, 244, 711-715.

Bonnett R., White R.D., Winfield U.J., Berenbaum M.C. (1989), "Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers.", *Biochem. J.*, 261, 277-280.

Bonnett R. (1999), "Photodynamic therapy in historical perspective. In: Reviews in contemporary pharmacotherapy: Photodynamic therapy" (Eds. S. Johnson and F.N. Johnson), p.11, *Marius Press*, Carnforth, UK.

Bourré L., Rousset N., Thibaut S., Eléouet S., Lajat Y., Patrice T. (2002). "PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis.", *Apoptosis* , 7(3), 221-230.

Bourré L., Simonneaux G., Ferrand Y., Thibaut S., Lajat Y., and Patrice T. (2003), "Synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy.", *J. Photochem. Photobiol B: Biol.*, 69, 179-192.

Bulkley G.B. (1994), "Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function.", *Lancet*, 344, 934-936.

Buskard N.A., Wilson B.C. (1994) "Introduction to the symposium on photodynamic therapy.", *Semin. Oncol.*, 21, 1-13.

Byrne C.J., Marshallsay L.V., Ward A.D. (1990) "The composition of Photofrin II.", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 6, 13-27.

Carruths J.A. (1998) "Clinical applications of photodynamic therapy", *Int. J. Clin. Pract.*, 52, 39-42.

Christie R.M. (2006), "Indirubin: the relationship between chemical structure and physical properties, with particular reference to colour.", *Indirubin, the red shade of indigo* (Edited by L. Meijer, N. Guyard, L. A. Skaltsounis, and G. Eisenbrand), 103-188, *Life in Progress*, Roscoff, France.

Cooksey C.J. (2001), "Tyrian purple: 6,6'-Dibromoindigo and related compounds.", *Molecules.*, 6, 736-769.

Curie M. (1946), « Fluorescence et phosphorescence », *Hermann et Cie.*, 66-81.

Damiens E., Baratte B., Marie D., Eisenbrand G., Meijer L. (2001), "Anti-mitotic properties of indirubin-3'-monoxime, a CDK/GSK-3 inhibitor: induction of endoreplication following prophase arrest.", *Oncogene.*, 20, 3786-3797.

Davies C.D., Western A., Lindmo T., Moan J. (1986), "Changes in antigen expression on human FME melanoma cells after exposure to photoactivated hematoporphyrin derivative.", *Cancer Res.*, 46, 6068-6072.

Di Giovanni S., Movsesyan V., Ahmed F., Cernak I., Schinelli S., Stoica B., Faden A.I. (2005), "Cell cycle inhibition provides neuroprotection and reduces glial proliferation and scar formation after traumatic brain injury.", *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 102, 8333-8339.

Dilkes M.G., DeJode M.L., Gardiner Q., Kenyon G.S., Mc Kelvie P. (1995), "Treatment of head and neck cancer with photodynamic therapy: results after one year.", *J. Laryngol. Otol.*, 109, 1072-1076.

Diwu Z., Lown J.W. (1994), "Phototherapeutic potential of alternative photosensitizers to porphyrins.", *Pharmac. Ther.*, 63, 1-35.

Dougherty T.J., Potter W.R., Weishaupt K.R. (1987), "Drugs comprising porphyrins. US Patent.", 4.649.151.

Dougherty T.J. (1974), "Activated dyes as antitumor agents.", *J. Natl. Cancer Inst.*, 52, 1333-1336.

Eldar-Finkelman (2002), "Glycogen synthase kinase 3 : an emerging therapeutic target.", *Trends Mol. Med.*, 8(3), 126-132.

Ferandin Y., Bettayeb K., Kritsanida M., Lozach O., Polychronopoulos P., Magiatis P., Skaltsounis A.L., Meijer L. (2006), "3' substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death -inducing agents.", *J. Med. Chem.*, 49, 4638-4649.

Ferreira G.C., Andrew T.L., Karr S.W., Dailey H.A. (1988) "Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex.", *J. Biol. Chem.*, 263, 3835-3839.

Figge F., Weiland G.S., Manganiello L.O. (1948), "Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins.", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 68, 640-641.

Foote C.S. (1981), "Photooxidation of biological model compounds.", M.A.J. Rodgers and E.L. Powers (eds), *Oxygen and Oxy-Radicals in Chemistry and Biology*, Academic Press, New York, 425-440.

Foote C.S. (1976), "Photosensitized Oxidation and Singlet Oxygen: Consequences in Biological Systems.", *Free Radicals in Biology*, II, 85-133, Edited by W. A. Pryor, Academic Press, New York.

Girotti A.W. (1985), "Mechanism of lipid peroxidation.", *J. Free radicals Biol. Med.*, 1, 87-95.

Girotti A.W. (2001), "Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanisms.", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 63, 103-113.

Goldstein B.D., Harber L.C. (1972), "Erythropoietic protoporphyria : lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis.", *J Clin Inv.*, 51, 892-902.

Gollnick K., Franken T., Founda M.F.R., Paur H.R., Held S. (1992), "Merbromin (mercurochrome) and other xanthene dyes: quantum yields of triplet sensitizer generation and singlet oxygen formation in alcoholic solutions.", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 12, 57-82.

Gollnick K. (1968), "Type II photooxygenation reactions in solution.", *Adv. Photochem.*, 6, 1-122.

Gomer C.J. (1991), "Preclinical examination of first and second generation sensitizers used in photodynamic therapy.", *Photochem. Photobiol.*, 54, 1093-1107.

Grandchamp B., Phung N., Nordmann Y. (1978), "The mitochondrial localization of coproporphyrinogen III oxidase.", *Biochem. J.*, 176, 97-102.

Grebenova D., Halada P., Stulik J., Havlicek V., Hrkal Z. (2000), "Protein changes in HL60 leukemia cells associated with 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Early effects on endoplasmic reticulum chaperones.", *Photochem. Photobiol.*, 72, 16-22.

Gregorie H.B., Horger E.O., Ward J.L., Green J.F., Richards T., Robertson H.C., Stevenson T.B. (1968) "Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms.", *Ann. Surg.*, 167, 820-828.

Hamon M., Pellerin F., Guernet M., Mahusier G. (1990), « Méthodes spectrales et analyse organique. », *Chimie analytique*, Masson, Tome 3, p 134.

Harris D.A., Bashford C.L. (1988), "Spectrophotometry and spectrofluorimetry (a practical approach).", *IRL Press.*, 1-22.

Hausmann W. (1911), "The sensitizing action of haematoporphyrin.", *Biochem. Z.*, 30, 276-316.

Hayata Y., Kato H., Konaka C., Ono J., Takizawa N. (1982), "Hematoporphyrin derivative and laser photoirradiation in the treatment of lung cancer.", *Chest*, 81, 269-277.

Hecht E. (1987), "Optics Second edition. Addison - Wesley Publishing company.", 552-553.

Hoessel R., Leclerc S., Endicott J.A., Nobel M.E., Lawrie A., Tunnah P., Leost M., Damiens E, Marie D., Marko D., Niederberger E., Tang W., Eisenbrand G., Meijer L. (1999), "Indirubin, the active constituent of a Chinese antileukaemia medicine, inhibits cyclin-dependent kinases.", *Nat. Cell. Biol.*, 1, 60-67.

Hudson J.B., Lopez-Bazzocchi I., Towers G.H.N. (1991), "Antiviral activities of hypericin.", *Antiviral Res.*, 15, 101-112.

Hudson J.B., Towers G.H.N. (1991), "Therapeutic potential of plant photosensitizers.", *Pharmac. Ther.*, 49, 181-222.

Jori G. (1996), "Tumour photosensitizers : approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy.", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 36, 87-93.

Kamoun P., Bousquet B., Chappuis P. (1997), "Méthodes spectroscopiques.", *Appareils et méthodes en biochimie et biomoléculaire, Médecine-Sciences*, Flammarion, 87-122.

Kelly J.F., Snell M.E., Berenbaum M.C. (1975), « Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. », *Br. J. Cancer*, 31, 237-244.

Kerr J.F.R., Wyllie A.H. (1972) "Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics.", *Br. J. Cancer.*, 26, 239-257.

Kessel D. (1989) "In vitro photosensitization with a benzoporphyrin derivative.", *Photochem. Photobiol.*, 49, 579-582.

Kessel D. (1997) "Symposium-in-print: subcellular localization of photosensitizing agents.", *Photochem. Photobiol.*, 65, 387-388.

Knockaert M., Blondel M., Bach S., Leost M., Elbi C., Hager G.L., Nagy S.R., Han D., Denison M., French M., Ryan X.P., Magiatis P., Polychronopoulos P., Greengard P., Skaltsounis L., Meijer L. (2004), "Independent actions on cyclin-dependent kinases and aryl hydrocarbon receptor mediate the antiproliferative effects of indirubins.", *Oncogene.*, 23, 4400-4412.

Ko L., Koestner A., and Wechsler W. (1980), "Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones.", *Acta Neuropathol.*, 51, 23-31.

Kosmopolou M.N., Leonidas D.D., Chysina E.D., Bischler N., Eisenbrand G., Sakarellos C.E., Pauptit R., Oikonomakos N.G. (2004), "Binding of the potential antitumour agent indirubin-5-sulphonate at the inhibitor site of rabbit muscle glycogen phosphorylase b. Comparison with ligand binding to PCDK2-cycling A complex.", *Eur. J. Biochem.*, 271, 2280-2290.

Kostenich G., Orenstein A., Roitman L., Malik Z., Ehrenberg B. (1997), "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: Biol.*, 39, 36-42.

Kostron H., Obwegeser A., Jakober R. (1997), "Photodynamic therapy in neurosurgery : A review.", *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, 36, 157-168.

Leclerc S., Garnier M., Hoessel R., Marko D., Bibb J.A., Snyder G.L., Greengard P., Biernat J., Mandelkow E.-M., Eisenbrand G., Meijer L. (2001), "Indirubins inhibit glycogen synthase kinase – 3(Beta) and CDK5/p25, two kinases involved in abnormal tauphosphorylation in Alzheimer's disease – A property common to most CDK inhibitors ?", *J. Biol. Chem.*, 276, 251-260.

Lipson R.L., Baldes E.J., Gray M.J. (1967), "Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer.", *Cancer*, 20, 2255-2257.

Mc Govern P.E., Michel R.H. (1985), "Royal Purple dye : tracing the chemical origins of the industry.", *Anal.Chem.*, 57, 1514A-1522A.

Marko D., Schatzle S., Friedel A., Genzlinger A., Zankl H., Meijer L., Eisenbrand G. (2001), "Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells.", *Br. J. Cancer.*, 84, 283-289.

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

Meijer L., Guyard N., Skaltsounis L.A., Eisenbrand G. (2006), "Indirubin, the red shade of indigo.", *Life in Progress*, Roscoff, France.

Meijer L., Skaltsounis A.L., Magiatis P., Polychronopoulos P., Knockaert M., Leost M., Ryan X.P., Vonica C.A., Brivanlou A., Dajani R., Crovace C., Tarricone C., Mussachio A., Roe S.M., Pearl L., and Greengard P. (2003), "GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins.", *Chem. Biol.*, 10, 1255-1266.

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

Moan J., Berg K., Anholt H., Madslie K. (1994), "Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V-79 cells.", *Int. J. Cancer*, 58, 865-870.

Moan J., Berg K. (1991), "The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen.", *Photochem. Photobiol.*, 53, 543-553.

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

Mosmann T. (1983), "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.", *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63.

Neckers D.C. (1989), "Rose bengal.", *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 47, 1-29.

Ochsner M. (1997), "Photodynamic therapy: the clinical perspective.", *Arzneim. Forsch./Drug Res.*, 47, 1185-1194.

Ochsner M. (1997), "Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours.", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 39, 1-18.

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

Oleinick N.L., Evans H.H. (1998), "The photobiology of photodynamic therapy for cancer.", *Radiation Res.*, 150, S146-S156.

Orszag A., Hepner G. (1980) "Les lasers et leurs applications.", Masson, 3-37,98-99.

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

Patrice T., Olivier D., Bourré L. (2006), "Photodynamic therapy in clinics: indications, results, markets.", *J. Environ. Pathol. Tox. Oncol.*, 25, 467-487.

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

Peng Q., Warloe T., Berg K., Moan J., Kongshaug M., Giercksky K.E., Nesland J.M. (1997), "5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: Clinical research and future challenges.", *Cancer*, 79, 2282-2308.

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

Polychonopoulos P., Magiatis P., Skaltsounis L., Myrianthopoulos V., Mikros E., Tarricone A., Musacchio A., Roe S.M., Pearl L., Leost M., Greengard P., Meijer L. (2004), *J. Med. Chem.*, 47, 935-94.

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

Ribas J., Bettayeb K., Ferandin Y., Knockaert M., Garrofé-Ochoa X., Totzke F., Schächtele C., Mester J., Polychronopoulos P., Magiatis P., Skaltsounis A.L., Boix J., Meijer L. (2006) "L. 7-Bromoindirubin-3'-oxime induces caspase-independent cell death.", *Oncogene.*, 25, 6304-6318.

Richter A.M., Kelly B., Chow J., Liu D.J., Towers G.H.N., Dolphin D., Levy J.G. (1987), "Preliminary studies on a more effective phototoxic agent than hematoporphyrin.", *J. Natl. Cancer Inst.*, 79, 1327-1332.

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

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

Rosenthal I. (1991), "Phthalocyanines as photodynamic sensitizers.", *Photochem. Photobiol.*, 53, 859-870.

Rossi A.G., Sawatzky D.A., Walker A., Ward C., Sheldrake T.A., Riley N.A., Caldicott A., Martinez-Losa M., Walker T.R., Duffin R., Gray M., Crescenzi E., Martin M.C., Brady H.J., Savill J.S., Dransfield I., and Haslett C. (2006), "Cyclin-dependent kinase inhibitors enhance the resolution of inflammation by promoting inflammatory cell apoptosis.", *Nat. Med.*, 12, 1056-1064.

Schunck E. (1855), "On the formation of indigo blue. Part 1.", *Mem. Manchester Lit. Phil. Soc.*, ser., 12, 177. *Phil.Mag.*, 10, 73-95.

Scotto A.W., Chang L.F., Beattie D.S. (1983), "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.*, 258, 81-90.

Sheridan J.W., Bishop C.J., Simmons R.J. (1981), "Biophysical and morphological correlates of kinetic changes and death in a starved human melanome cell line.", *J. Cell Sci.*, 49, 119-137.

Smith P.D., O'Hare M.J., Park D.S. (2004), "CDKs: taking on a role as mediators of dopaminergic loss in Parkinson's disease.", *Trends Mol. Med.*, 10, 445-451.

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

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

Tanelian C., Mechin R., Seghrouchni R., Schweitzer C. (2000), "Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen", *Photochem. Photobiol.*, 71, 12-19.

Tom J.C. (2002), "Model systems in Neurooncology.", *Acta Neurochir.*, 83, 79-83.

Tsai L.H., Lee M.S., Cruz J. (2004), "Cdk5, a therapeutic target for Alzheimer's disease?", *Biochim. Biophys. Acta.*, 1697, 137-142.

Van Lier J.E., Spikes J.D. (1989) "The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines.", *Ciba Found Symp.*, 146, 17-32.

Vaux D.L., Korsmeyer S.J. (1999), "Cell death in development.", *Cell.*, 96, 245-254.

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

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

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

Wang J., Liu S.H., Fu Y.P., Wang J.H., Lu Y.M (2003), "Cdk5 activation induces hippocampal CA1 cell death by directly phosphorylating NMDA receptors.", *Nature Neurosci.*, 6, 1039-1047.

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

Wei F.Y., Nagashima K., Ohshima T., Saheki Y., Lu Y.F., Matsushita M., Yamada Y., Mikoshiba K., Seino Y., Matsui H., Tomizawa K. (2005), "Cdk5-dependent regulation of glucose-stimulated insulin secretion.", *Nat. Med.*, 11, 1104-1108.

Weishaupt K.R., Gomer C.J., Dougherty T.J. (1976), "Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of murine tumors.", *Cancer Res.*, 36, 2326-2329.

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

Woodburn K.W., Fan Q., Miles D.R., Kessel D., Luo Y., Young S.W. (1997), "Localization and efficacy analysis of the phototherapeutic lutetium texaphyrin (PCI-0123) in the murine EMT6 sarcoma model.", *Photochem. Photobiol.*, 65, 410-415.

Xiao Z., Hao Y., Liu B., Qian L. (2002), "Indirubin and mesoindigo in the treatment of chronic myelogenous leukemia in China.", *Leuk. Lymphoma.*, 43, 1763-1768.

Bibliographie

Young S.W., Woodburn K.W., Wright M., Mody T.D., Fan Q., Sessler J.L., Dow W.C., Miller R.A. (1996), "Lutetium texaphyrin (PCI-0123): a near-infrared, water-soluble photosensitizer.", *Photochem. Photobiol.*, 63, 892-897.

Zhang M., Li J., Chakrabarty P., Bu B., Vincent I. (2004), "Cyclin-dependent kinase inhibitors attenuate protein hyperphosphorylation, cytoskeletal lesion formation, and motor defects in Niemann-Pick Type C mice.", *Am. J. Pathol.*, 165, 843-853.

Nom – Prénoms : **Poincelot Marie-Anne**
Titre de la thèse : **L'utilisation des indirubines en photochimiothérapie : Evaluation de vingt-neuf molécules**

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 par voie topique ou générale et de la lumière visible délivrée au niveau de la tumeur. Le rayonnement lumineux provoque la mort des cellules tumorales après libération d'espèces radicalaires toxiques. Il est important de connaître les propriétés photodynamiques du produit administré lors d'un traitement par PDT.

Les indirubines, objets de cette étude, sont des composés très pigmentés dérivés de la dimérisation de l'isatine et de l'indoxyle. Les indirubines marines sont obtenues à partir d'un mollusque *Murex trunculus*.

Dans cette étude, nous avons étudié 29 indirubines pour leur propriété photodynamiques. Un de nos objectifs a été d'identifier parmi les différents dérivés d'indirubines ceux qui déjà, en absence de lumière, inhibaient significativement la croissance cellulaire et dont l'efficacité augmentait en sa présence.

L'absorption est typique des indirubines et s'échelonne entre 420 et 600 nm. 11 composés sur 29 ne sont pas fluorescents et d'autres sont faiblement fluorescents. Les composés fluorescents dont la fluorescence croit après l'addition de FCS produisent une quantité plus importante de ROS que les autres composés. 23 composés sur 29 sont non ou faiblement toxiques, les indirubines IND 18 et IND 19 étant les plus cytotoxiques. Seuls les composés fluorescents et producteurs de ROS ont été phototoxiques, IND 1 étant la plus phototoxique. Néanmoins, il fut impossible d'identifier un seul critère de structure prédisant les propriétés photodynamiques de ces molécules.

Les dérivés d'indirubine ont été également testés pour leur effet inhibiteur sur les CDK5 et les GSK-3 qui sont des cibles classiques de ces composés. On observe une absence d'activité anti-kinases pour les indirubines IND 3, IND 8, IND 12, IND 13, IND 14, IND 15, IND 16, IND 17 et une bonne activité pour les indirubines IND 4, IND 5, IND 6, IND 24, IND 25, IND 28, IND 29. La toxicité sur la lignée cellulaire SH-SY5Y est très variable, et n'a pas pu être clairement corrélée avec l'activité anti-kinase.

IND 22 a une activité inhibitrice marginale sur CDK 5 et GSK-3, elle induit un processus de mort cellulaire rapide, distinct de l'apoptose.

L'association d'activités anti-CDK5 et anti- GSK-3 pourrait être exploitée dans le traitement de la maladie d'Alzheimer, dans laquelle ces deux kinases sont impliquées ainsi que dans d'autres processus pathologiques.

Comme la photochimiothérapie agit autant sur les cellules cancéreuses que sur les tumeurs vasculaires il a été récemment suggéré d'utiliser des facteurs anti-angiogéniques ou des inhibiteurs de kinases comme adjuvants de la photochimiothérapie.

MOTS CLES : PHOTOCHIMIOOTHERAPIE PHOTOTOXICITE
INDIRUBINE INHIBITEUR DE KINASES
FLUORESCENCE ABSORPTION

JURY : Président : M. Gilles Barnathan, Professeur, Nantes
Assesseurs : M. Thierry Patrice, Professeur, Nantes
Mme Hélène Robillard, Docteur en Pharmacie
M. David Olivier, Vétérinaire, chercheur INSERM

Adresse de l'auteur : 86 rue Auguste Garnier 44120 VERTOU

