

Université de NANTES

Faculté de Médecine

**Identification de nouveaux composés pour la
photochimiothérapie des cancers**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale : **CHIMIE-BIOLOGIE**

Discipline : **Sciences de la vie et de la santé**

Spécialité : **Photochimiothérapie**

Présentée

et soutenue à huis clos par

David OLIVIER

le 12 novembre 2008, devant le jury ci-dessous

- Président : - M. Khaled MEFLAH, Professeur
- Rapporteurs : - M. Gérard SIMONNEAUX, Directeur de Recherche CNRS, Rennes
- M. Khaled MEFLAH, Professeur, Directeur du Centre anticancéreux
F. Baclesse, Caen
- Directeurs : - M. François Vallette, Professeur, Inserm, Nantes
- M. Thierry Patrice, Professeur, Praticien Hospitalier, CHU de Nantes

ABREVIATIONS

A549	Lignée cellulaire cancéreuse (carcinome pulmonaire humain)
ADN	Acide désoxyribonucléique
ALA	Acide δ -aminolévulinique
ALAD	ALA déhydratase
ALAS	Aminolévulinate synthétase
AMM	Autorisation de mise sur le marché
ANR	Agence Nationale de la Recherche
ATP	Adénosine triphosphate
BPD	Benzoporphyrine dérivée
C6	Lignée cellulaire cancéreuse (glioblastome de rat)
CDK	Kinases cycline-dépendantes
Ce6	Chlorine e6
CLHP	Chromatographie liquide haute performance
<i>coll.</i>	Collaborateurs
DCF(H)	Dichlorofluorescéine (DCFH : forme réduite – DCFDA : diacétate)
DL50	Dose létale pour 50% de la population
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DMSO	Diméthyl sulfoxyde
DO	Densité optique (= absorbance)
EBO	Endobrachyoesophage
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acetate (sel disodique)
EGF(R)	Epidermal Growth Factor (Receptor)
EMEA	European medicines Agency (Agence européenne des médicaments)
F98	Lignée cellulaire cancéreuse (glioblastome de rat)
FAD	Flavine adénine dinucléotide
FCS	Fœtal calf serun (sérum de veau fœtal)
FDA	Food and drug Administration
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
GSK	Kinase glycogène synthase
HPD	Hématoporphyrine dérivée
HT29	Lignée cellulaire cancéreuse (adénocarcinome colique humain)
IC50	Concentration inhibant 50% de l'effet

IOPS	Indemne d'organismes pathogènes spécifiques
IP	Intrapéritonéal (injection)
IPK	Inhibiteurs de protéine kinases
IR	Infrarouges
IV	Intraveineuse (injection)
LASER	Light amplification by stimulated emission of radiation
LDL	Low density lipoproteins (Lipoprotéines de basse densité)
Lu-TeX	Lutetium texaphyrin
MC540	Mérocyanine 540
m-THPC	méta-tétrahydroxyphényle chlorine (Foscan [®] ; o- et p-: isomères ortho- et para-)
MTT	Bromure de 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]2,5-diphényltétrazolium
NAD(P)	Nicotinamide adénine dinucléotide (phosphate; +H : forme réduite)
NIH	National Institutes of Health (Etats-Unis)
O₂	Oxygène
¹O₂	Oxygène singulet
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORL	Oto-rhino-laryngologie
PBG	Porphobilinogène
PBGD	Porphobilinogène déaminase
PBS	Phosphate buffer saline (Tampon phosphate, KH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄)
PDD	Photodiagnostic
PEG	Polyéthylène glycol
pKa	Logarithme de l'inverse de la constante d'acidité (Ka)
PLD	Potential lethal damages (Dommages cellulaires potentiellement létaux)
PDT	Photodynamic therapy (Photochimiothérapie)
ppi	pour préparation injectable
PpIX	Protoporphyrine IX
PS	Photosensibilisant
RPMI	Roswell park memorial Institute
ROS	Reactive oxygen species (espèces réactives de l'oxygène)
SC	Sous-cutanée (injection)
SFFO	Spectrofluorimètre à fibre optique
SOD	Superoxide dismutase
TEM	Transverse électro-magnétique (mode d'un laser)

TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
TNM	Classification des tumeurs selon l'Union Internationale contre le Cancer, prenant en compte la taille de la tumeur (T), l'atteinte ganglionnaire (N) et la présence de métastases (M)
UA	Unité arbitraire (fluorescence, photoréactivité)
UMR	Unité mixte de recherche
UV	Ultra-violets
VEGF(R)	Vascular endothelial growth factor (Receptor)

Remarque : les noms des molécules présentées dans ce document comportent des sigles (**SIM, AB, MLS, MC, BAE, BS/PE, ske norm...**) qui sont des abréviations attribuées par les laboratoires les ayant synthétisées selon des références internes (patronymes, matériels...) et qui doivent être interprétés comme de simples dénominations de travail. Le STI571 est un inhibiteur de protéine kinase commercialisé sous le nom de Glivec®.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	1
GENERALITES	5
I. La photochimiothérapie	6
A. Histoire et principe	6
B. Les photosensibilisants	9
1. Les porphyrines et leurs analogues	10
2. Les photosensibilisants non porphyriniques	17
3. Photosensibilisants endogènes	21
C. Les réactions photochimiques	22
1. Type I	23
2. Type II	23
D. Aspects cellulaires de la PDT des cancers	25
1. PDT et mort cellulaire	26
2. Mode d'action cellulaire de la PDT	27
E. Sélectivité tumorale des photosensibilisants	32
F. Les applications cliniques	34
1. Les applications en Cancérologie	34
2. Les applications non anticancéreuses	40
II. Lumière et fluorescence	43
A. La lumière	43
1. Nature de la lumière	43
2. Transitions électroniques	43
B. Les lasers	48
1. Principe de fonctionnement d'un L.A.S.E.R.	49
2. Les différents types de laser	50
3. Autres matériels optiques utilisés en photochimiothérapie	53

III.	Matériels	56
A.	Les photosensibilisants	56
1.	Le SIM01	56
2.	Cyanines et phthalocyanines	56
3.	Radachlorine	59
4.	Indirubines	60
5.	Extraction	62
6.	Nouvelles synthèses	65
B.	Les modèles cellulaires	66
1.	Culture cellulaire	66
2.	Lignées tumorales	66
C.	Animaux	67
D.	Appareillage	68
1.	Mesure de l'absorbance	68
2.	Mesure de la fluorescence	68
3.	Sources lumineuses : lasers	70
IV.	Méthodes	72
A.	In vitro	72
1.	Spectrophotométrie d'absorption et stabilité en solution	72
2.	Spectrofluorimétrie	72
3.	Tests de photoréactivité	72
4.	Pharmacocinétique et biodistribution des photosensibilisants par imagerie de fluorescence	74
5.	Détermination de la phototoxicité	74
B.	Les modèles tumoraux in vivo	76
1.	Etude de pharmacocinétique	76
2.	Etude de l'effet de la photochimiothérapie sur souris "nude"	77
3.	Modèle de gliome chez le rat	78

C. Statistiques	79
V. Résultats	82
A. In vitro	82
1. Spectrométrie et stabilité en solution	82
2. Photoréactivité	88
B. Pharmacocinétique et distribution intracellulaire	102
1. SIM01	102
2. Radachlorine	103
3. Autres	104
C. Phototoxicité et toxicité	104
1. SIM01	104
2. Cyanines et phthalocyanines	106
3. Radachlorine	106
4. Indirubines	108
5. Extraits de microalgues	109
D. In Vivo	109
1. Pharmacocinétique in vivo	109
2. Efficacité de la thérapie photodynamique sur souris "nude"	114
3. Efficacité de la photochimiothérapie intra-cérébrale	127
VI. Discussion	132
Conclusion	162
ANNEXES	164
BIBLIOGRAPHIE	170

INTRODUCTION

La photochimiothérapie (PDT) est une méthode de détection et de traitement des cancers basée sur l'action combinée de la lumière et d'un médicament appelé photosensibilisant. Une fois administré au patient, ce médicament sensible à la lumière est activé au niveau de la tumeur par une irradiation lumineuse, généralement réalisée grâce à un laser couplé à une fibre optique. Cette irradiation conduit par une suite de transitions énergétiques à la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces radicalaires fortement oxydantes, capables d'engendrer la destruction des cellules ayant capté le photosensibilisant.

La PDT possède quatre avantages par rapport aux traitements anticancéreux conventionnels:

- Une relative sélectivité des sensibilisants vis-à-vis des tissus cancéreux qui est obtenue par une rétention plus longue du photosensibilisant dans la tumeur par rapport aux tissus sains environnants. De plus, la phototoxicité induite est limitée à la zone irradiée par le laser. Enfin, les cellules cancéreuses sont moins performantes pour réparer les dommages potentiellement létaux (en anglais « PLD ») générés par la PDT que les cellules saines.

- La photochimiothérapie est peu invasive et peu toxique, et peut s'appliquer non seulement au traitement des cancers, mais aussi au traitement d'affections plus bénignes, par exemple en dermatologie ou en ophtalmologie (exemple de 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 simplement des études cinétiques tissulaires ou cellulaires des photosensibilisants, mais surtout, du fait de leur sélectivité vis-à-vis des tissus cancéreux, de les utiliser à des fins de diagnostic (photodiagnostic) ou d'amélioration des exérèses chirurgicales.

- Cette technique est relativement peu coûteuse à mettre en œuvre par rapport à la chirurgie ou la radiothérapie, ce qui signifie qu'à bénéfice médical équivalent, le rapport coût/efficacité est plus favorable pour la PDT.

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. Un premier agent photosensible, le Photofrin[®], a obtenu une autorisation de mise sur le marché (A.M.M.) en France en avril 1996, après les Etats-Unis (1995) et le Japon (1994) pour les rechutes de cancers bronchiques. Le Photofrin[®], est un mélange de porphyrines² permettant le traitement de petites tumeurs localisées. Bien qu'efficace, cette

spécialité présente l'inconvénient d'avoir une biodistribution et une élimination lente, ce qui induit des temps d'hospitalisation longs et une photosensibilisation cutanée durable obligeant les patients à se protéger du soleil pendant 1 mois environ³. Par ailleurs, la présence d'impuretés et une excitabilité faible à 632 nm entraînant une profondeur de traitement limitée⁴ a stimulé la recherche de nouveaux composés. De nouvelles familles de photosensibilisants ont été développées (photosensibilisants de seconde génération) parmi lesquels les chlorines. Nous pouvons citer en exemple la m-THPC, (méta-tétrahydroxyphénylchlorine, Foscan[®])⁵ qui a reçu en 2001 une autorisation de mise sur le marché en Europe pour le traitement des carcinomes ORL récidivants. Citons également le Levulan[®] pour le marché américain concernant le traitement des kératoses actiniques en dermatologie, et la Visudyne[®] (verteporfine) pour le marché américain et français concernant le traitement de la dégénérescence maculaire lié à l'âge (DMLA) en ophtalmologie.

Malgré tout, ces produits induisent une photosensibilisation cutanée de plusieurs semaines et les brevets correspondants sont anciens (de 1987 pour le Photofrin[®] à 1992 pour la Visudyne[®]). Les sociétés développant ces produits n'ont pas d'intérêt à mettre en place des essais cliniques et développer de nouvelles indications alors qu'elles vont perdre prochainement l'exclusivité de vente. Faute de ces investissements, tout le développement de la photochimiothérapie se voit retardé. Ainsi la définition de nouvelles structures photoréactives est nécessaire à l'amélioration de la prise en charge des patients autant pour des raisons médicales (amélioration de l'efficacité, de la sélectivité, développement de nouvelles indications pour lesquelles il n'existe pas encore de traitement satisfaisant, diminution de la demi-vie et des effets secondaires) que pour des raisons économiques (diminution des temps d'hospitalisation et des coûts induits, stimulation des investissements industriels permettant le développement de nouveaux traitements et de nouvelles indications).

Au cours de cette thèse nous avons réalisé l'évaluation sur un modèle de gliome chez le rat d'une chlorine, SIM01, développée par le laboratoire et synthétisée par l'UMR 6226, proche de la m-THPC mais avec une pharmacocinétique nettement plus rapide. Ce projet faisait suite à une première étude très prometteuse⁶. Les premiers résultats obtenus ont confirmé l'induction par la PDT d'une nécrose tumorale mais celle-ci était accompagnée d'une morbidité et d'une mortalité importante. La morphologie de la tumeur greffée s'est avérée peu adaptée au protocole initialement prévu. En parallèle, une collaboration avec le groupe Cycle Cellulaire de l'UMR Mer et Santé qui a permis de mettre au point des photosensibilisants ayant un effet inhibiteur de protéine kinases nous a conduits à identifier et étudier des composés plus novateurs. Nous avons donc testé 193 nouveaux sensibilisants pour la photochimiothérapie, provenant soit de nouvelles

synthèses, soit d'extractions à partir d'organismes marins. L'abondance des molécules à tester a nécessité le développement de nouvelles techniques et une rationalisation des tests entrepris pour permettre la sélection rapide des meilleurs candidats. L'évaluation de ces molécules débute par de simples tests physico-chimiques et peut aller jusqu'à la réalisation de modèles organo-spécifiques et à des tests précliniques pour les meilleurs d'entre eux.

Après avoir décrit la photochimiothérapie et ses spécificités, nous présenterons les différentes sources de nouveaux photosensibilisants étudiés, puis les différents tests mis en œuvre, l'évaluation de la stabilité des composés par spectrométrie d'absorption, les tests de photoréactivité mis au point, les cinétiques d'incorporation et de distribution cellulaire et tissulaire, les tests de phototoxicité sur lignées cancéreuses, les tests de toxicité aiguë et les tests d'efficacité thérapeutique *in vivo* et enfin la mise en place de modèle de tumeurs orthotopiques. Enfin nous discuterons des résultats obtenus et du développement attendu pour les meilleurs photosensibilisants identifiés.

GENERALITES

I. La photochimiothérapie

A. Histoire 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".

Bien que cette technique se soit développée récemment, le principe est connu depuis l'antiquité. Dans l'Egypte ancienne, l'Inde et la Chine, l'exposition à la lumière solaire était utilisée pour guérir des maladies cutanées telles que vitiligo, psoriasis, cancer, ou générales, comme le rachitisme⁷. Bien que ces pratiques ne fassent pas appel à des xénobiotiques, elles reposent sur la présence de photosensibilisants endogènes ou de photoréactions (formation de la vitamine D). La première trace écrite de la photochimiothérapie remonte au Atharava-veda (livre sacré indien, 1400 av. J.C.) qui décrit l'utilisation de *Psoralea corylifolia*, une plante contenant des psoralènes, pour traiter des lésions de vitiligo qui étaient ensuite exposées à la lumière solaire⁷.

En 1900, Raab a observé que des bactéries, incubées préalablement avec de l'acridine orange, étaient rapidement inactivées par la lumière visible en présence d'oxygène⁹. Peu après en 1903, H. von Tappeiner et A. 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 lumière¹⁰. Un an plus tard, H. von Tappeiner et A. Jodlbauer ont créé le terme d'action

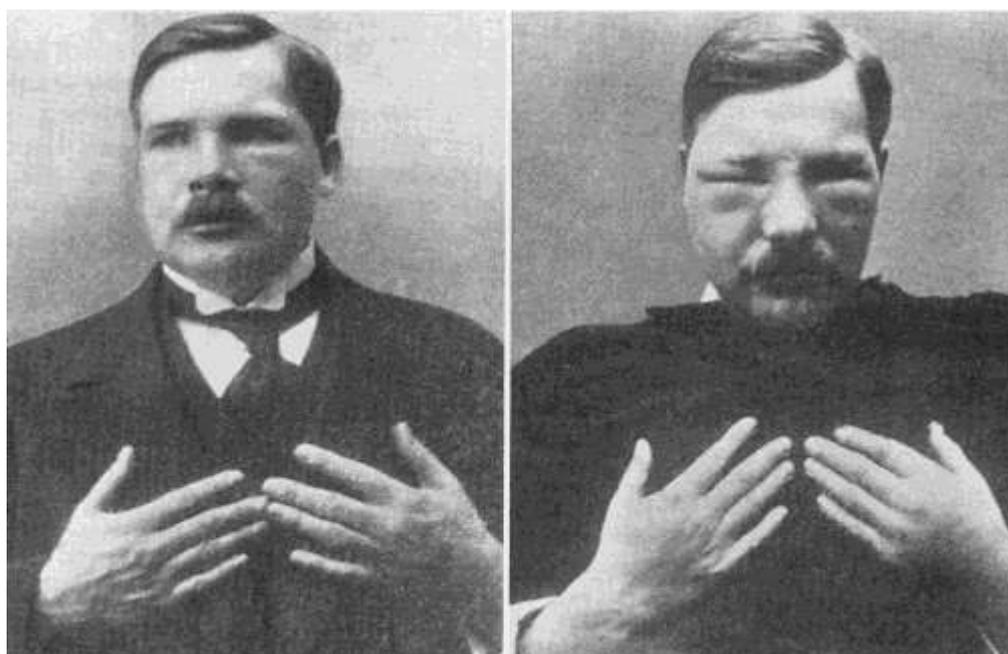


Figure 1 : F. Meyer-Betz avant et après une injection intraveineuse de 200 mg d'hématoporphyrine induisant une photosensibilité solaire⁸

photodynamique pour distinguer ce phénomène de la photosensibilisation des plaques photographiques¹¹.

En 1911, W. Hausmann¹² et F. Meyer-Betz⁸ ont fait un rapport sur la phototoxicité de l'hématoporphyrine (*Figure 1*) et A. Policard en 1924 a attribué la fluorescence rouge induite par la lumière à une accumulation naturelle de photosensibilisants dans les tumeurs humaines¹³. H. Auler et G. Banzer¹⁴ ont confirmé ces observations et suggéré l'utilisation de porphyrines pour la détection précoce des tumeurs.

Les premières études de photodiagnostic (PDD) ont été rapportées par H.B. Gregorie *et coll.*¹⁵ en 1968 et ont permis de démontrer l'intérêt de 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. La possibilité et l'intérêt du photodiagnostic des tumeurs malignes étaient dès lors démontrés.

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 d'après H.B. Gregorie et coll¹⁵

F. Figge *et coll.* ont évoqué la possibilité de traitement de certains cancers avec des porphyrines ou des métallo-porphyrines en 1948¹⁶, mais il a fallu attendre 1967 pour que soit rapportée par R.L. Lipson la première utilisation de l'hématoporphyrine dérivée (HPD) en photochimiothérapie¹⁷.

Le développement des lasers médicaux dans les années 70 a permis le développement de la PDT. T.J. Dougherty *et coll.*, I. Diamond *et coll.* et J.F. Kelly *et coll.* ont rapporté l'utilisation d'HPD et d'une lumière laser pour parvenir à une destruction sélective des tumeurs¹⁸⁻²⁰.

Le principe de ce traitement consiste à administrer au patient une substance photosensible qui est captée et retenue plus ou moins préférentiellement par les cellules tumorales. Dans un second temps, la tumeur est éclairée par un laser dont la longueur d'onde est adaptée au spectre d'absorption lumineuse du photosensibilisant et dont la puissance n'induit pas d'échauffement des tissus cibles. La lumière est transmise à la zone traitée par une fibre optique, éventuellement associée à un dispositif diffusant. L'irradiation du photosensibilisant déclenche une série de transitions énergétiques aboutissant à la production, au sein du tissu irradié qui a fixé le photosensibilisant, d'espèces radicalaires toxiques entraînant oxydations et mort cellulaire^{21,22} (Figure 2).

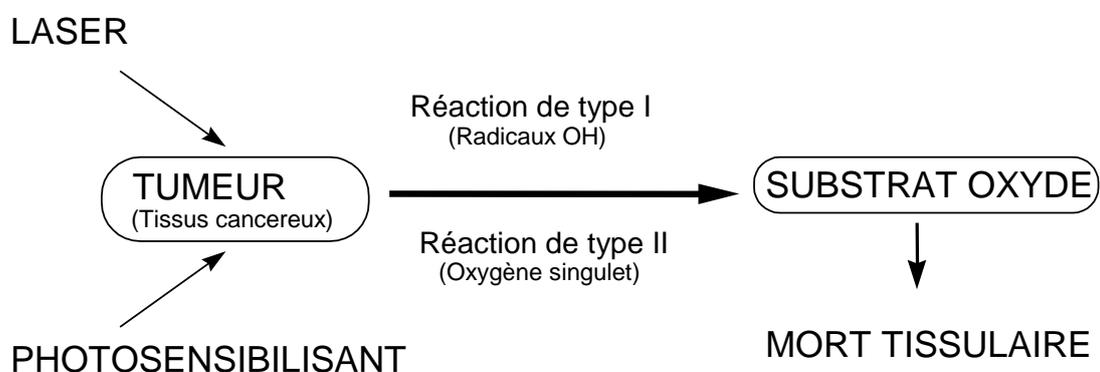


Figure 2 : Principe de la Photochimiothérapie (PDT)

B. Les photosensibilisants

Une réaction photochimique ne peut être initiée que si une radiation lumineuse est absorbée par un atome ou une molécule, comme l'énonce la loi fondamentale de la photochimie, dite de Grotthus-Draper. Les molécules utilisées pour la photochimiothérapie doivent idéalement présenter les caractéristiques suivantes²³ :

physico-chimiques :

- grand coefficient d'extinction molaire dans le rouge ou le proche infrarouge
- faible tendance à l'agrégation en milieu aqueux
- stabilité en présence de protéines
- longue durée de vie de l'état triplet
- fort rendement de génération d'oxygène singulet et/ou de transfert d'électrons aux molécules du substrat
- relative stabilité sous flux lumineux

pharmacologiques :

- sélectivité vis-à-vis des tissus tumoraux (captation et rétention)
- haute clairance
- faible toxicité systémique et courte photosensibilisation cutanée induite

photothérapeutiques :

- haute phototoxicité
- absence de potentiel mutagène sous irradiation lumineuse.

La lumière utilisée pour exciter le photosensibilisant pénètre le tissu plus ou moins profondément selon sa longueur d'onde (*Figure 3*). Dans la mesure du possible les nouveaux photosensibilisants doivent donc présenter une plus forte absorption dans le rouge et proche infrarouge (630-850 nm) pour favoriser la pénétration en profondeur de la lumière²⁴, et permettre le traitement d'une masse tumorale importante sans avoir à recourir à des irradiations multiples ou une ablation chirurgicale préalable. En contrepartie, les molécules photoréactives absorbant au delà de 800 nm sont en général instables, et les photons correspondants moins énergétiques. Il n'est pas réellement envisageable d'utiliser toutes les molécules décrites comme photoréactives et pertinentes en biologie²⁵ en photochimiothérapie. En effet pour qu'une molécule soit utilisée en thérapie, il faut, en plus des caractéristiques citées ci-dessus, qu'elle soit brevetée ou

brevetable. L'obtention d'une autorisation de mise sur le marché est une étape longue (environ 5 ans) et très coûteuse (plusieurs millions d'euros pour une seule indication) qu'aucune entreprise pharmaceutique n'envisage si elle ne peut avoir une période d'exclusivité de vente du médicament grâce à un brevet. Nous présenterons ci-dessous les familles de composés utilisés pour la thérapie photodynamique.

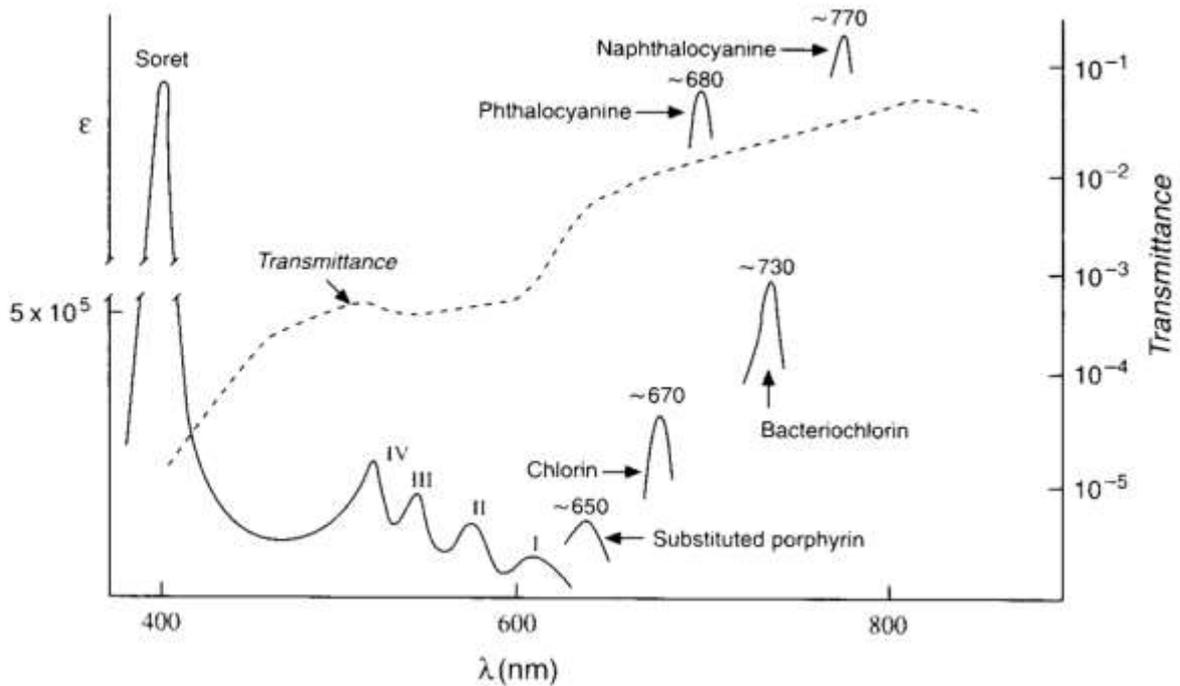


Figure 3 : Représentation relative de l'absorption des photosensibilisants et de la quantité de lumière traversant un tissu humain d'1 cm d'épaisseur¹

1. Les porphyrines et leurs analogues

Les porphyrines sont des macrocycles hétérocycliques constitués de 4 noyaux pyrroles dont toutes les doubles liaisons sont conjuguées (Figure 4). Cette structure leur confère la propriété d'absorber la lumière visible. Les porphyrines sont caractérisées par un fort pic d'absorption entre 390 et 430 nm appelé « bande de Soret » ainsi que 4 pics secondaires entre 480 et 700 nm appelés bandes Q. Les porphyrines et leurs dérivés sont largement représentés dans les organismes vivants : hémoglobine, cytochromes, enzymes (comme la catalase et la peroxydase), chlorophylle...

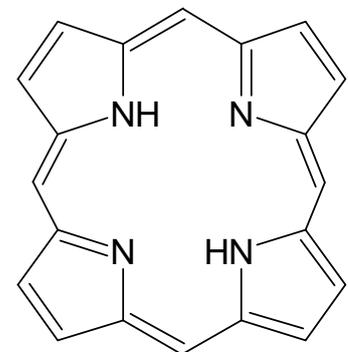


Figure 4 : Noyau porphyrine

a) L'hématoporphyrine dérivée

Pour améliorer les propriétés de sélectivité des porphyrines vis-à-vis des tumeurs, S.K. Schwartz a synthétisé en 1959 l'hématoporphyrine dérivée (HPD), un mélange complexe de structures correspondant à différents degrés d'oligomérisation de porphyrines (du monomère, aux hexamères) reliées par différentes liaisons chimiques (éther, ester et liaisons carbone-carbone). Les qualités de localisation tumorale de l'HPD ont clairement été démontrées^{15,17}. C'est en 1982 que Y. Hayata *et coll.* ont rapporté les premiers essais cliniques avec l'HPD pour le traitement du cancer du poumon²⁶.

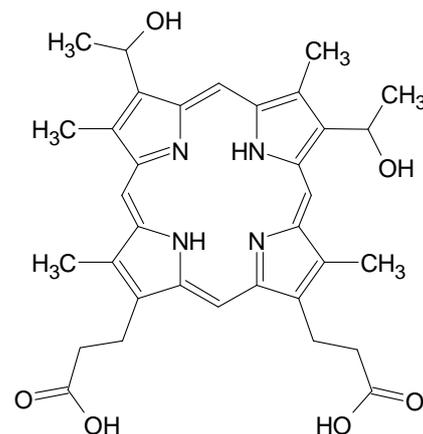


Figure 5 : L'hématoporphyrine

b) Le Photofrin®

L'hématoporphyrine dérivée (HPD), purifiée, a été le premier photosensibilisant commercialisé, sous le nom Photofrin® (Porfimer Sodium). Le Photofrin est obtenu par purification de l'HPD²⁷ visant à isoler la fraction active. Il reste cependant constitué de composés hétérogènes : monomères, incluant l'hématoporphyrine (Figure 5), isomères de l'hydroxy-éthyle-vinyle-deutéroporphyrine, protoporphyrine IX, dimères d'hématoporphyrine avec une liaison éther, ester ou carbone-carbone (Figure 6) et de très grands oligomères. Ces composés possèdent des propriétés spectroscopiques, pharmacocinétiques et pharmacologiques différentes.

L'autorisation de mise sur le marché (A.M.M.) obtenue au Japon (1994), aux Etats-Unis (1995) puis en France (avril 1996) pour deux applications cliniques²⁸ (rechutes des cancers bronchiques et cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement locorégional antérieur) a ouvert la voie au développement de

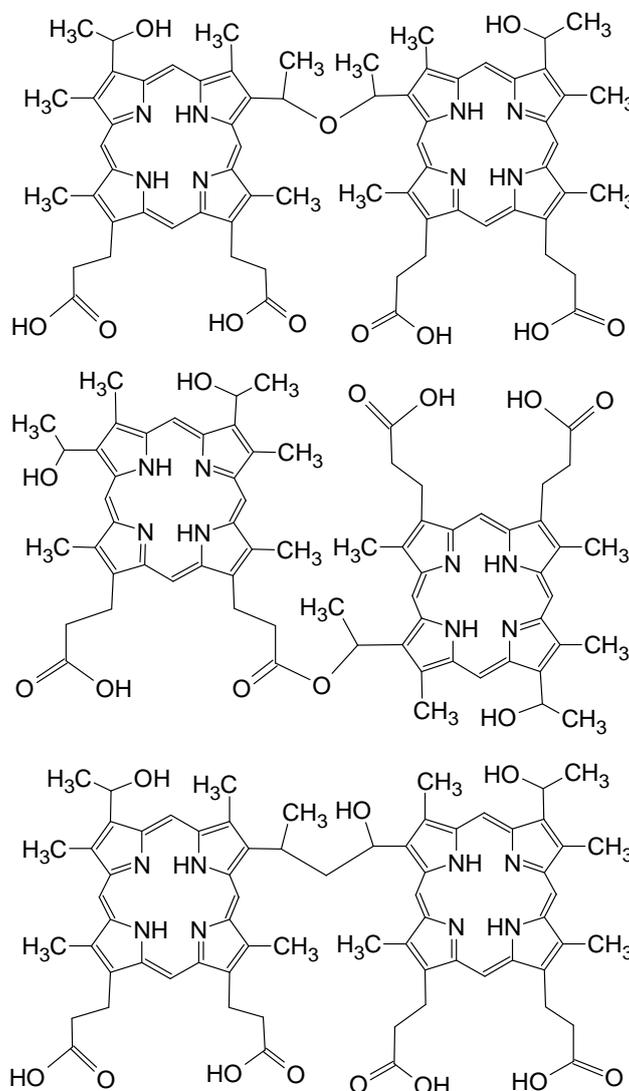


Figure 6 : Dimères du Photofrin : dihématoporphyrine avec une liaison A) éther, B) ester, C) carbone-carbone

photosensibilisants plus efficaces et plus purs.

c) Les photosensibilisants de seconde génération

La plupart des photosensibilisants qui ont été étudiés et développés jusqu'à présent sont également des dérivés de porphyrines : chlorines, benzoporphyrines, purpurines, phthalocyanines, texaphyrines^{29,30}.

(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 nm³¹.

(a) La chlorine e6

La chlorine e6 (Ce6) 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 ns³². Le rendement de photoproduction d'oxygène singulet de la Ce6 (dans l'éthanol) est de 0,65 (irradié à 347 ou 532 nm).

La chlorine se localise 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.

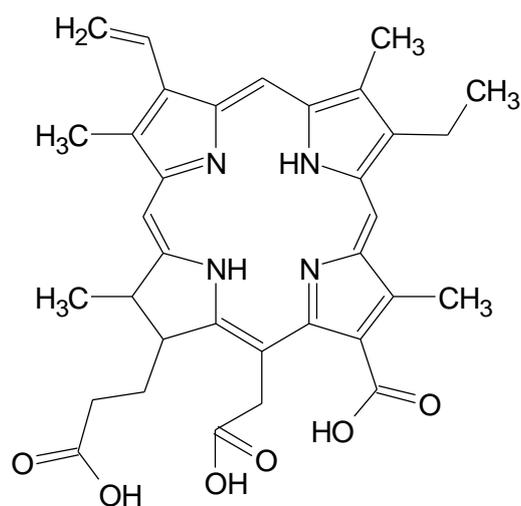
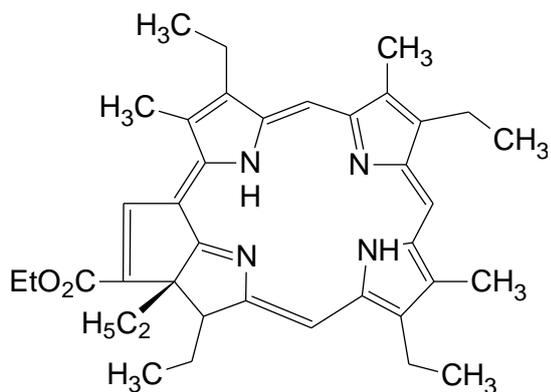


Figure 7 : Chlorine e6

(b) Les purpurines

**Figure 8 : Etiopurpurine**

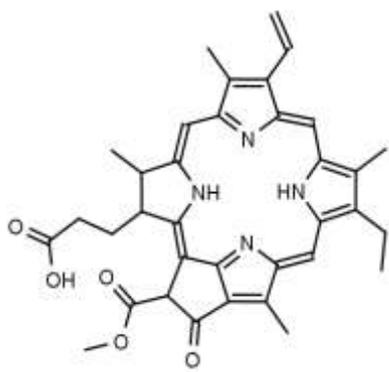
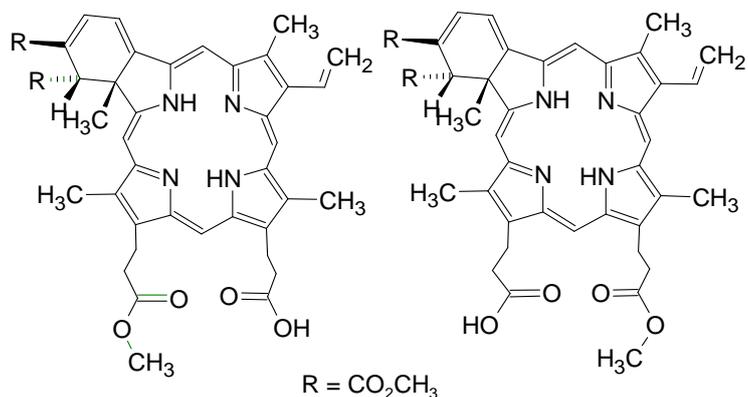
Les purpurines sont des chlorines car elles ont un groupe pyrrole réduit. Comme plusieurs autres chlorines, les purpurines ont une forte bande d'absorption dans le rouge, entre 630 et 715 nm et ont un rendement quantique d'oxygène singlet de 0,6-0,7³¹.

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, cf. *Figure 8*)³¹.

(c) Le phéophorbide

Il s'agit d'un produit de dégradation de la chlorophylle, qui peut également servir de précurseur à la synthèse de la chlorine e6 (*Figure 9*). Le premier article concernant son utilisation en photochimiothérapie a été publié en 1981³³.

**Figure 9 : Phéophorbide a****Figure 10 : Deux isomères de la benzoporphyrine dérivée monoacide a**

(d) La benzoporphyrine

Cette chlorine est synthétisée à partir de la protoporphyrine. Elle peut exister comme monoacide (cf. *Figure 10*) ou diacide mais la forme monoacide est considérablement plus active³⁴. Son caractère lipophile facilite son insertion dans la membrane cellulaire³⁵. L'avantage principal de la

BPD est la présence de son pic d'absorption maximale à 690 nm, favorisant la pénétration tissulaire de la lumière. 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 lumière³⁶.

(e) La meta-tétra hydroxyphényle chlorine

La méta-tétrahydroxyphényle chlorine (m-THPC, Figure 11) est une porphyrine réduite (chlorine) avec 4 fonctions phénols. Il en existe 2 isomères, la p-THPC et la o-THPC qui diffèrent par la position du OH sur le cycle. Ces substances sont photoréactives (rendement de production d¹O₂ de 0,33 dans l'éthanol, mais de 0,01 dans du PBS²⁵) et montrent une sélectivité tissulaire dans la nécrose photo-induite. L'isomère "m" s'est révélé être 25 à 30 fois plus puissant 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)³⁷.

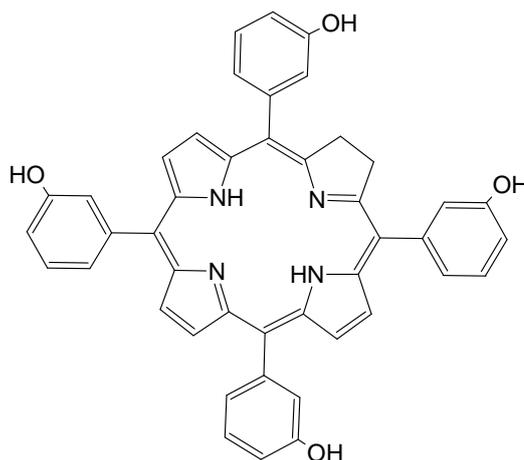


Figure 11 : Molécule de meta-tétra hydroxyphényle chlorine

(2) Les phthalocyanines

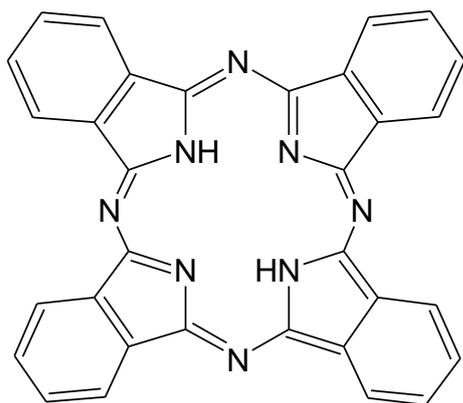


Figure 12 : Phthalocyanine

Les phthalocyanines (Figure 12) sont des composés synthétiques avec une absorption maximale entre 675 et 700 nm³⁴. Elles peuvent chélater un grand nombre de métaux, principalement l'aluminium et le zinc. La présence de ces métaux améliore semble-t-il la phototoxicité²⁸. Le rendement de production d¹O₂ dans l'eau deutérée est de 0,7 pour le tétrasulfonate de phthalocyanine de zinc et de 0,43 pour le tétrasulfonate de phthalocyanine d'aluminium²⁵. L'activité de la drogue dépend du degré d'agrégation (le plus agrégé étant le moins efficace) et de la

localisation subcellulaire³⁸.

(3) Les texaphyrines

Le plus connu et le plus utilisé des dérivés des texaphyrines est la lutétium texaphyrine (Lu-Tex, *Figure 13*). C'est un nouveau photosensibilisant absorbant dans le proche infra-rouge³⁹. C'est un photosensibilisant pur, soluble dans l'eau, avec une large bande d'absorption centrée sur 732 nm⁴⁰.

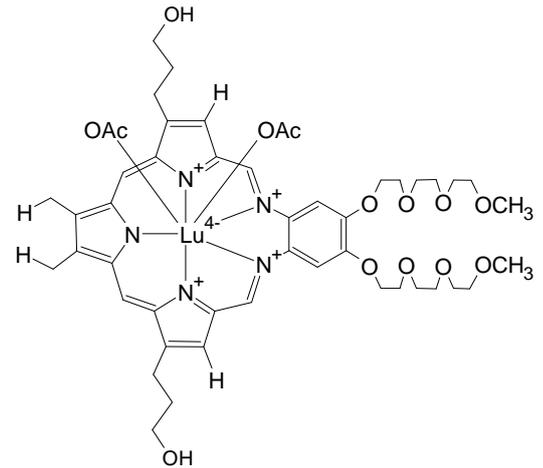


Figure 13 : Lutétium texaphyrine

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

L'ALA n'est pas une drogue photosensibilisante en elle-même, mais un précurseur de photosensibilisant endogène (cf. *Figure 14*).

L'idée de faire synthétiser un photosensibilisant par les cellules tumorales elles-mêmes a eu beaucoup de succès dans la recherche concernant la PDT⁴¹⁻⁴⁶. La synthèse de l'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

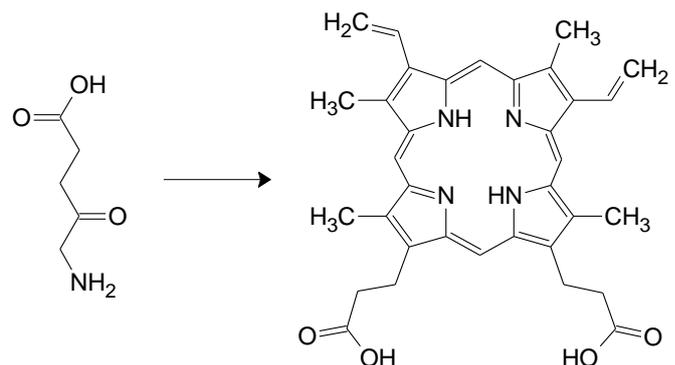


Figure 14 : Molécule d'acide δ -aminolävulinique (ALA) et de protoporphyrine IX (PpIX)

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 par saturation des capacités de cette enzyme.

- Biosynthèse de l'hème

L'hème, un pigment tétrapyrrolique contenant du fer, est un constituant des protéines liant l'oxygène et le coenzyme de différentes oxydoréductases dans la chaîne respiratoire (cytochromes), ainsi que dans les mono-oxygénases et les peroxydases. Le cycle de la biosynthèse de l'hème comprend 8 étapes catalysées s'effectuant dans la mitochondrie ou les compartiments cytosoliques de la cellule. L'étape initiale de cette biosynthèse est la formation

d'ALA (Figure 15). Pour les mammifères et les bactéries photosynthétiques, l'ALA est formé à partir de glycine et succinyl-CoA par l'enzyme ALA synthétase⁴⁷. Cette enzyme est localisée dans la matrice de la membrane mitochondriale interne⁴⁸ et son activité régule la synthèse de l'hème.

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 (localisées dans le cytosol) condensent 4 molécules de PBG et cyclisent la chaîne tétrapyrrole pour former l'uroporphyrinogène III.

Au niveau de l'uroporphyrinogène III, les chemins de formation des différentes classes de tétrapyrroles divergent. Les réactions suivantes nécessaires à la synthèse de l'hème sont une série de décarboxylations et d'oxydations ; l'ion fer est ensuite inséré dans l'anneau tétrapyrrolique. La première partie de ce processus se déroule dans le cytosol sous l'action de l'uroporphyrinogène décarboxylase. Cette enzyme enlève 4 groupes carboxyles de l'uroporphyrinogène pour former la coproporphyrinogène tétracarboxylique.

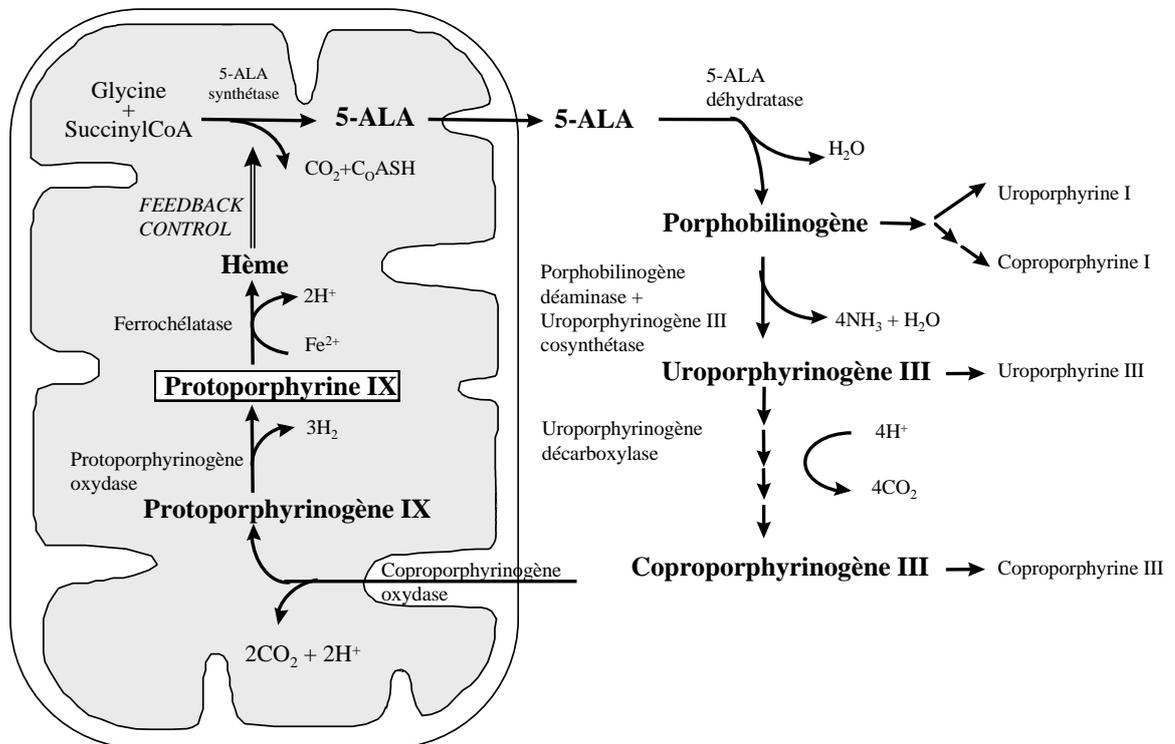


Figure 15: Biosynthèse de l'hème

La coproporphyrinogène oxydase, laquelle est située dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie⁴⁹ catalyse la formation de Protoporphyrinogène IX à partir de

coproporphyrinogène III par décarboxylation et oxydation de chaînes propioniques en groupes vinyles.

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 située dans la membrane mitochondriale interne avec ses sites actifs sur la matrice de la membrane⁵⁰. C'est une enzyme oxygène-dépendante avec une haute spécificité pour le substrat. La protoporphyrinogène IX pourrait s'oxyder spontanément en PpIX, mais ceci est peu probable dans la mitochondrie où la protoporphyrinogène IX est 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. L'incorporation de fer bloque la photoréactivité du noyau tétrapyrrole. Les patients atteints de porphyrie souffrent d'une anomalie génétique conduisant à une synthèse incomplète de l'hème, et une concentration sanguine élevée en porphyrines non métallées photoréactives.

d) Autres

Parmi les photosensibilisants porphyriniques, nous pouvons enfin citer pour mémoire la phéophytine, qui est une molécule de chlorophylle sans ion Mg^{2+} avec un rendement de photoproduction d'oxygène singulet (dans le tétrachlorométhane) de 0,7 (337nm) et les porphycènes.

2. Les photosensibilisants non porphyriniques⁵¹

a) Quinones

Les quinones sont obtenues de source naturelle ou par synthèse chimique

(1) Anthraquinones

Les anthraquinones (*Figure 16*) 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 intermoléculaires, le solvant, la concentration... Les propriétés photophysiques et photochimiques des

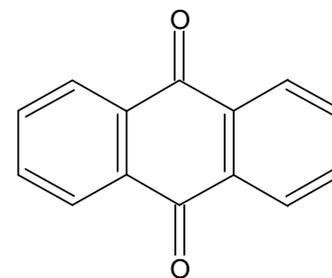


Figure 16 : Anthraquinone

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 perylènequinones (*Figure 17*), il est possible de les obtenir de certains sols ou d'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.

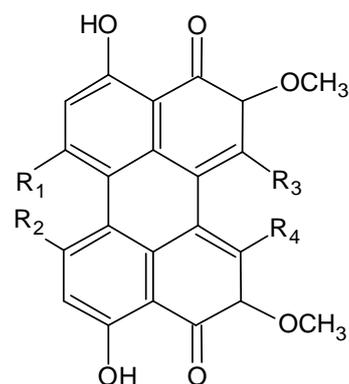


Figure 17 : Perylenequinone

(3) Hypericine

L'hypericine (*Figure 18*) est connue comme agent photodynamique depuis une quarantaine d'années, mais c'est récemment que son utilisation anticancéreuse et antivirale a été étudiée^{52,53}.

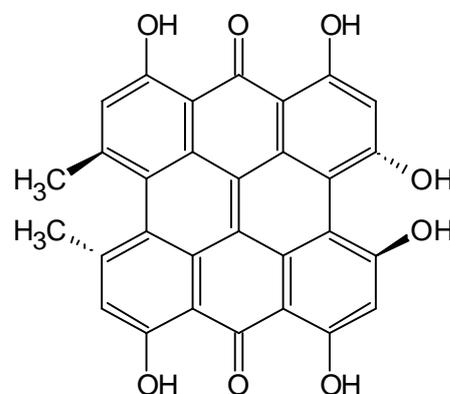


Figure 18 : Hypericine

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 19*) et de ses dérivés comme le rose bengale, l'éosine et l'érythrosine ont été largement étudiées^{54,55} en particulier pour la photo-inactivation de micro-organismes (bactéries

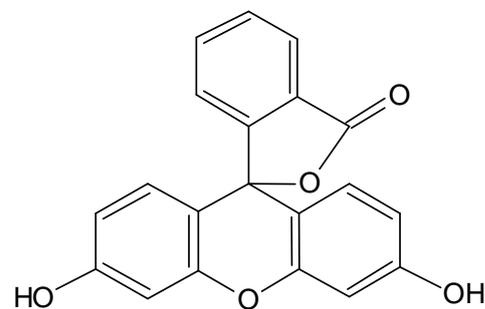


Figure 19 : Molécule de fluorescéine

ou levures)⁵⁶. Le Rose Bengale est un photosensibilisant connu pour avoir un très fort rendement d'oxygène singulet (0,8 dans l'eau). Bien que très soluble dans l'eau son noyau xanthène lui permet de se positionner dans les bicouches lipidiques⁵⁷ où il peut induire une phototoxicité.

(2) Rhodamine

Les rhodamines sont utilisées comme colorants pour les lasers et comme agents photothérapeutiques potentiels. La plus importante est la rhodamine 123 (Figure 20). 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, ce qui explique son utilisation pour marquer les mitochondries des cellules vivantes.

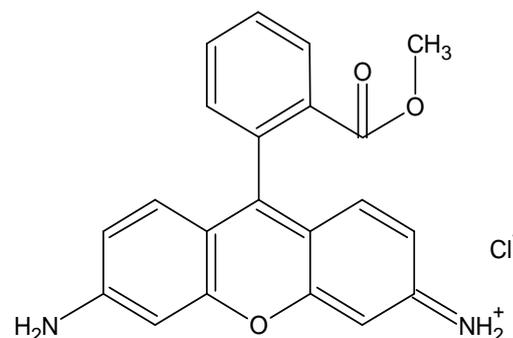


Figure 20 : Molécule de rhodamine

c) Cyanines

A l'origine, les cyanines ont été développées pour les émulsions photographiques, mais elles ont été décrites comme des agents diagnostiques et photothérapeutiques prometteurs. 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, cf. Figure 21) pour différents types de cellules normales ou néoplasiques et de virus ont été exploitées pour la purge sélective de cellules leucémiques dans le cadre de la greffe de moelle autologue. Cependant son absorption aux courtes longueurs d'ondes limite ses applications aux tumeurs superficielles, ou aux applications *ex vivo* de la PDT (purge de moelle).

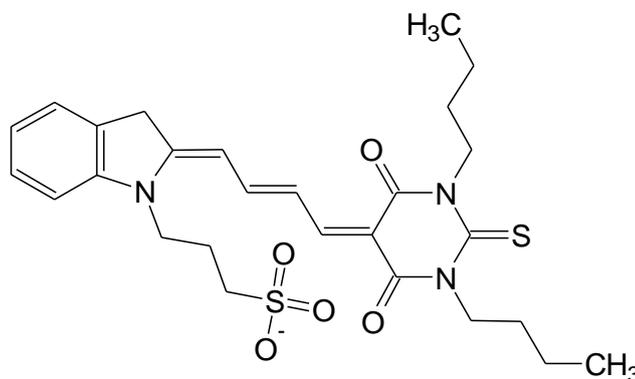


Figure 21 : Molécule de mérocyanine 540

(2) Autres

A la différence de la MC540, la plupart des cyanines utilisées en PDT sont des composés qui sont chargés positivement quand ils sont ionisés, et qui se situent préférentiellement dans les mitochondries.

Les kryptocyanines ont une haute sélectivité tumorale, une forte absorption dans le rouge, une toxicité minimale à l'obscurité, une faible photosensibilité de la peau et un seul mode d'action, ce qui en fait 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 cationiques dont les propriétés photochimiques ont été rapportées : les colorants phénoxanine, phénothiazine (comme le bleu de méthylène), naphthalimide, colorants oxaziniques (bleu du Nil) et l'acridine. Les colorants thiazidines et l'acridine ont été les premiers agents utilisés en PDT antivirale.

e) Terpènes

L'Azulène, un monoterpène, est utilisé pour la photochimiothérapie antibactérienne en dentisterie.

f) Psoralènes (furocoumarines)

L'angelicine est présente dans des plantes (ombellifères) et a été proposée, ainsi que ses dérivés, pour le traitement du psoriasis après irradiation avec des UV-A⁵⁸. Cet agent est suspecté d'être cancérigène.

Nous citerons enfin d'autres composés, assez peu étudiés mais identifiés par R.W. Redmon et J.N. Gamlin²⁵ comme pertinents en biologie et de ce fait cités comme exemples de photosensibilisants dans les brevets concernant la photochimiothérapie:

Les coumarines (composés aromatiques d'origine végétale aux propriétés anticoagulantes), les fullerènes (molécules carbonées sphériques), les phénols, les perylènequinones et la cercosporine (phytotoxines), la curcumine (épice), la sanguinarine et la berbérine (alcaloïdes issus de végétaux), le thiophène (hétérocycle présent dans le pétrole).

g) Médicaments

La photoréactivité est également un effet secondaire de certains médicaments, dont les structures sont apparentées aux composés cités précédemment:

Antipaludéens (quinine et dérivés : chloroquine, primaquine, quinacrine ; amodiaquine, doxocycline, mefloquine), anti-inflammatoires non stéroïdiens (dérivés de l'acide aryl-propioniques : carprofène, kétoprofène, védaprofène, benaxoprofène ; acide tiaprofénique, nabumetone, naproxène, piroxicam), antibiotiques (tétracyclines, anthracyclines, quinolones et fluoroquinolones), antiseptiques (mercurochrome), anticancéreux (adriamycine, gilyvocarcine), sédatifs (afloqualone, chlorpromazine), diurétiques (furosémide), antihistaminiques (mequitazine). Comme nous le démontrerons plus loin, de nouveaux anticancéreux bientôt sur le marché (indirubines) sont également photoréactifs.

3. *Photosensibilisants endogènes*

La longue liste des photosensibilisants ci-dessus ne serait pas complète si nous ne citons pas les photosensibilisants endogènes présents dans la peau humaine. Ils sont majoritairement responsables d'une part de l'activité de la photothérapie qui a donné naissance à la photochimiothérapie et d'autre part des phénomènes de stress oxydant, de vieillissement et de carcinogénèse cutanés photoinduits. La photoréactivité de certains composés est connue de longue date, mais leur implication n'a été jusqu'à présent que peu décrite, sans doute du fait de leur diversité et de leurs bandes d'absorption situées souvent dans le domaine des UV-A (315-400 nm), alors que les études concernant les dommages cutanés photoinduits se sont d'abord intéressées aux effets des UV-B (280-315 nm) et UV-C (100-280 nm) plus énergétiques. Les UV-A sont pourtant les radiations à la fois les plus importantes quantitativement au niveau de la peau (environ 95% des rayonnements UV incidents car ils sont moins filtrés ou diffractés par l'atmosphère et non filtrés par le verre qui absorbe les longueurs d'onde inférieures à 320 nm) et celles qui pénètre le plus profondément (50% des UV-A atteignent le derme alors que moins de 14% des UV-B traversent l'épiderme⁵⁹ ; leur implication dans la cancérogénèse est maintenant reconnue⁶⁰ tout en restant plus modérée que celle des UVB.

Les photosensibilisants endogènes pourraient même être à l'origine de la très contestée photoréception extra-oculaire chez l'homme^{61,62}.

Parmi les photosensibilisants cutanés nous retrouvons bien sûr les porphyrines (uroporphyrines, coproporphyrines, protoporphyrine IX, bilirubine, eumélanine, phéomélanine), groupe que nous avons déjà décrit ; notons que l'intégration de l'ion Fe^{2+} au sein de la structure tétrapyrrolique de la PpIX pour former l'hème bloque normalement sa photoréactivité, sauf en cas de déficit en

ferrochélatase, ce qui est le cas dans la plupart des cellules cancéreuses et dans les cellules de patients atteints de porphyrie érythropoïétique. Nous pouvons également citer la bilirubine et la verdine (pigment biliaire, tétrapyrrolle linéaire), la mélanine et ses précurseurs, les flavines (vitamine B₂, FAD), les ptérines (comme la 6-formyl-ptérine formée à partir de l'acide folique par photolyse ou dans certains cancers), la pyridoxamine (vitamine B₆), la vitamine K₃, le NAD(P)H, l'acide trans-urocanique (dérivé de l'histidine), le tryptophane et ses dérivés, ainsi que les acides nucléiques et les bases azotées (adenosine, cytosine, guanine et dérivés, thymine et dérivés, uracile)⁶³. Tous ces composés produisent de l'oxygène singulet sous flux lumineux, ce qui a pu être directement vérifié expérimentalement⁶⁴, et leur photoréactivité induit des désactivations d'enzymes (par destruction de certains de leurs acides aminés), des oxygénations des acides nucléiques, et des altérations membranaires (par oxygénation des acides gras insaturés et du cholestérol). Leur rôle n'est pas pour autant univoque, puisque, par exemple, les mélanines sont des pigments photoprotecteurs, et que l'acide trans-urocanique ou la bilirubine liée à l'albumine ont été décrits comme désactivateur (« quencher » en anglais) de l'oxygène singulet⁶⁵.

C. Les réactions photochimiques

La cytotoxicité de la PDT est due à la photo-oxygénation de substrats organiques en présence d'oxygène. Le produit primaire de ces réactions est le plus souvent un hydroperoxyde ou un peroxyde, correspondant à l'incorporation, selon différents mécanismes, d'une molécule de dioxygène dans une molécule organique, qui devient ainsi instable, puis non fonctionnelle. Les mécanismes de ces réactions en biologie ont été décrits par Christopher Foote⁶⁶.

Le photosensibilisant est converti en un état électroniquement excité par absorption d'un photon. L'espèce initiale est un état singulet de courte durée de vie qui, très souvent, subit une conversion intersystème et donne naissance à un état triplet de plus longue durée de vie. Ces états sont impliqués dans les deux mécanismes différents qui ont été décrits pour les photo-oxydations (*Figure 23*):

Dans les réactions de type I, l'état triplet du sensibilisant interagit directement avec le substrat pour donner naissance à une paire de radicaux libres, suivant un mécanisme de transfert d'électron ou d'un atome d'hydrogène. Les radicaux produits réagissent avec l'oxygène pour régénérer le sensibilisant et former des radicaux peroxydes ou l'ion superoxyde O₂^{•-}.

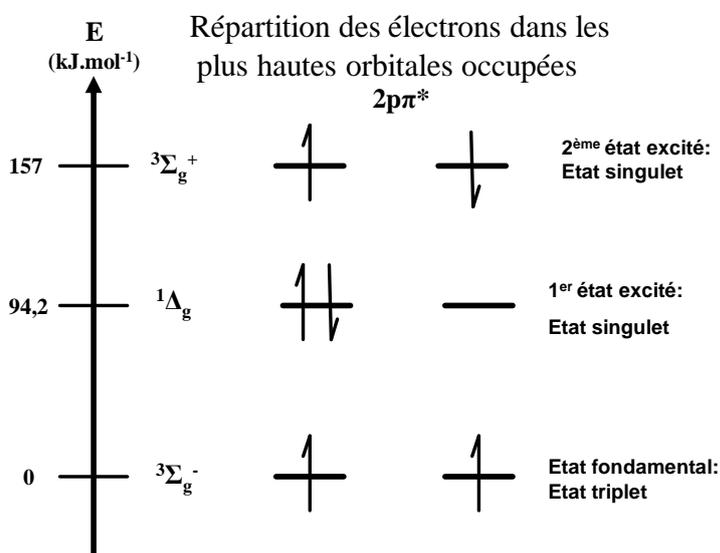
Les réactions de type II mettent en jeu l'interaction de l'état excité du sensibilisant directement avec l'oxygène pour former de l'oxygène singulet par transfert d'énergie. Cette espèce, très électrophile, réagit avec de nombreux substrats ce qui explique sa toxicité en biologie.

1. Type I

Il est établi depuis les années 1940 que les radicaux libres jouent un rôle majeur dans l'action biologique des radiations ionisantes. En 1968, Gollnick a postulé que l'effet anti-tumoral de la PDT peut être initié par des réactions radicalaires⁶⁷, ce qui a été confirmé quelques années plus tard⁶⁸. 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 par transfert d'électrons ou de proton. La majorité de ces radicaux réagissent immédiatement avec l'oxygène pour former des espèces réactives de l'oxygène (en anglais ROS pour Reactive Oxygen Species) comme l' $O_2^{\cdot-}$, l' H_2O_2 et l' $\cdot OH$, capables d'oxyder une grande variété de biomolécules^{69,70}. En général les structures moléculaires qui sont rapidement oxydées (phénols, amines...) ou réduites (quinones...), favorisent les réactions de type I. Ces réactions radicalaires sont également favorisées en conditions anaérobies, et inversement elles peuvent être inhibées au profit des réactions de type II en appliquant de fortes concentrations en O_2 .

2. Type II

Ce type de réaction conduit à la production d'oxygène singulet. Nous allons préalablement présenter cette espèce originale. Les différents états excités ou fondamentaux de dioxygène dépendent de la configuration électronique des 2 derniers des 16 électrons de cette molécule qui sont situés sur les deux plus hautes orbitales occupées, deux orbitales antiliantes de même énergie ($2p\pi^*$, dites « dégénérées »). La règle de Hund énonce que lorsque plusieurs orbitales



D'après M. Barberi-Heyob & coll., l'actualité chimique N° 308-309, mai-juin 2007

Figure 22 : Répartition des électrons externes d'une molécule de dioxygène

sont dégénérées (même valeur de E_i), les électrons occupent d'abord le maximum d'orbitales possibles et ils prennent des spins identiques. Cela signifie que dans son état fondamental le

dioxygène possède deux électrons de même spin sur 2 orbitales différentes (Figure 22). Lorsque la somme des spins des électrons est non nulle (ici $+1/2 +1/2$) la molécule est dans un état triplet ; si les spins s'annulent ($-1/2 +1/2$) la molécule est dans un état singulet. Cet état triplet fondamental du dioxygène, qui l'apparente à un di-radical a pour conséquence que la molécule de dioxygène est paramagnétique⁷¹ (c'est un dipôle capable de s'orienter dans un champ magnétique). Elle ne peut réagir directement avec les composés organiques, dont l'état fondamental est singulet (électrons appariés) dans les conditions habituelles. Elle est capable de se combiner avec des radicaux « libres » carbonés (électrons célibataires).

Lorsque la molécule de dioxygène n'est pas dans son état fondamental stable, il existe deux possibilités d'états excités (Figure 22) notés $^3\Sigma_g^+$ et $^1\Delta_g$ qui sont « singulets » car les électrons ont alors des spins anti-parallèles. On admet que $^3\Sigma_g^+$ subit une conversion extrêmement rapide vers l'état $^1\Delta_g$. Cet état que l'on appelle communément "Oxygène Singulet" (1O_2) confère à la molécule de dioxygène une grande réactivité du fait de son électrophilie. L'oxygène singulet participe ainsi notamment à des réactions de type « Diels-Alder » (réaction avec un diène pour former une liaison peroxy). Nous verrons plus loin les conséquences de cette réactivité en biologie.

K. R. Weishaupt a postulé⁶⁸ en 1976 que l'interaction de photosensibilisants à l'état triplet excité pouvaient interagir avec l'oxygène moléculaire et générer de l'oxygène singulet (1O_2). La plus commune des réactions de type II implique le transfert de l'excitation du photosensibilisant vers le dioxygène. Cette réaction est très rapide et est la plus fréquente dans les phénomènes de désexcitation 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

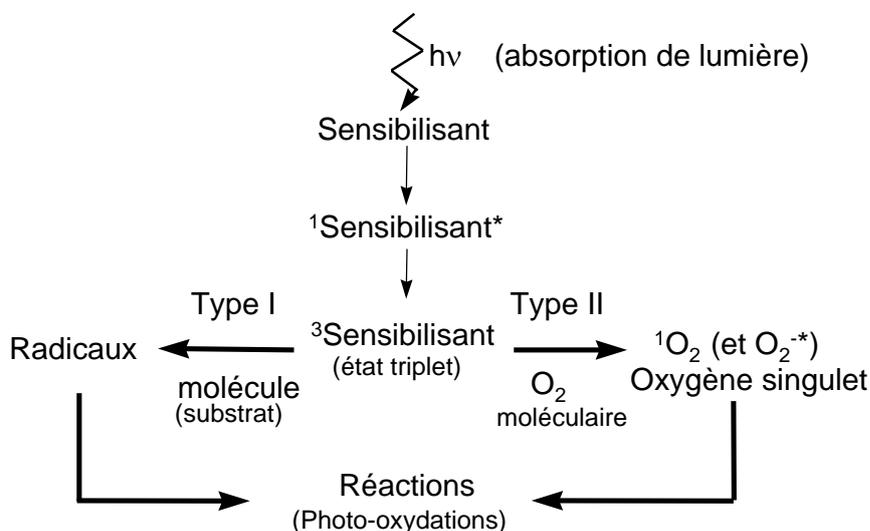


Figure 23 : Réactions photochimiques résultant de l'état triplet du sensibilisant

superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Ce phénomène de transfert d'électron est cependant très rare, moins de 1 sur 100 des phénomènes de désactivation de l'état triplet avec l'oxygène⁶⁶.

La réaction de l'oxygène singulet avec les cibles intracellulaires entraîne une destruction des membranes cellulaires, des mitochondries, des lysosomes, et/ou des membranes nucléaires, et induit une nécrose du tissu ciblé.

Les réactions de type I et II que nous venons de décrire conduisent à la formation de peroxydes ou d'hydroperoxydes instables qui subissent une rupture homolytique ou hétérolytique et peuvent ainsi initier des réactions en chaîne d'oxydations radicalaires. Il est très difficile de prévoir la cascade de réactions chimiques qui découlent de cette initiation, du fait de la grande complexité chimique du milieu réactionnel, d'autant plus que la nature de ce milieu change en fonction de l'organe traité, en fonction des circonstances pathologiques et au cours du temps. Intervient également la localisation des photosensibilisants, dans le milieu extra-cellulaire, les membranes ou les organites, qui est conditionnée par leurs caractéristiques physico-chimiques. Enfin, les réactions de photo-oxydation dépendent largement de la concentration en oxygène du milieu. Or, la pression partielle en oxygène varie en fonction de la nature des tissus, et décroît rapidement jusqu'à s'annuler pendant l'irradiation d'une thérapie photodynamique⁷². Il en découle que les réactions de type I sont progressivement favorisées au cours de l'irradiation au détriment des réactions de types II, favorisant les réactions radicalaires consécutives⁷³. La vascularisation de l'organe traité permet de compenser partiellement la déplétion en oxygène induite par les réactions photochimiques, mais comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, l'occlusion des vaisseaux sanguins est un des modes d'action de la photochimiothérapie. Toutes ces considérations ont amené différentes équipes à préconiser soit des irradiations continues avec de faibles fluences mais très longues, ou au contraire des irradiations au moyen de lasers pulsés. Il n'y a pas encore aujourd'hui de consensus sur la meilleure méthode, qui dépend probablement de l'indication ciblée. Quoiqu'il en soit, la photochimiothérapie est un traitement puissant qui entraîne la destruction du tissu ciblé.

Les espèces oxydantes formées, notamment l'oxygène singulet, sont d'ailleurs tellement actives, qu'elles vont dégrader le photosensibilisant lui-même, par oxydation des doubles liaisons conduisant à une rupture des macrocycles, et à une diminution de l'absorbance (connue sous le nom de « bleaching ») et de la fluorescence.

D. Aspects cellulaires de la PDT des cancers

1. PDT et mort cellulaire

La PDT induit deux types de mort cellulaire, l'apoptose et la nécrose.

a) Apoptose

L'apoptose est une mort cellulaire génétiquement programmée et un processus essentiel à la formation et au renouvellement physiologique des tissus, également impliqué dans des phénomènes pathologiques⁷⁴⁻⁷⁶. Schématiquement, l'apoptose se déclenche lorsque la cellule subit des dégâts non réparables, ou reçoit de la part de l'organisme un signal de mort. Les mécanismes de déclenchement et de régulation de l'apoptose sont des phénomènes complexes, qui font intervenir des récepteurs membranaires comme le récepteur T, la protéine Fas, les récepteurs du transforming growth factor-Beta (TGF- β , facteur d'inhibition de la croissance cellulaire) et du tumor necrosis factor (TNF) pour la voie dite « extrinsèque », ainsi que des protéines de la famille Bcl-2 (pro-apoptotiques comme Bax, Bak, Bcl XS, Bok, Bad, Bik, Bim, Hrk, Blk, BNIP3..., ou anti-apoptotique comme Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, A1/Bfl1, Boo...) situées dans les membranes des mitochondries, du réticulum endoplasmique et du noyau ou dans le cytoplasme, pour la voie « intrinsèque ». L'apoptose se caractérise par une dégradation du cytosquelette qui fait perdre à la cellule sa polarité, la détache de ses voisines, l'arrondit et diminue son volume, et une désintégration de l'enveloppe nucléaire avec fragmentation de l'ADN. La polarité phospholipidique de la membrane cellulaire est perdue, avec passage de la phosphatidylsérine du feuillet interne au feuillet externe (ce qui permet sa détection expérimentale au moyen d'annexine V). La mort par apoptose conduit finalement à la fragmentation de la cellule qui va former des corps apoptotiques dotés d'une membrane intacte contenant des organelles, des fragments nucléaires et du cytoplasme. Ces corps apoptotiques sont rapidement phagocytés du fait de l'exposition sur la face externe des membranes de lipides et de sucres normalement situés en face interne. L'apoptose, aussi massive soit-elle au sein d'un tissu, ne génère pas d'inflammation.

b) Nécrose

La nécrose en revanche est un phénomène toujours pathologique, passif, immédiat et non programmé. Il se caractérise par un gonflement de la cellule et des organites, conduisant à une lyse membranaire et à une libération du contenu cytoplasmique et des enzymes lysosomiales notamment, ce qui entraîne une inflammation⁷⁷. Expérimentalement, l'iodure de propidium, un agent intercalant fluorescent, permet de marquer le noyau des cellules en nécrose du fait de la perméabilité des membranes.

Le type de mort cellulaire induite par la PDT dépend :

- de l'intensité du traitement photochimique⁷⁸. La nécrose est d'autant plus importante que le traitement est intense.
- de la localisation du photosensibilisant dans la cellule⁷⁹. L'apoptose est favorisée par les sensibilisants cationiques qui se situent préférentiellement dans les mitochondries, la nécrose par des sensibilisants se localisant dans la membrane plasmique (sensibilisants lipophiles) et les lysosomes (sensibilisants hydrophiles).
- de la densité cellulaire *in vitro*⁸⁰. Dans le cas d'un traitement modéré (mortalité cellulaire $\leq 40\%$), l'apoptose prédomine quand la densité cellulaire est forte, et la nécrose quand elle est plus faible.

La destruction tumorale par nécrose présente l'inconvénient d'induire une inflammation, avec des conséquences éventuellement générales en fonction de son intensité, mais a l'énorme avantage de permettre la destruction de cellules cancéreuses chimiorésistantes ou radiorésistantes, car les mécanismes de résistance à l'apoptose ou de réparation de l'ADN impliqués dans ces résistances sont inefficaces face à une destruction des membranes.

2. Mode d'action cellulaire de la PDT

a) Localisation des photosensibilisants

L'importance de la localisation du photosensibilisant est d'autant plus grande que les ROS produits, très réactifs, ont une action très locale. La localisation subcellulaire des photosensibilisants (lysosomes, mitochondries, et/ou membranes cellulaires) dépend essentiellement de leur nature et de la lignée cellulaire étudiée^{79,81}. 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. Quelque fois, l'irradiation peut mener à une relocalisation du photosensibilisant^{82,83}. Certains composés sont très sélectifs en terme de localisation, comme les porphyrines cationiques pour les membranes⁸⁴, la lysyl chlorine p6⁸⁵ pour les lysosomes et le porphycène pour les mitochondries⁸⁶. Les sensibilisants ne s'accumulent pas en revanche dans le noyau, et, l'oxygène singulet ayant un faible rayon d'action, c'est la raison généralement avancée pour

expliquer la très faible capacité de la PDT à altérer l'ADN et à induire des mutations⁸⁷. Il est de même généralement admis que les photosensibilisants qui ne sont pas captés par les cellules sont inefficaces, même s'ils ont un très fort rendement de production d'oxygène singulet⁸⁸. Cela se vérifie expérimentalement (cf. Discussion), mais des observations originales^{89,90}, ainsi que des expériences faites dans le laboratoire et impliquant seulement du rose bengale et du sérum⁹¹, tendent à démontrer qu'il ne faut pas négliger les photoréactions survenant dans le milieu extracellulaire.

b) Espèces réactives produites par la PDT

La photochimiothérapie agit et détruit les cellules cancéreuses grâce aux oxydants puissants qu'elle produit et que nous allons présenter.

(1) Oxygène singulet

L'oxygène singulet, $^1\text{O}_2$, actif a une durée de vie très courte dans les cellules, d'environ $3 \mu\text{s}$ ⁹². Cette valeur, obtenue par mesure directe de la phosphorescence à 1270 nm de cette espèce, est toutefois très supérieure aux estimations précédentes tirées de mesures indirectes⁹³. Sa durée de vie estimée dans les lipides est de $30 \mu\text{s}$, mais du fait de son absence de charge et donc de sa grande capacité à diffuser, on estime qu'après $1 \mu\text{s}$ l' $^1\text{O}_2$ formé dans des lipides membranaires est passé dans le milieu aqueux cellulaire. Son rayon d'action serait ainsi d'environ 100 nm. Comme nous l'avons vu, l'oxygène singulet peut réagir avec à peu près n'importe quelle double-liaison carbone-carbone, et donc oxyder tous les substrats biologiques qui en possèdent... La rupture homolytique ou hétérolytique secondaire des espèces formées génère des espèces RO^\bullet , RO_2^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, HO^\bullet ... que nous allons décrire ci-dessous.

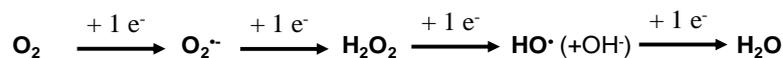


Figure 24 : Étapes de la réduction du dioxygène

Bien que l' $^1\text{O}_2$ soit la principale espèce oxydante en PDT, d'autres espèces réactives de l'oxygène (cf. *Figure 24* et *Figure 26*), générées indirectement soit à partir de l' $^1\text{O}_2$ soit à partir des réactions de type I, doivent être prises en compte pour décrire les dommages cellulaires de la PDT.

(2) Radical Hydroxyle

Le radical hydroxyle HO• est un oxydant très puissant, d'une part parce que son potentiel redox standard est très élevé (Figure 26) et d'autre part parce que ses constantes de vitesse de réaction avec les substrats organiques (acides aminés, acides nucléiques, acide gras...) sont énormes (par exemple $3,6 \times 10^{10} \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L} \cdot \text{s}^{-1}$ avec l'hémoglobine), ce qui signifie que le radical hydroxyle réagit avec la première molécule qu'il rencontre, sans nécessité d'apport énergétique. Il diffuse donc très peu (quelques nanomètres) et sa durée de vie est très faible (quelques microsecondes). Les radicaux hydroxyles sont susceptibles d'oxyder un substrat selon 3 modes d'action (cf. Figure 25).

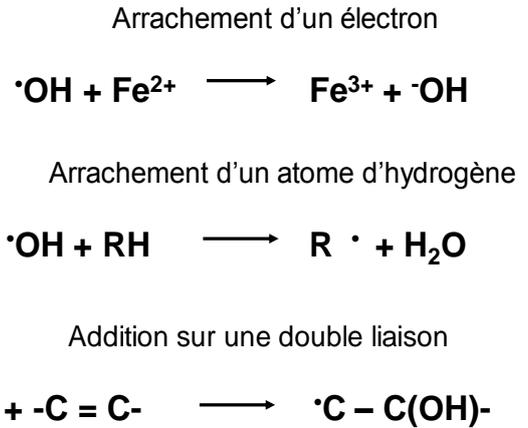
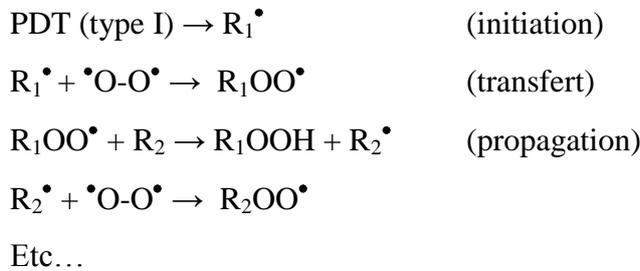


Figure 25 : Réactions impliquant le radical hydroxyle

(3) Radicaux libres carbonés

La formation de radicaux libres R• en présence de dioxygène conduit à l'initiation de réactions radicalaires :



(4) Anion superoxyde

L'anion superoxyde, O₂^{•-}, qui peut également être produit physiologiquement par réduction univalente du dioxygène (dans les granulocytes neutrophiles et macrophages à des fins bactéricides ou comme intermédiaire dans la chaîne respiratoire mitochondriale) est une espèce non diffusible (chargée) et impliquée dans 2 couples oxydo-réducteurs liés à l'oxygène (Figure 26). Il peut être à l'origine de réactions radicalaires, d'oxygène singulet⁹⁴, de peroxyde d'hydrogène en présence de super oxyde dismutase (SOD)

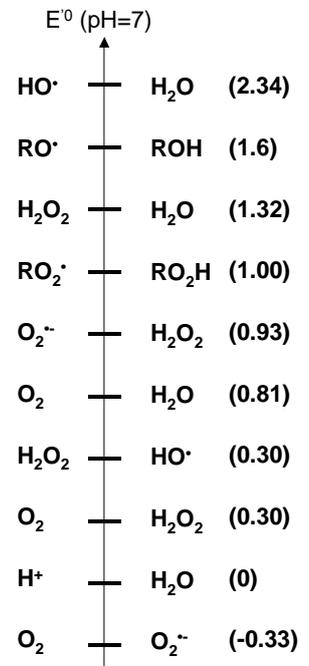


Figure 26 : couples d'oxydo-réduction lié à l'oxygène, et potentiels redox standards

(Figure 27). Toutefois, en dépit de ses potentiels redox qui indiquent que les réactions d'oxydo-réduction sont thermodynamiquement favorisées, les constantes de vitesse avec les substrats biologiques sont très faibles⁹⁵ et l'on fait donc l'hypothèse d'une toxicité indirecte passant notamment par la formation de radical hydroxyle selon la réaction d'Haber-Weiss (Figure 27).



Réaction d'Haber-Weiss

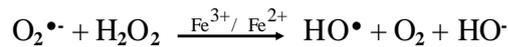


Figure 27 : Réactions impliquant l'anion superoxyde

(5) Radicaux peroxydes et alkoxydes

Les radicaux peroxydes RO_2^{\bullet} sont, sur un plan thermodynamique et cinétique de bons oxydants, tout en restant moins agressifs que HO^{\bullet} . Ils peuvent arracher directement un électron ou un atome d'hydrogène, participer à une réaction en chaîne radicalaire (cf. (3)), s'additionner sur des doubles liaisons carbone-carbone pour former des endopéroxydes radicalaires (ROOR^{\bullet}), se décomposer ($\text{R} + \text{O}_2^{\bullet-}$) ou réagir avec d'autres radicaux. Leur durée de vie est estimée à quelques secondes. Les radicaux alkoxydes (RO^{\bullet}) réagissent de la même manière, mais sont encore plus oxydants (potentiel redox et constantes cinétiques supérieurs), et réagissent en quelques microsecondes⁹⁶.

(6) Peroxyde d'hydrogène

Le peroxyde d'hydrogène (« eau oxygénée »), H_2O_2 peut se dismuter en dioxygène et en eau grâce à l'enzyme catalase, ou oxyder le glutathion. Sa toxicité reposerait principalement sur sa capacité à former le radical hydroxyle selon la réaction de Fenton :

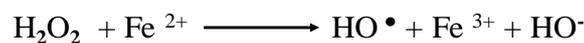


Figure 28 : Réaction de Fenton

Le peroxyde d'hydrogène est relativement stable par rapport aux autres espèces et a la capacité de diffuser au travers des membranes.

c) Cibles cellulaires de la PDT

Tous les ROS que nous venons de décrire sont donc susceptibles de réagir avec la quasi-totalité des substrats biologiques selon les réactions citées. Les conséquences fonctionnelles sont liées à leur action sur :

- *La membrane plasmique* : son altération morphologique (boursouffure, fuites cytoplasmiques), est le premier effet observable (après quelques secondes) en microscopie lors d'un traitement par photochimiothérapie^{77,97}.

Les lipides : Les ROS oxydent les double-liaisons des lipides, éventuellement selon des réactions en chaîne (cf. *b)(3)*). Les conséquences sont autant physiques (modification de la perméabilité, rigidification des membranes), que biochimiques : dépolarisation membranaire, dénaturation des acides gras polyinsaturés des phospholipides membranaires qui normalement sont les précurseurs des prostaglandines. Par ailleurs, les LDL oxydés sont capables d'induire des augmentations des courants calciques dans les cellules, et d'induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires.

- *Les mitochondries* : elles subissent une inactivation des divers constituants de la chaîne respiratoire (cytochrome C, succinodéshydrogénase, etc.) ainsi qu'une perméabilisation de leur membrane anihilant le gradient nécessaire à la synthèse d'ATP.

- *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.

- *Les acides nucléiques* : il a été reconnu que la PDT pouvait être génotoxique et endommager les acides nucléiques⁹⁸⁻¹⁰⁰. La guanine (base purique) est la principale cible détruite par photo-oxydation 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 observées. Les tests classiques (Ames...) ne sont pas adaptés pour mesurer l'impact de la PDT sur l'ADN, car ils ne tiennent pas en compte du facteur lumière, et il faut avoir recours à des tests plus spécialisés comme le test des comètes^{101,102}.

- *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 photo-oxydation et leur destruction a pour conséquence la désactivation d'enzymes. On observe des pontages intra- et inter-protéines, des changements de conformation, des modifications de charge, des fragmentations, conduisant à l'altération structurale et fonctionnelle de protéines de structure ou d'enzymes^{81,103}. Les protéines oxydées sont non fonctionnelles et dégradées par le protéasome.

- *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^{104,105}.

- Les voies de signalisation intra-cellulaires :

Depuis une dizaine d'année, le rôle des ROS dans la transduction et l'amplification et la régulation du signal au niveau cellulaire est de plus en plus décrit. Nous ne détaillerons pas ce point, mais il faut savoir que les ROS sont générés comme seconds messagers par des récepteurs aux cytokines, des récepteurs tyrosine/sérine/thréonine kinases, des récepteurs couplés aux protéines G, des récepteurs couplés à des canaux ioniques. Ils sont également capables d'activer des récepteurs ou des protéines kinases en favorisant leur phosphorylation, d'inhiber les phosphatases, d'activer des facteurs de transcription...¹⁰⁶ D'autre part, on observe une augmentation rapide du calcium intracellulaire après la PDT¹⁰⁷, amplifiée par la perméabilité membranaire induite au niveau des mitochondries et du reticulum endoplasmique. Les ROS agissent donc physiologiquement à tous les niveaux cellulaires (membranes, cytosol, mitochondrie et noyau), et leur production massive par photochimiothérapie est donc susceptible de complètement dérégler le fonctionnement cellulaire.

E. Sélectivité tumorale des photosensibilisants

Le but de tous les traitements anticancéreux est de détruire sélectivement les cellules tumorales, en épargnant autant que possible les cellules saines. Pour cela, il est nécessaire d'identifier des caractéristiques communes aux cellules tumorales qui les distinguent des cellules saines, y compris celles de l'organe où le cancer s'est formé, ce qui est particulièrement difficile du fait de l'extrême hétérogénéité et plasticité des cellules cancéreuses. Il est par exemple possible de cibler les cellules en division, ou les cellules ayant une surconsommation de nutriments, mais les cellules cancéreuses hypoxiques notamment y échappent et les effets toxiques sont importants. Les traitements locaux, chirurgie, curiethérapie, administrations topiques d'anticancéreux... sont souvent inefficaces vis-vis des « cordons » de cellules cancéreuses infiltrant les tissus sains. Beaucoup d'équipes essayent d'identifier des antigènes spécifiques de tumeurs ; cela a donné lieu à de très nombreuses publications, et les anticorps monoclonaux spécifiques sont utilisés aussi bien pour la vectorisation d'agents chimiothérapeutiques que de radio-éléments. En thérapie cellulaire on essaie d'amplifier des populations de lymphocytes reconnaissant ces antigènes. Hélas les résultats sont encore limités, du fait de l'hétérogénéité d'expression de ces antigènes et des capacités d'échappement des cellules tumorales au système immunitaire qui ont précisément permis le développement du cancer. Nous n'allons pas détailler ici toutes les

stratégies qui ont été développées pour parvenir à une sélectivité d'un traitement anticancéreux, mais nous souhaitons souligner que la capacité des photosensibilisants à s'accumuler dans les tissus néoplasiques est un aspect particulièrement intéressant de la PDT. C'est également l'un des plus difficiles à expliquer. Toutefois, l'absence de consensus sur les raisons de cette accumulation préférentielle des photosensibilisants dans les tissus tumoraux ne doit pas occulter que c'est un fait observable, connu depuis les débuts de la PDT (cf. A), à la base du photodiagnostic, observable directement par fluorescence (cf. Résultats) ou après marquage radioactif¹⁰⁸. L'équipe de H. Kostron a observé dans une tumeur greffée chez le rat une quantité de m-THPC marquée au Carbone-14 80 fois supérieure à celle observée dans le tissu cérébral sain¹⁰⁹. La sélectivité de la PDT a été proposée pour améliorer la pénétration tumorale d'anti-cancéreux¹¹⁰.

Parmi les mécanismes décrits comme participant à l'accumulation tumorale des photosensibilisants, nous pouvons citer, sachant que l'effet observé résulte probablement de leur association :

- l'importante perméabilité de la vascularisation tumorale¹¹¹
- un drainage lymphatique diminué¹¹¹
- un pH acide (lié à une anaérobiose) au sein de la tumeur¹¹²
- une synthèse accrue de collagène (qui fixe les porphyrines)¹¹³
- la présence de macrophages¹¹⁴
- une grande quantité de lipides (favorisant les sensibilisants lipophiles qui ont la meilleure sélectivité) dans la tumeur¹¹⁵
- une surexpression des récepteurs aux LDL par les cellules tumorales^{116,117}
- des interactions favorables entre cellules tumorales et sensibilisant liées à la taille, la charge, la structure de celui-ci
- un déficit en ferrochélatase (pour les porphyrines)¹¹⁸

Enfin, le moment auquel on choisit d'effectuer l'irradiation est particulièrement important: comme nous l'avons vu, la sélectivité de rétention des photosensibilisants n'apparaît qu'après un délai nécessaire à la distribution puis à l'élimination par les tissus sains, et diminue par la suite. Il faut donc choisir le moment optimal pour l'irradiation, sachant que l'on peut parvenir, avec le même composé, à un effet ciblant uniquement la vascularisation grâce à une irradiation effectuée quelques minutes après l'injection intraveineuse, ou à un effet dirigé contre les cellules tumorales en réalisant l'irradiation quelques heures ou quelques jours après l'injection.

Malgré cette sélectivité, de nombreuses équipes ont essayé de vectoriser les photosensibilisants.

Cette démarche a débuté avec le constat que la sélectivité tumorale des photosensibilisants était d'autant meilleure qu'ils étaient hydrophobes¹¹⁹. Comme l'administration intraveineuse nécessite une forme galénique relativement hydrosoluble, ces produits ont été encapsulés. Des spécialités incluant des photosensibilisants dans des nano-particules sont également à l'étude.

D'autres modifications ont été testées, comme une liaison à des anticorps, à des ligands se fixant préférentiellement sur les tumeurs (EGF, insuline, transferrine, GnRH, VEGF, oses...). Comme pour les autres stratégies anticancéreuses, l'utilisation de conjugués, qui sont de grandes molécules, se heurte à une complexité des synthèses, une stabilité réduite des produits, une toxicité systémique potentielle, et des possibilités de diffusion limitées¹²⁰.

F. Les applications cliniques

La photochimiothérapie a été proposée dans de nombreuses indications³, mais c'est en cancérologie qu'elle trouve le plus d'applications aujourd'hui. Les principaux photosensibilisants en phase d'évaluation clinique ainsi que leurs principales caractéristiques sont rappelés dans l'Annexe 1.

1. Les applications en Cancérologie

a) Les applications diagnostiques

Les propriétés de fluorescence des agents photosensibles peuvent être utilisées pour effectuer une photo-détection de cancers non visibles en lumière normale et ceci au moment du diagnostic ou durant une intervention chirurgicale (résection de tumeur assistée par fluorescence). Le Levulan[®] est par exemple utilisé pour la photo-détection du cancer de la vessie et analyse tumorale topographique pendant la résection de tumeurs malignes du cerveau. De même l'acide 5-aminolévulinique (Gliolan[®]) ou l'HPD permettent d'améliorer la qualité de l'exérèse chirurgicale des gliomes^{121,122} et le pronostic.

b) Les applications thérapeutiques

(1) Cancers

D'une manière générale, la photochimiothérapie est indiquée pour les tumeurs de faible volume, n'ayant pas formé de métastases, du fait de l'irradiation nécessaire : il n'est pas possible d'irradier une par une toutes les métastases, ni un fort volume tumoral, surtout si la tumeur présente une nécrose, une sclérose et des hémorragies, qui limitent la diffusion du sensibilisant et de la lumière. Notons qu'il est toujours possible de réaliser plusieurs irradiations en déplaçant le

dispositif d'irradiation, ou de retirer chirurgicalement l'essentiel de la masse tumorale et de traiter les marges de la plaie par PDT lorsque l'exérèse large n'est pas envisageable, comme c'est le cas en neurochirurgie. La PDT n'est pas limitée aux cancers cutanés, puisqu'une simple fibre optique (en général 1 mm de diamètre) permet l'irradiation, et que cette fibre peut être amenée au contact de la tumeur par une simple aiguille (cas du traitement des cancers de la prostate), ou au moyen d'un endoscope. Ceci est particulièrement intéressant lorsqu'on sait que la moitié des cancers sont diagnostiqués par endoscopie. Le choix d'utiliser la PDT pour traiter une tumeur est plus lié à la situation et à la morphologie de celle-ci qu'à sa nature histologique, ce qui explique que les critères d'inclusion des essais cliniques (source : NIH) que nous citons dans ce paragraphe sont surtout fondés sur des localisations cancéreuses. Notons enfin que la PDT agit sur les cancers de deux manières : d'une part en détruisant les cellules qui ont capté le sensibilisant, d'autre part en détruisant les vaisseaux sanguins qui se trouvent dans le champ d'irradiation et contiennent le photosensibilisant.

(a) *Cancers ORL*

La plupart de ces cancers se développent dans la cavité buccale et sont proches de structures vitales. Ces cancers sont donc souvent invalidants, et de mauvais pronostic. Ils sont traités par chirurgie et radiothérapie. Les possibilités thérapeutiques en cas d'échec sont limitées à des traitements palliatifs, chirurgie ou chimiothérapie, ayant pour but de réduire le volume tumoral et souvent très invalidants eux-mêmes³. Ces cancers sont particulièrement fréquents dans certains pays en voie de développement, en liaison avec des pratiques alimentaires : la mastication de la racine de Béthel en Inde, l'usage du khat au Yémen.

La PDT représente une alternative performante, et de plus tout à fait envisageable pour les patients n'ayant pas accès à d'autres traitements.

M. P. Copper *et coll.*¹²³ obtiennent une rémission complète avec la m-THPC pour 86% de 29 cancers classés T1-T2 N0 de la cavité buccale ou de l'oropharynx sans aucun déficit fonctionnel. Une résection chirurgicale sur ces lésions aurait obligé à une dissection et une résection aboutissant à une altération fonctionnelle majeure dans plus de 50% de ces cas. P. J. Lou *et coll.*¹²⁴ montrent dans une analyse rétrospective une régression dans 85 à 100% des cas avec une réponse complète dans 75% des cas et un recul de 2 ans pour les cancers précoces. Ces résultats sont comparables à ceux de la chirurgie, mais avec un coût et des effets indésirables nettement inférieurs. Le Photofrin[®] a une AMM au Japon pour cette indication. La m-THPC (Foscan[®]) est utilisé aux USA et en Europe (2001) pour le traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes récidivants.

(b) Gliomes

Il s'agit de tumeurs cérébrales que l'on peut classer en fonction des cellules gliales dont elles dérivent : épendymomes, astrocytomes et oligodendrogliomes, ou de critères morphologiques. Dans tous les cas, le cancer le plus agressif est le glioblastome (ou Astrocytome de grade IV). Il représente 50% des gliomes cérébraux ; la médiane de survie est de 12 à 15 mois après le diagnostic, même après les traitements associant chirurgie, radiothérapie et chimiothérapie qui sont utilisés actuellement^{125,126}. Du fait de sa situation anatomique, ce cancer se caractérise par un diagnostic tardif et des complications graves et rapides. Ainsi une masse de l'ordre de 100 grammes sera invisible, peut n'engendrer que des symptômes discrets (les déficits éventuels sont souvent compensés par l'autre hémisphère cérébral) mais rapidement entraîner le décès du patient. Par ailleurs, ces cancers ne métastasent pas mais sont très infiltrants, et nécessiteraient une exérèse chirurgicale large pour limiter les récives, ce qui n'est pas envisageable dans le cerveau. Dans la majorité des cas, le cancer récidive dans un rayon de 2 cm autour de sa localisation initiale¹²⁵. Enfin la barrière hémato-encéphalique, bien que souvent altérée au niveau de la tumeur, limite la diffusion de la plupart des agents cytotoxiques. La PDT donne des résultats très encourageants : S. S. Stylli et A. H. Kaye^{125,127,128} notamment, font état d'une survie à 2 ans de 41% (au lieu de 10%) sur environ 350 patients traités par PDT. En dehors de l'Australie, le Photofrin[®] a été utilisé pour des centaines de patients atteints de gliomes en Autriche¹²⁹ et au Japon¹²² notamment. Après injection du photosensibilisant par voie intraveineuse, la PDT peut être réalisée sans exérèse chirurgicale préalable, en implantant par stéréotaxie des fibres optiques dans la tumeur, ou après exérèse, en utilisant un ballonnet diffusant à l'extrémité de la fibre pour irradier les marges de la plaie. La deuxième méthode présente l'avantage de limiter l'œdème cérébral et l'augmentation de la pression intracrânienne qui sont les effets indésirables de la PDT dans cette indication et qui ne sont que partiellement contrôlés par les corticoïdes. Le retrait chirurgical d'une partie de la masse tumorale permet de réduire la quantité de tissu nécrosé par la PDT, et l'espace libéré réduit mécaniquement la pression intracérébrale.

(c) Cancers du poumon

En 2007 aux Etats-Unis¹³⁰, l'incidence des cancers du poumon et des bronches était estimée à 213 000 nouveaux cas, derrière celles des cancers génitaux et des cancers digestifs. 90% de ces cancers sont liés au tabagisme. Avec 160 000 décès estimés, les cancers du poumon représentent la première cause de mortalité par cancer. En général, ces cancers sont diagnostiqués trop tardivement pour être opérables. La classification OMS distingue les cancers « non à petites

cellules » comprenant les carcinomes épidermoïdes (50%), les adénocarcinomes (30%) et les carcinomes à grandes cellules (5%), et les « cancers à petites cellules » (15%). Le Photofrin[®] a une AMM pour cette indication aux Pays-Bas, en Allemagne, au Japon et en France. La N-aspartyl chlorine (Npe6) est en essai au Japon pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules et le Photochlor[®] en essais de phase I aux Etats-Unis.

(d) Cancers de l'œsophage

Ce cancer a une évolution souvent fatale (14 000 décès en 2007 pour 15 500 nouveaux cas aux Etats-Unis¹³⁰). Il s'agit soit de carcinomes épidermoïdes (90% des cas, principalement liés à la consommation de tabac et d'alcool), soit d'adénocarcinomes (10% des cas, lié à des reflux gastro-œsophagiens, cf. œsophage de Barrett (2)(b)). Les traitements font intervenir la chirurgie (très lourde dans ce cas), la radiothérapie et la chimiothérapie. La PDT est utilisée à des fins palliatives pour des patients non-opérables dont la lumière de l'œsophage est obstruée par le cancer. Le Photofrin a une AMM aux Pays-Bas au Japon, en France et aux Etats Unis. Des études ont montré que la PDT donnait des résultats équivalents mais plus durables qu'un traitement thermique au laser¹³¹.

(e) Cholangiocarcinomes et hépatocarcinomes

Les cholangiocarcinomes sont des tumeurs rares, diagnostiquées tardivement et survenant plus fréquemment chez les femmes de plus de 60 ans. Les traitements sont plutôt palliatifs avec introduction de stents pour limiter mécaniquement la cholestase³. La PDT a donné de bons résultats dans des études préliminaires (médiane de survie de 493 jours au lieu de 98) et des études cliniques de phase III sont actuellement en cours aux Etats-Unis avec le Photofrin^{®132}. Des études de phase II sont réalisées avec le Photofrin[®] pour des cancers gastro-intestinaux dont les hépatocarcinomes, et avec le Talaporfin[®] pour des métastases hépatiques de cancers colorectaux.

(f) Cancers cutanés

Ces cancers sont en général traités par chirurgie, qui a l'avantage de permettre un contrôle histologique de la lésion, mais se heurte à la difficulté de délimiter précisément la lésion, et peut être mutilante pour le patient. Dans cette indication, la PDT présente l'avantage d'être simple à réaliser et efficace, tout en ayant de bons résultats esthétiques.

Les carcinomes baso-cellulaires sont les cancers les plus fréquents (environ 70 nouveaux cas /100 000 habitants/an), ce qui est à mettre en relation avec des expositions solaires répétées et un allongement de la durée de vie. Ils sont heureusement de bon pronostic et ne métastasent pas. Ils

représentent l'indication la plus étudiée. Des essais cliniques de phase III sont en cours aux Etats-Unis avec le Metvix[®] et la Visudyne[®].

Dérivant également des kératinocytes et liés à l'exposition solaire, les carcinomes épidermoïdes (ou épithéliomas) sont moins fréquents, surviennent majoritairement sur des lésions précancéreuses (kératoses actiniques, maladie de Bowen) ou des plaies chroniques. Ils sont plus invasifs et susceptibles de métastaser. Aux Etats-Unis, le Photochlor[®] est en essai de phase I et le 5-ALA est en essai de phase II.

Enfin les mélanomes, qui dérivent des mélanocytes, sont des cancers invasifs, qui métastasent rapidement. Sur les 2000 décès dus aux cancers cutanés en France en 2003¹³³, 72% étaient liés à des mélanomes. Un essai clinique de phase I/II est en cours avec la Visudyne[®].

(g) Cancers de la prostate

Il s'agit d'un cancer très fréquent (219 000 nouveaux cas en 2007 aux USA, 27 000 décès), dont les facteurs de risque sont essentiellement génétiques. Les traitements reposent sur l'hormonothérapie, la radiothérapie, la chimiothérapie, la chirurgie. Du fait de la situation anatomique, les traitements curatifs (y compris la PDT) ont des effets indésirables lourds (impuissance, incontinence).

Le Tookad[®] (WST09) est en essais cliniques de phase II ou III dans différents pays pour le traitement des cancers de la prostate. Le WST11 est en phase II et le Lutex[®] en phase I.

(h) Autres

D'autres indications de la PDT en cancérologie ont été développées jusqu'au stade des essais cliniques ou même de la mise sur le marché, mais de manière plus limitée que les précédentes. Nous pouvons citer : les cancers gastriques (AMM du Photofrin[®] au Japon), les cancers de la vessie (AMM du Photofrin[®] au Canada), les leucémies/ lymphomes (le 5-ALA en phase II pour ces deux indications, le méthoxsalen en phase II et une phthalocyanine siliconée en phase I pour le lymphome), cancers du col de l'utérus (Hexaminolevulinate en phase II aux USA), les sarcomes de Kaposi (Tin ethyl etiopurpurin en phase II), le syndrome de Gorlin (Verteprorfine en phase II aux USA), les mésothéliomes (phase II).

(2) Lésions précancéreuses

(a) Les kératoses actiniques

Les kératoses actiniques sont des états précancéreux causés habituellement par une exposition solaire (également observées plus fréquemment chez les patients immunodéprimés) qui évolue en carcinome (épithéliomas) malpighien dans environ 20% des cas. On estime actuellement

qu'une personne sur six développera une kératose actinique au cours de sa vie. Du fait de l'altération de la couche d'ozone, un australien de type caucasien 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 (2000) pour le traitement des kératoses actiniques.

(b) Œsophage de Barrett

L'œsophage de Barrett, aussi appelé endobrachyoesophage (EBO), a été beaucoup étudié devant l'augmentation ces 20 dernières années de la fréquence des cancers du cardia (jonction entre l'œsophage et l'estomac) dans les pays occidentaux¹³⁴. L'EBO est défini par la présence d'une muqueuse glandulaire métaplasique (de type duodénale) tapissant une partie plus ou moins importante de l'extrémité inférieure de l'œsophage, de la simple languette à un segment circonférentiel, pouvant s'étendre sur plus de 10 cm de haut. L'EBO n'entraîne pas de symptôme pathognomonique, et ce sont le plus souvent des brûlures retro sternales ascendantes évocatrices de reflux gastro-œsophagien voire des complications de reflux chroniques (anneaux, sténoses, dysphagie....) qui motivent l'endoscopie qui permettra de poser le diagnostic. La prévalence de l'EBO varie de 5 à 20% des patients consultant pour un reflux. L'ancienneté des symptômes augmente le risque d'EBO. L'existence d'une hernie hiatale est un facteur aggravant. La transformation maligne représente le principal risque évolutif de l'EBO et l'augmentation actuelle de l'incidence des adénocarcinomes de l'œsophage et du cardia pose dans les populations occidentales un réel problème de santé publique. Le cancer fait suite à l'apparition d'une dysplasie en un ou plusieurs endroits de l'EBO. On estime qu'entre 5 000 et 7 000 dysplasies de haut grade sur EBO sont diagnostiquées chaque année aux USA. Ce diagnostic requiert l'examen de biopsies par un pathologiste entraîné à l'occasion d'une surveillance endoscopique tous les ans et des biopsies multiples étagées.

Le traitement de l'EBO doit être différencié de celui du reflux gastro œsophagien. L'utilisation d'inhibiteurs de la sécrétion acide (inhibiteurs de la pompe à protons tels l'oméprazole) ou une modification chirurgicale de l'anatomie cardiale (gastroplastie) ont un effet sur le reflux mais n'entraînent aucune régression sur l'EBO constitué, et ce quelle que soit sa hauteur. En revanche l'utilisation de ces techniques en association à des traitements locaux (laser thermique, cryocoagulation, plasma argon) entraîne une régression de l'EBO. L'impact de ces traitements locaux n'a pas été évalué sur le risque de récurrence à long terme. De toutes façons ces traitements ont l'inconvénient de ne pas traiter de façon homogène toute la surface mais de laisser, malgré de nombreuses séances (6 cm² au maximum par séance), des zones sous-traitées par rapport à des zones sur-traitées (points chauds ou froids selon les techniques)¹³⁴. La mucosectomie est

indiquée pour le traitement d'une zone de dysplasie modérée ou sévère (cancer in situ) localisée au sein d'un EBO. Il ne s'agit pas d'un traitement de l'EBO mais de la dysplasie associée. C'est une intervention lourde, de même que l'exérèse chirurgicale associée à une gastroplastie.

La PDT est susceptible d'entraîner une suppression complète de la muqueuse de Barrett ce qui ne peut être obtenu par aucune autre technique médicamenteuse. Par ailleurs la PDT est plus efficace sur les zones dysplasiques ce qui réduira encore le risque de dégénérescence secondaire. L'administration du photosensibilisant sera générale (Photobar[®], Levulan[®]) ou topique (Levulan[®]). L'irradiation est réalisée au moyen d'une fibre optique délivrant une lumière homogène sur un demi-cylindre (on ne traite qu'une partie d'une lésion cylindrique pour éviter une sténose) ; la diffusion de la lumière ne pose pas de problèmes, les lésions ne faisant que quelques dizaines de cellules d'épaisseur.

B. F. Overholt *et coll.*¹³⁵ retrouvent une régression moyenne de la longueur de l'EBO de 6,8 à 1,48 cm après PDT. R. Ackroyd *et coll.*¹³⁶ utilisant de l'ALA par voie orale (temps de contact très court avec la muqueuse et réabsorption digestive de l'ALA) obtiennent une régression de la surface de l'EBO supérieure à 30%. Enfin L. Gossner¹³⁷, utilisant l'ALA obtient une disparition des dysplasies de haut grade sur EBO dans 100% des cas et de cancers Tis dans 77% des cas.

2. Les applications non anticancéreuses

a) La Dégénérescence maculaire liée à l'âge

La DMLA est une dégénérescence de la macula, zone centrale de la rétine qui touche principalement les personnes de plus de 65 ans, et qui se traduit par une baisse progressive de la vision aboutissant à une perte de la vision centrale. Ces patients ne deviennent pas aveugles et conservent leur autonomie, mais perdent la partie la plus importante du champ de vision pour la lecture, la conduite, la vision fine. 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 DMLA se traduit sur le plan histologique par un épaissement de la membrane de Bruch (sur laquelle repose la rétine) et de l'épithélium pigmentaire. Des dépôts jaunâtres appelés Drusen sont en quantité excessive et entraîne une inflammation puis l'apparition d'une néovascularisation choroïdienne située au-dessous de la membrane de Bruch. Cette vascularisation est à l'origine d'un exsudat, qui contribue encore au décollement de l'épithélium pigmentaire. On distingue la forme atrophique, dite sèche, d'évolution lente mais qui peut évoluer en forme exsudative, et la forme exsudative qui fait intervenir une néovascularisation et représente 20% des DMLA. La Visudyne[®] a reçu

une A.M.M. aux USA (1999) et en France (2000) pour le traitement de la DMLA exsudative. L'irradiation lumineuse à 690 nm est effectuée 10 minutes après l'injection de Visudyne[®], lorsque tout le photosensibilisant est encore dans les vaisseaux sanguins. La photochimiothérapie est actuellement le traitement de référence de cette affection, mais elle est de plus en plus concurrencée par des traitements à base d'anticorps ciblant le VEGF.

b) Hyperplasie de l'intima et athérosclérose

Les chirurgies de revascularisation coronaires ont un taux d'échec de 30% à un an, principalement à cause d'une hyperplasie de l'intima, liée à une migration de cellules musculaires lisses, de myofibroblastes et une synthèse excessive de matrice protéique sous l'intima¹³⁸. Les stents, dont ceux relarguant des principes actifs, seraient en théorie efficaces, mais ne sont pas utilisables aux jonctions du greffon. La PDT intra vasculaire a montré d'intéressants résultats chez l'homme¹³⁹. Un essai clinique de phase II/III est en cours depuis 2001 pour le traitement de l'athérosclérose.

c) Infections polymicrobiennes (périodontites, ulcères cutanés), ou multirésistantes (infections nosocomiales), infestations parasitaires (leishmaniose), mycoses

La capacité des bactéries à capter des colorants est connue depuis des décennies, et l'efficacité de la PDT a d'abord été démontrée sur des colonies bactériennes. Cette indication n'est donc pas une nouveauté, mais dans un contexte médical où l'on doit faire face à de plus en plus de résistances aux antibiotiques, et où l'on se doit de prévenir leur apparition, la PDT présente de nombreux avantages, et fait l'objet de beaucoup d'études dans ce domaine¹⁴⁰. En effet, la plupart des mécanismes de résistance aux antibiotiques sont inefficaces face à la PDT, voire peuvent être astucieusement exploités¹⁴¹. Par ailleurs, l'action antibactérienne a un spectre très large et peut donc être utilisée dans des infections polymicrobiennes, par exemple en dentisterie où l'on estime que l'on trouve environ 900 genres de bactéries dans la plaque dentaire, toutes plus ou moins déjà résistantes aux antibiotiques. La PDT ne générant pas de résistance, le traitement peut être réitéré, et donne d'excellents résultats dans des infections polymicrobiennes chroniques¹⁴² (cas des ulcères cutanés chroniques) face auxquelles le clinicien est démuni, ou des infections liés à des germes multirésistants. Enfin, le choix d'un sensibilisant adapté permet de limiter sa captation par les cellules eucaryotes, et d'utiliser des longueurs d'onde d'irradiations pénétrant peu les tissus.

La PDT a également été proposée pour combattre l'apparition de parasites résistants aux traitements disponibles, et a donné des résultats prometteurs dans le cas de la leishmaniose¹⁴³, qui touche actuellement 12 millions de personnes dans le monde.

Les mycoses sont également susceptibles d'être traitées par PDT¹⁴⁴.

d) Affections cutanées bénignes (taches de vin, acné, verrues),
hirsutisme

Le traitement par PDT de ce type de lésion, au stade d'essais cliniques, est anecdotique mais démontre que cette méthode est suffisamment économique et dénuée d'effets secondaires graves pour qu'on puisse l'envisager pour des indications cosmétiques de confort.

II. Lumière et fluorescence

La lumière représente la deuxième moitié du traitement par photochimiothérapie. Nous allons donc décrire les modifications au sein de la matière induites par l'absorption de lumière, entraînant les réactions photochimiques décrites précédemment et la fluorescence utilisée pour le photodiagnostic, les sources lumineuses utilisées, et évoquer les possibilités de dosimétrie.

A. La lumière

1. Nature de la lumière

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 est nécessaire de la considérer comme composée de paquets d'énergie appelés photons. L'énergie par photon est reliée à la longueur d'onde λ et au nombre d'onde ν par :

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

On peut déjà déduire de cette formule qu'un photon de 400 nm de longueur d'onde est deux fois plus énergétique qu'un photon de 800 nm.

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

2. Transitions électroniques

Considérons un atome possédant seulement deux niveaux d'énergie, un niveau de haute énergie (E_1), et un niveau de basse énergie (E_0). A l'état fondamental, cet atome est à l'état E_0 .

Un apport d'énergie égal 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 ; ce phénomène est appelée absorption. Cette énergie peut être d'origine cinétique (chauffage, bombardement par des particules, etc.) ou électromagnétique (photon). Seul le niveau de plus basse énergie, c'est à dire l'état fondamental, est stable. Après un certain temps (en général de l'ordre de 10^{-12} sec), l'électron de l'orbite supérieure finit donc par "retomber" spontanément à l'état fondamental et restituer alors l'énergie correspondante, le plus souvent sous forme de chaleur (énergie vibrationnelle, collision avec une autre molécule) ou sous forme d'un photon d'une longueur d'onde λ telle que $hc/\lambda = E_1 - E_0$ émis dans une direction quelconque. C'est une émission spontanée, phénomène responsable de l'émission lumineuse de la plupart des sources de lumière (soleil, lampe à incandescence, lampe à décharges...). Notons

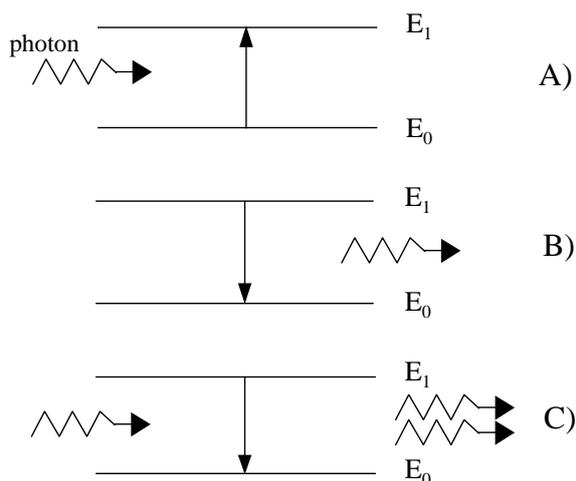


Figure 29 : Processus A) d'absorption, B) d'émission spontanée et C) d'émission stimulée

qu'au niveau E_1 , l'atome n'est plus capable d'absorber d'énergie sous forme de photon avant sa désexcitation. Si la source de photons est particulièrement intense, comme cela peut être le cas avec un laser, et que les photons arrivent plus vite que les atomes ne peuvent se désexciter, alors la part de photons absorbés diminue. Cette chute d'absorption est appelée "photobleaching" ; ce phénomène est minoritaire en

photochimiothérapie par rapport au photobleaching chimique décrit dans le paragraphe I.

En 1917, Einstein a proposé, pour interpréter des mécanismes d'interaction photon-matière, qu'à l'émission spontanée venait s'ajouter une émission induite (ou stimulée) : un photon incident induit l'émission d'un deuxième photon de la part d'un atome excité (*Figure 29*). 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 LASER¹⁴⁵.

Si l'on considère des molécules, le nombre de niveaux d'énergie est nettement plus important que dans notre atome théorique, et donc le nombre transitions énergétiques possibles beaucoup plus grand (*Figure 30*).

Pour certaines molécules, en particulier si elles sont très conjuguées et « rigides » (pas de rotation possible du fait des doubles liaisons), la restitution d'énergie par vibration ou rotation est lente, et de ce fait l'émission de photons favorisée. Ces molécules ont donc la propriété, après absorption d'énergie lumineuse, d'émettre dans toutes les directions de l'espace des radiations lumineuses. De tels phénomènes sont connus sous le nom de photoluminescence. Si l'état excité est un état singulet (cf. I.C.2), sa durée de vie est courte (10^{-9} sec) et le photon est émis rapidement sous forme de fluorescence. Si cet état excité est triplet, sa durée de vie est plus longue (10^{-3} sec), et l'on observe une phosphorescence¹⁴⁶. Même si elle est lente dans le cas de ces molécules « rigides », une perte d'énergie sous forme vibrationnelle a lieu pendant la durée

de l'état excité ce qui se traduit par l'émission d'un photon moins énergétique que le photon excitateur, donc de longueur d'onde plus longue¹⁴⁶. Les différents processus de désactivation permettant le retour d'une molécule excitée à son état fondamental sont schématisés dans le diagramme de Jablonski, représentant ici l'ensemble des transitions énergétiques au sein de la molécule d'anthracène (photosensibilisant) (cf. Figure 30).

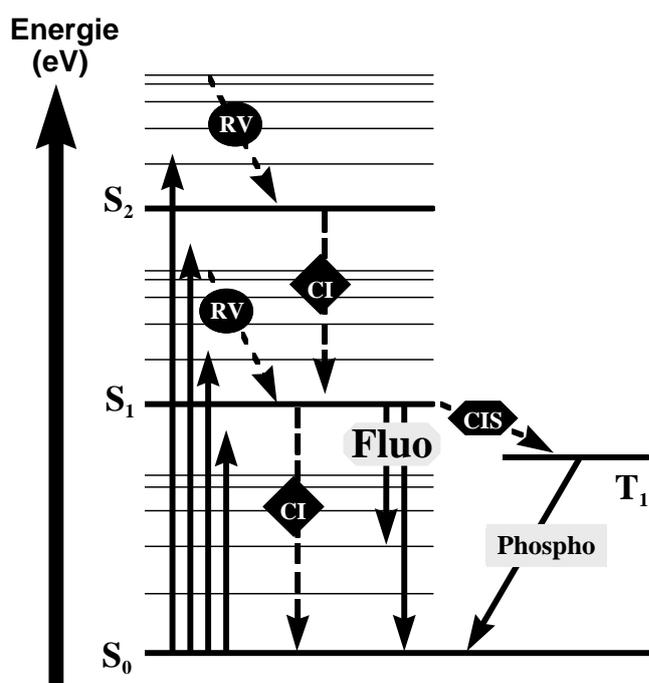


Figure 30 : Diagramme de Jablonski d'un photosensibilisant (anthracène).

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

a) Absorption lumineuse par un échantillon

Il est possible de quantifier la lumière absorbée par un échantillon au moyen d'un spectrophotomètre, dont le principe est simple : une source de lumière focalisée produit un faisceau incident (d'une longueur choisie) qui traverse l'échantillon ; la lumière non absorbée est captée par un détecteur. Deux paramètres sont utilisés pour décrire la quantité de lumière absorbée, tous les deux calculés à partir du rapport entre les intensités lumineuses reçues par le détecteur en présence (I_t) ou en absence d'échantillon (I_0). On peut ainsi définir :

La transmittance (T) telle que $T = I_t / I_0$

L'absorbance ou densité optique (A) telle que $A = \log (I_0 / I_t)$

avec donc $A = -\log (T)$

La loi de Beer-Lambert énonce que l'intensité d'un rayonnement électromagnétique de longueur d'onde λ qui traverse un milieu transparent contenant une substance absorbante subit une

diminution exponentielle en fonction de la distance parcourue et de la concentration de la substance, soit :

$$I(\lambda, c) = I_0(\lambda) \cdot e^{-\alpha l c}$$

avec I_0 l'intensité incidente de longueur d'onde λ

c la concentration de la substance

l la longueur du trajet optique

α le coefficient d'absorption

Si l'on exprime l'absorbance en fonction de la loi de Beer-Lambert, on obtient :

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda \cdot l \cdot c$$

Avec A l'absorbance (sans unité)

ϵ_λ le coefficient d'absorption molaire en $\text{l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ pour la longueur d'onde considérée

l la longueur du trajet optique en cm

c la concentration molaire en $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$

L'absorbance est additive, ce qui signifie que l'absorbance d'un mélange est la somme des différentes absorbances des constituants de ce mélange.

Par ailleurs, aussi sophistiqué que soit le spectrophotomètre, le faisceau incident n'est pas parfaitement monochromatique. Des longueurs d'onde parasites sont donc captées par le détecteur, mais leur influence est négligeable la plupart du temps. En revanche, si l'échantillon testé est très concentré et que la longueur d'onde considérée est presque totalement absorbée, la contribution de ces longueurs d'onde parasites devient visible, fausse la mesure, et la relation entre concentration et absorbance mesurée n'est plus linéaire¹⁴⁶. Sur un plan pratique, on considèrera avec précautions les valeurs d'absorbance supérieures à 2. Les solutions troubles et inhomogènes donnent, elles, des valeurs d'absorbance fausses par excès, car à la lumière absorbée par l'échantillon s'ajoute la lumière diffractée qui n'atteint pas le détecteur.

b) 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) 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.

d) La 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, environ 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.

e) Emission de fluorescence

Comme nous l'avons vu, l'énergie réémise par une molécule excitée sous forme d'un photon est plus faible que l'énergie absorbée (loi de Stokes). C'est ainsi que de nombreux composés organiques, irradiés en lumière ultraviolette, fluorescent dans le domaine du visible. La détection de la fluorescence se fait non pas sur l'axe du faisceau lumineux excitateur, mais dans une direction perpendiculaire, pour que la détection ne soit pas perturbée par le faisceau incident. La durée de vie de l'état singulet excité étant de 10^{-9} à 10^{-7} secondes et la durée de décroissance de l'émission de fluorescence est du même ordre de grandeur si elle n'est pas perturbée par des processus compétitifs. Cette capacité à émettre de la lumière après absorption lumineuse caractérise la quasi-totalité des photosensibilisants. En effet, ces substances sont toutes capables d'absorber de l'énergie sous forme de photons, et les différentes formes de déperdition d'énergie (conversion intersystème, chaleur, photoluminescence) coexistent. La fluorescence émise est utilisée pour leur dosage au niveau cellulaire et pour déterminer leur 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. L'efficacité d'une molécule fluorescente est déterminée par son rendement quantique (« quantum yield » en anglais). C'est le rapport entre le nombre total de photons émis par fluorescence et le nombre total de photons absorbés initialement (autrement dit le nombre de molécules photo-excitées qui perdent leur énergie sous forme de fluorescence). Il est noté Φ . Dans le cas de molécules très fluorescentes, Φ est proche de 1 (par exemple la fluorescéine en milieu sodique : $\Phi=0,85$). L'environnement de la molécule

peut fortement modifier son intensité de fluorescence et des phénomènes physiques ou chimiques peuvent entraîner une inhibition de la fluorescence ("Quenching"). Nous pouvons citer :

- 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.

f) 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 de phosphorescence. Sa longueur d'onde est plus grande qu'en fluorescence et sa durée de vie plus longue. Elle a un temps de décroissance dépendant de la durée de vie de cet état (10^{-4} à 10^{-3} sec), ce qui explique que le phénomène d'émission de lumière persiste après excitation, ce qui n'est pas le cas de la fluorescence.

B. Les lasers

Il est en théorie possible d'utiliser n'importe quelle source lumineuse pour effectuer une photochimiothérapie, du moment qu'elle produit les longueurs d'onde absorbées par le photosensibilisant. Aux prémices de la photochimiothérapie ont donc été utilisés le soleil, puis des lampes filtrées. C'est pourtant avec le développement des lasers que cette discipline s'est particulièrement développée. L'avantage des lasers en photochimiothérapie est de permettre l'obtention d'un faisceau lumineux que l'on peut facilement diriger dans une fibre optique, et qui a une puissance lumineuse importante à la longueur d'onde souhaitée. La puissance lumineuse utilisée (de l'ordre de quelques centaines de mW) est toutefois choisie de manière à ne pas induire d'effet thermique au sein des tissus biologiques traités. La photochimiothérapie se distingue donc nettement des techniques basées sur l'hyperthermie ou la thermocoagulation. On quantifie l'énergie lumineuse totale apportée à la lésion grâce à la **fluence** qui indique l'énergie délivrée par unité de surface (en Joules/cm²). Cette énergie peut être apportée plus ou moins vite, et l'on utilise donc également pour définir l'irradiation l'**irradiance** qui indique la puissance lumineuse délivrée par unité de surface (en Joules/sec/cm², soit en W/cm²). Le caractère cohérent et polarisé de la lumière laser n'a pas d'intérêt particulier en photochimiothérapie.

1. Principe de fonctionnement d'un L.A.S.E.R.

Il s'agit d'exploiter le phénomène d'émission stimulée décrit plus haut en soumettant des atomes excités à des photons incidents adaptés : les premiers photons induisent une émission stimulée de nouveaux photons identiques, eux-mêmes capables d'induire une émission stimulée de la part des atomes excités qu'ils rencontrent... le tout entre deux miroirs pour que le phénomène s'amplifie.

a) Cavité Optique

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 actif

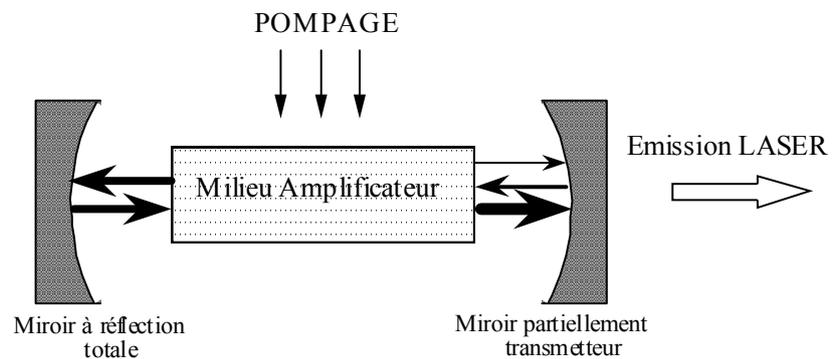


Figure 31 : Oscillation laser dans une cavité résonante (cavité Fabry-Perrot)

s'amplifie à chaque passage par émission stimulée¹⁴⁷. Grâce à un miroir semi-transparent à une extrémité de la cavité, une petite partie de l'énergie lumineuse est émise vers l'extérieur de la cavité et constitue le faisceau laser. En fonction des caractéristiques de la cavité, l'aspect du faisceau en sortie de laser peut être différent. En photochimiothérapie, on n'utilise que le mode noté « TEM₀₀ » qui correspond à un faisceau de section circulaire, avec une répartition gaussienne de l'intensité lumineuse, mais il existe des modes moins connus, comme le TEM₃₃ qui donne en sortie de laser 16 points lumineux disposés en carré¹⁴⁷.

L'oscillation laser peut se développer si le gain par passage au travers du milieu amplificateur est supérieur aux pertes, c'est-à-dire si l'émission stimulée est plus forte que l'absorption, ce qui nécessite que les populations atomiques soient maintenues excitées, ou « inversées »¹⁴⁵.

b) Pompage, inversion de population

Pour obtenir une amplification il faut donc d'abord créer dans le milieu actif une inversion de population. L'obtention de cette inversion est en pratique très difficile et est obtenue par pompage. Le pompage consiste à remplir le niveau excité E₁ des atomes du milieu aux dépens

du niveau fondamental E_0 de manière à amplifier l'émission induite. L'énergie nécessaire peut être amenée sous forme électrique ou lumineuse (pompage optique).

2. Les différents types de laser

On distingue les lasers en fonction de la nature du milieu actif¹⁴⁵. Nous pouvons citer :

- Les lasers à gaz : ionisé (ex : argon ionisé) ou non (ex Hélium-Néon), ou à excimères (les excimères sont des molécules qui n'existent que si les atomes qui les constituent sont dans des états excités. ex : XeCl).
- Les lasers solides (ex : le laser à Rubis, le premier à avoir fonctionné en 1960¹⁴⁷, le laser Titane-saphir)
- Les lasers liquides (à colorant)
- Les lasers à semi-conducteur (diodes laser ; ex : arséniure de gallium, GaAs)
- Les lasers à électrons libres (l'excitation électronique est effectuée par des électrons issus d'un accélérateur de particules)
- Les lasers à fibre (le milieu actif est une fibre optique dopée avec un ion de terre rare).

En fonction du milieu actif, les transitions électroniques possibles et donc les possibilités d'émissions stimulées sont différentes. A l'exception des lasers dits « accordables » (émission possible sur toute une plage de longueurs d'onde), les lasers ne produisent que quelques longueurs d'onde précises.

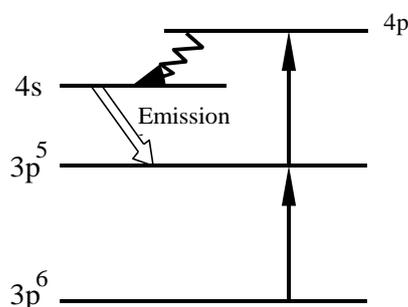


Figure 32 : Modèle d'excitation du laser ionique

En photochimiothérapie, on choisira donc le laser en fonction du pic d'absorption de la molécule que l'on veut exciter. En photochimiothérapie les lasers utilisés émettent dans le rouge ou le proche infrarouge (de 620 à 1200 nm). Les longueurs d'ondes inférieures sont rapidement absorbées par les molécules biologiques, et les longueurs d'onde supérieures par l'eau. En pratique, les irradiations se font surtout entre 632 et 760 nm, sauf pour un type de photochimiothérapie, peu développé et utilisé pour les applications dermatologiques, qui utilise les UV-A et que l'on nomme « puvathérapie ».

a) Un exemple de laser à gaz : le laser à Argon ionisé

Dans le cas du laser à Argon, l'excitation électronique (pompage) est réalisée par une décharge électrique : le bombardement des atomes neutres d'argon par les électrons de la décharge électrique provoque l'éjection d'un électron périphérique de l'atome d'argon, selon la réaction : $e^- + Ar \rightarrow (Ar^+)^* + 2e^-$. Lors du choc d'un tel électron accéléré avec un atome, une partie de l'énergie est cédée à celui-ci et l'amène dans un état excité. Un tel pompage dans un laser ionique permet donc d'obtenir des atomes ionisés dans l'état excité. Les atomes excités émettent spontanément de la lumière. La radiation émise engendre des émissions stimulées, puis est réfléchi au travers du plasma à l'aide de deux miroirs formant la cavité. On utilise des champs magnétiques pour confiner les gaz, car les ions actifs ont tendance à migrer vers les parois du tube laser.

Selon le modèle de Gordon, premier modèle d'excitation des lasers ioniques, le mécanisme d'excitation s'effectue en trois processus :

- un choc entre un électron et un atome neutre produit un ion dans l'état fondamental.
- une seconde collision de cet ion avec un électron excite le niveau laser supérieur.
- le niveau inférieur se dépeuple rapidement par radiation laser.

b) Les lasers à colorant

Le matériau actif est ici un liquide fluorescent et l'excitation du laser à colorant est obtenue par pompage optique. Ce type de lasers est accordable : une variation de la cavité résonante par réseaux réfléchissants ou prismes dispersifs permet de sélectionner une longueur d'onde dans le spectre de fluorescence du colorant, large d'une centaine de nanomètres.

c) Les diodes laser

Les lasers à semi-conducteurs (Figure 33) sont des diodes qui émettent une lumière cohérente par émission stimulée. L'élément principal d'une telle diode est une puce à semi-conducteur. Une telle

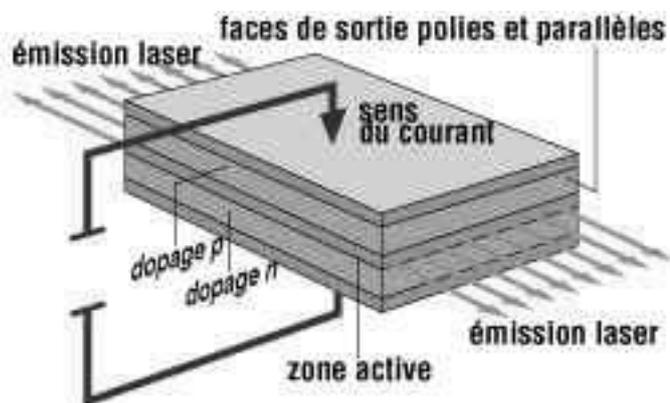


Figure 33 : Principe de fonctionnement d'une diode laser

puce est constituée d'un empilement de couches: la première, déposée sur un support, contient un excès d'électrons; elle est dite de type n (pour négatif). Une autre couche, dite de type p (pour positif), située sur le dessus de la puce présente au contraire un déficit d'électrons (ou un excès de particules chargées positivement, appelés "trous"). Entre ces deux couches n et p se trouve la couche dite active d'où est émise la lumière. Une différence de potentiel appliquée sur la puce semi-conducteur repousse vers la couche active des "trous" (des "charges positives") de la couche de type p , et des électrons de la couche n .

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

d) Les lasers pulsés

Nous avons considéré jusqu'ici que l'émission laser était continue, ce qui est le cas le plus fréquent. Pourtant les types de lasers que nous avons décrits peuvent émettre non pas un faisceau de lumière continu de puissance constante, mais des flashes lumineux ou « pulses ». La durée de ces flashes peut aller de quelques millisecondes à quelques femptosecondes (10^{-15} sec). Pour parvenir à ce résultat, on peut appliquer un pompage lui-même discontinu ou faire varier les conditions dans la cavité pour qu'elles ne permettent l'amplification de lumière que de manière périodique (« Q-switching »)... Cela a deux implications en photochimiothérapie. D'une part, nous avons vu que le type de réaction photochimique dépendait fortement de la concentration en oxygène du milieu et que la photochimiothérapie dépeuplait rapidement le milieu en oxygène. Lorsqu'on utilise des lasers pulsés, le temps séparant les flashes lumineux permet au milieu de se ré-oxygéner, par diffusion et grâce à l'apport sanguin. Les réactions de type II sont donc favorisées. D'autre part, le fait de délivrer l'énergie lumineuse en des temps extrêmement brefs modifie la façon dont la matière réagit à l'irradiation et apparaissent des phénomènes complexes liés à ce que l'on appelle l'« optique non linéaire ». En pratique, la densité de photons durant un flash de quelque femptosecondes est telle qu'une molécule peut capter simultanément deux photons de longueur d'onde 2λ qui permettront la même transition électronique qu'un photon de longueur d'onde λ , 2 fois plus énergétique. Cette excitation « biphotonique » (ou « Two

Photons Excitation») permet donc par exemple d'exciter un photosensibilisant ayant un pic d'absorption à 532 nm avec un laser pulsé produisant un faisceau laser de longueur d'onde 1064 nm, pénétrant beaucoup plus profondément les tissus. Ce type d'irradiation en PDT n'est étudié que depuis quelques années¹⁴⁸⁻¹⁵¹.

Tous les types de laser sont utilisés en recherche, mais la photochimiothérapie est de nos jours réalisée avec des diodes, sources peu chères, peu encombrantes, transportables car ne nécessitant pas de circuit de refroidissement et pouvant se brancher sur une simple prise de courant. Cela permet d'envisager d'utiliser la PDT là où les autres techniques anticancéreuses sont trop lourdes à mettre en place¹⁵².

3. Autres matériels optiques utilisés en photochimiothérapie

Pour réaliser une irradiation, les lasers sont généralement couplés à une fibre optique qui transmet la lumière jusqu'au tissu cible. Ces fibres optiques éventuellement associées à des endoscopes se terminent par différents dispositifs en fonction de l'indication :

- Un système de microlentilles pour fournir un faisceau lumineux divergent et homogène.
- Des diffuseurs cylindriques, pour l'irradiation de l'œsophage, ou de tumeurs dans lesquelles on insère les fibres (« PDT interstitielle », par exemple pour les cancers de la prostate pour lesquels plusieurs fibres, introduites à travers le périnée, sont réparties dans le volume tumoral).
- Des ballonnets, que l'on gonfle après excrèse avec un liquide diffusant au site tumoral pour irradier les marges de la plaie.
- Pour des irradiations naso-pharyngées, un dispositif spécial a récemment été développé¹⁵³.
- Dans le cas du traitement de la DMLA l'irradiation se fait par une lampe à fente ou grâce à un système de lentille pour permettre une irradiation à travers la cornée (traitement non invasif).

Il est facile d'estimer l'énergie délivrée à la lésion en mesurant la puissance lumineuse en sortie de fibre, et en fixant le temps et la surface d'irradiation. C'est la méthode généralement employée et les résultats thérapeutiques observés sont bien corrélés aux doses laser calculées ainsi. Pourtant il est théoriquement plus satisfaisant de d'essayer de prévoir la répartition lumineuse au sein de la lésion pour adapter l'irradiation. Ce type de modélisation est très difficile, même pour une lumière monochromatique, les tissus biologiques traités étant

absorbants, dispersifs, et très hétérogènes. De plus, les effets biologiques obtenus sont le fruit de différents mécanismes complémentaires et échelonnés dans le temps (cf. *I.D.2.c*), ce qui explique que les cliniciens n'évaluent la réponse thérapeutique que 2 à 3 mois après le traitement. Certaines équipes sont tout de même parvenues à schématiser la diffusion lumineuse dans des modèles simplifiés¹⁵⁴. De ces études dérivent une approche plus intéressante qui consiste à utiliser les modifications spectrales induites par la photochimiothérapie (photobleaching, diminution du taux d'oxyhémoglobine, génération de photoproduits) dans les tissus, pour évaluer pendant le traitement l'intensité de la réaction produite. Ces méthodes ont l'avantage de tenir compte à la fois de tous les paramètres impliqués dans la réaction photochimique : concentration tissulaire en photosensibilisant, en oxygène, et diffusion lumineuse. Elles font intervenir des fibres optiques dédiées, ou un miroir dichroïque permettant d'utiliser la même fibre pour l'irradiation et la dosimétrie ; le signal est ensuite traité pour calculer l'intensité de la réaction. La mesure directe de la phosphorescence de l'oxygène singulet a aussi été étudiée, mais elle est beaucoup plus lourde à mettre en place¹⁵⁴.

MATERIELS ET METHODES

III. Matériels

A. Les photosensibilisants

1. Le SIM01

La molécule de SIM01 est une diphenylchlorine possédant donc deux groupements phényles autour de son noyau, en position méso. Il a été synthétisé par le Pr G. Simonneaux (UMR 6226) et a fait l'objet d'un dépôt de brevet (PCT N° WO 02/10173/A1) après plusieurs études effectuées par le Laboratoire de Photobiologie des Cancers^{6,102,155-157}.

Les solutions mères de SIM01, à 1 mg/kg, sont préparées dans une solution de PEG 400 (30%), d'éthanol (20%) et d'eau distillée (50%).

Les dilutions ultérieures sont réalisées dans de l'eau ppi. L'étude de l'efficacité du SIM01 dans le traitement des tumeurs cérébrales a fait l'objet d'un financement de la part de la Fondation de l'Avenir et de l'INSERM (poste d'accueil Inserm pour vétérinaire).

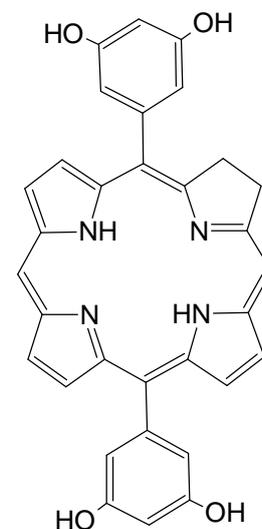


Figure 34 : SIM01

2. Cyanines et phthalocyanines

Lors du développement de nouvelles structures chimiques, quelle que soit l'application, une grande quantité d'analogues et de dérivés est synthétisée pour permettre la sélection de la structure la plus performante. Le département de chimie de l'Université de Fribourg (Suisse) possède par exemple une vaste gamme de colorants, absorbant des longueurs d'onde visibles, développés pour permettre l'impression de photographies par des imprimantes à jet d'encre. Pour cette application, les colorants doivent être les plus stables possibles sous exposition lumineuse, de manière à ce que les clichés imprimés conservent leur qualité au cours du temps. Les composés synthétisés qui s'avèrent sensibles à la lumière sont donc écartés alors qu'ils sont parfois déjà protégés par des brevets. Sachant que ces colorants sont des phthalocyanines (série "BAE", "Bg" et "Ro") ou des cyanines et que ces structures ont été décrites comme utilisables en photochimiothérapie, et que leur toxicité, lorsqu'elle a déjà été testée en vue des applications d'impression grand public, est faible, le Dr D. Moigno a décidé de les faire tester comme photosensibilisants. Ces composés ont été synthétisés et fournis au laboratoire par le Dr D. Moigno et son équipe (Fribourg, Suisse). Le BAE 9514 correspond au tétrasulfonate de phthalocyanine de zinc, déjà décrit et utilisé comme référence.

Le tableau ci-dessous présente les solvants utilisés pour préparer des solutions mères à 1 mg/mL. Les dilutions ultérieures ont été réalisées dans de l'eau ppi.

Nom	Solvant	Nom	Solvant
Bae 7883	Eau	BAE 8543	Ethanol
Bae 7876	Eau	X-Blue-5	Ethanol
Bae 8506	Eau	1RS/PE2439	Ethanol
Bae 8507	Eau	BAE 8570	Ethanol
Bae 7877	Eau	2RS/PE2449	n-Butanol
PF 55/I	Eau	MOD 331-2	Méthanol
BAE 5838/2	Eau	MOD 348-2	Méthanol
3BS/PE2543	Eau	BAE 7451	DMSO
3GS/PE2240	Eau	JA 7407	DMSO
BAE 8557	Eau	1BS/PE2470	DMSO
BAE 8551	Eau	1GS/PE2562	DMSO
BAE 9011	Eau	3RS/PE3077	DMSO
BAE 8579	Eau	KF 711	DMSO
BAE 9010	Eau	IM35 (PE2476)	DMSO
BAE 9012	Eau	MO8-1	DMSO
BAE 9041	Eau	M07-3-b	DMSO
BAE 9042	Eau	M023-3-b	DMSO
BAE 9043	Eau	MOD 216	DMSO
BAE 9044	Eau	MOD 222	DMSO
BAE 9047	Eau	MOD 244	DMSO
BAE 9048	Eau	MOD247	DMSO
BAE 9049	Eau	MOD 319	DMSO
BAE 5180	Eau	MOD 393-2	DMSO
BAE 9175	Eau	MOD 392-3	DMSO
BAE 9177	Eau	BAE 9761	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
BAE 9514	Eau	BAE 9817	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
MOD 302-2	Eau	BAE 9820	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
MOD 395-2	Eau	BAE 9762	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
MOD 332-2	Eau	BAE 9823	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
MOD 396-2	Eau	BAE 9826	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
MOD 258	Eau	BAE 9830	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
MOD 256-2	Eau	Ro 578	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
BAE 9516	Eau	Bg 9784	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
BAE 5102	Ethanol	Bg 9289	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
BAE 8524	Ethanol	Bg 9688	PEG 400 (30%) /Ethanol (20%) / Eau (50%)
BAE 8510	Ethanol		

Tableau 2 : Cyanines et phthalocyanines testées

Nous ne présenterons ici (*Figure 35* à *Figure 39*) que quelques exemples de structures qui ont été brevetées, les inventeurs souhaitant conserver un secret absolu sur les composés encore non protégés.

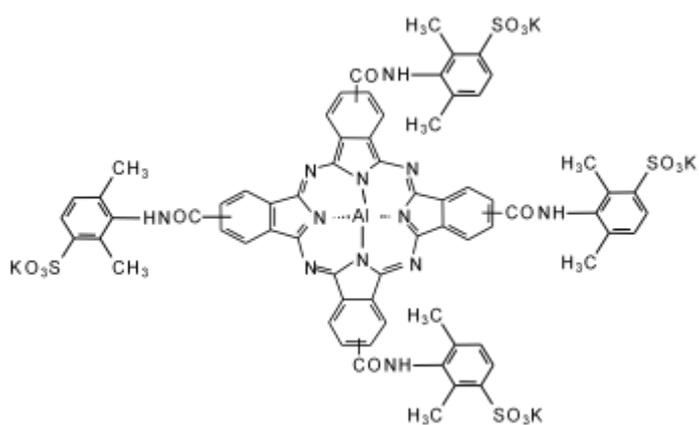


Figure 35 : BAE 9041

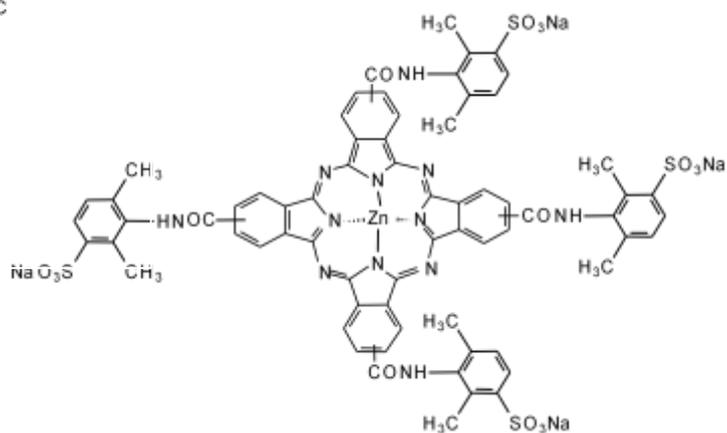


Figure 36 : BAE 9048

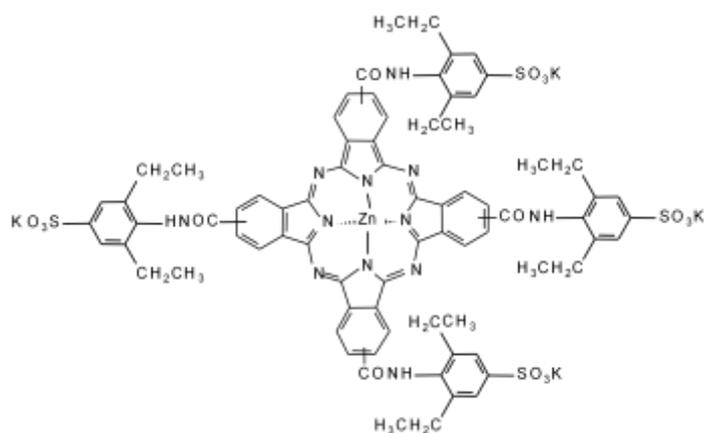


Figure 37 : BAE 9175

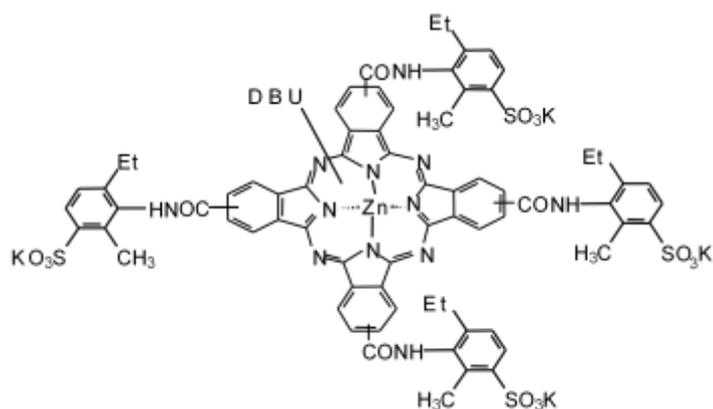


Figure 38 : BAE 9177

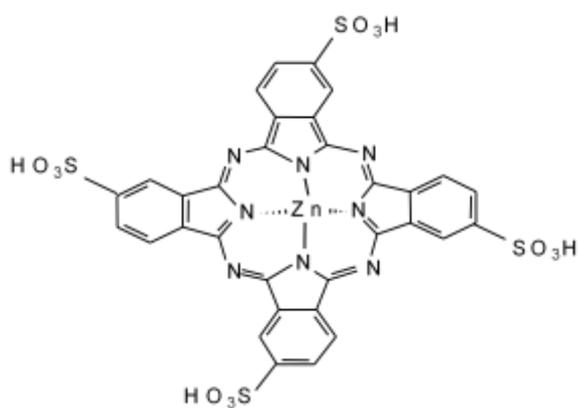


Figure 39 : BAE 9514

3. Radachlorine

La faculté de médecine de Cheyabinsk (Russie) a développé une spécialité correspondant à un mélange de chlorine e6 et de dérivés partiellement oxydés, les purpurines 5 et 18 (Figure 40). L'objectif de la démarche est d'exploiter les propriétés photoréactives de la purpurine 5, qui est très liposoluble et ne pourrait être injectée seule, grâce à une formulation contenant de la chlorine e6, elle-même photoréactive, mais surtout très hydrosoluble, et formant avec la purpurine 5 des complexes hydrosolubles. Le Dr A. Reshetnicov a confié au département Laser le soin de tester cette nouvelle formulation, et a fourni la Radachlorine en solution à 3,5 g/L et la chlorine e6 à 60 g/L respectivement. Les solutions ont été conservées à 4°C à l'abri de la lumière et ont été diluées extemporanément dans de l'eau ppi

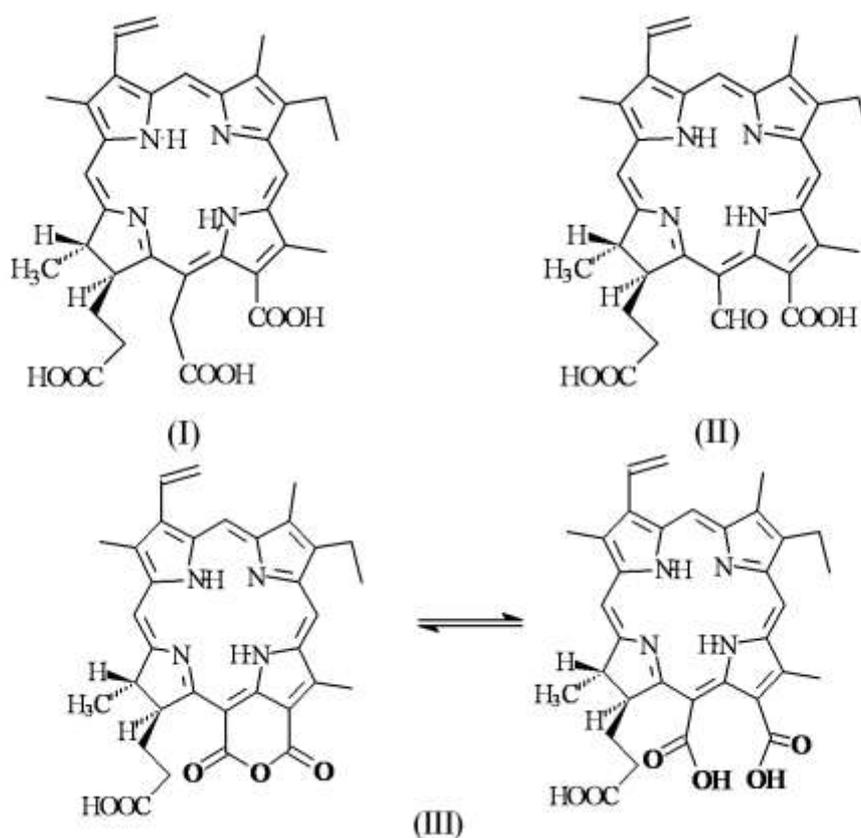


Figure 40 : Composition de la Radachlorine:

I Chlorine e6 (13-carboxy-17-[2-carboxyethyl]-15-carboxymethyl-17,18-trans-dihydro-3-vinyl-8-ethyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin), 80%.

II Purpurine 5 (13-carboxy-17-[2-carboxyethyl]-15-formyl-17,18-trans-dihydro-3-vinyl-8-ethyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin), 15%.

III Purpurine 18 – Chlorine p6 (0 to 15%) (13-carboxy-17-[2-carboxyethyl]-15-carboxy-17,18-trans-dihydro-3-vinyl-8-ethyl-2,7,12,18-tetramethylporphyrin), 5%

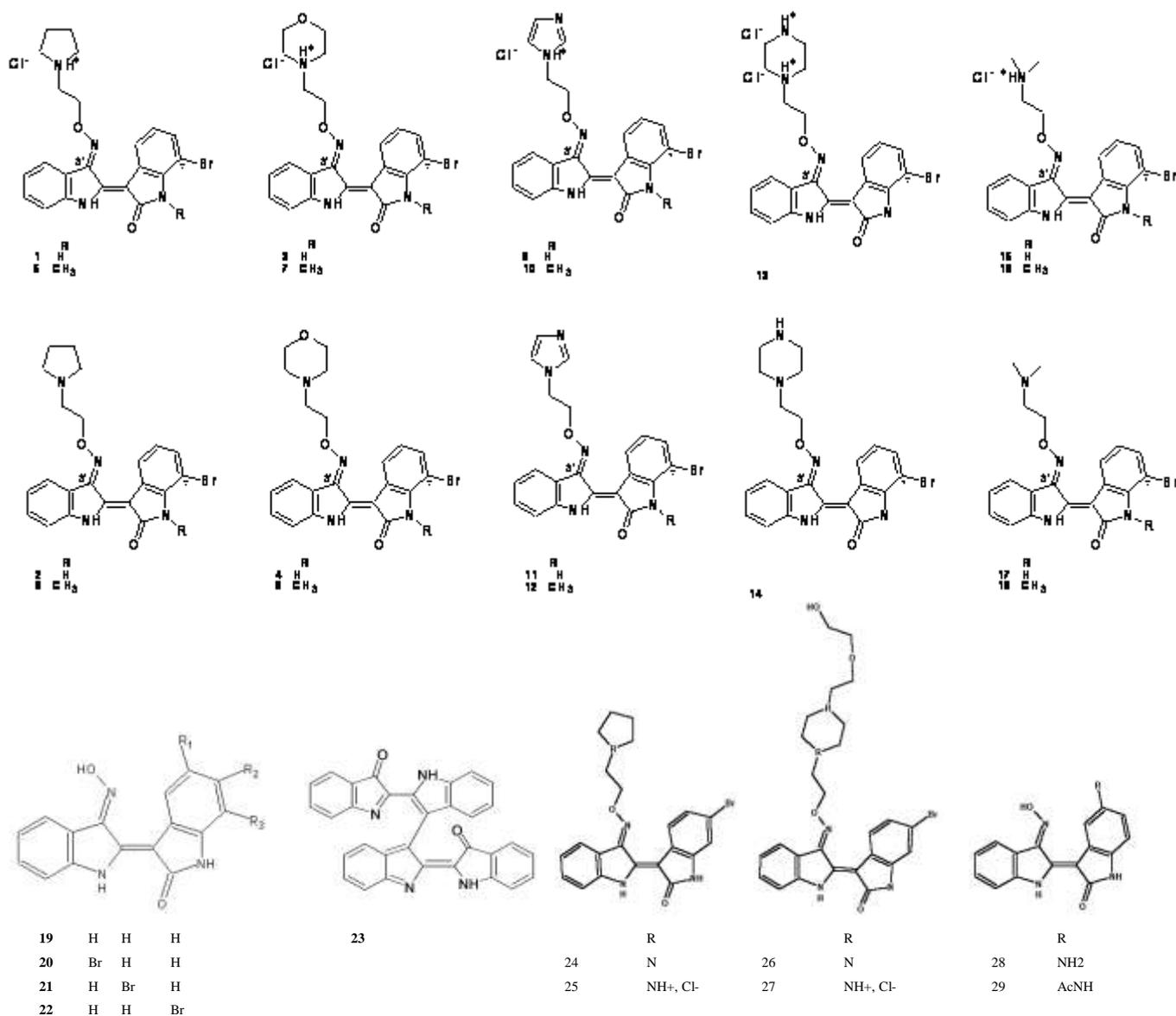
4. Indirubines

Le Laboratoire Cycle Cellulaire, de la station biologique CNRS de Roscoff (France), en collaboration avec l'Institut d'Hématologie de Tianjin (Chine) et le Département de Pharmacie de l'Université d'Athènes (Grèce) a synthétisé une série de molécules dérivées d'indirubine, après avoir identifié que cette classe de composés modifiait le cycle cellulaire en agissant sur des récepteurs tyrosine kinase. Ces composés étant également colorés, il a paru intéressant de tester leur photoréactivité :

- D'une part pour détecter précocement les composés susceptibles d'entraîner une photosensibilisation cutanée (effet indésirable).
- D'autre part, ces produits étant indiqués pour le traitement de certains cancers, pour éventuellement identifier des drogues dont on pourrait exploiter à la fois la sélectivité vis-à-vis de récepteurs surexprimés dans les tumeurs, et la photoréactivité permettant une destruction immédiate des cellules.

Ce projet a été financé par le Cancéropôle Grand-Ouest, et a donné lieu à une publication internationale^{158,159}.

Les produits ont été conservés en solution dans le DMSO à 10 mmol/L à -20°C. Les dilutions ultérieures ont été réalisées extemporanément dans de l'eau ppi.



N°	Composé	8	MLS 2044	16	MLS 2052	24	MC 117
1	MC 131	9	MLS 2060	17	MLS 2039	25	MC 118
2	MC 125	10	MLS 2061	18	MLS 2040	26	MC 135
3	MC 132	11	MLS 2046	19	Indirubine oxime 3'	27	MC 136
4	MC 129	12	MLS 2047	20	MLS 2050	28	AB 187
5	MLS 2049	13	MLS 2064	21	MLS 2052	29	AB 194
6	MLS 2041	14	MLS 2063	22	7 BIO		
7	MLS 2048	15	MLS 2050	23	bis indirubine		

Figure 41 : Formules des indirubines testées

5. Extraction

Le Laboratoire de Photobiologie des Cancers collabore pour ce projet avec Ifremer (Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies des Algues, Nantes) et le CNRS (Laboratoire de Biotechnologies et Chimie Bio-organique, La Rochelle) pour extraire des pigments de micro-algues, et tester leur photoréactivité.

Le tableau ci-dessous présente les différents extraits obtenus par le LBCB de La Rochelle. Il indique pour les différents extraits testés, leur nom de code, l'origine des extraits et le solvant d'extraction. L'espèce de micro-algues testée, les conditions d'extraction et la composition exacte de l'extrait ne sont pas indiquées, car cela mettrait en péril les dépôts ultérieurs de brevets.

	Genre espèce	Code Extrait	Solvant d'extraction
Pigments purs		Xanthophylle	Ethanol
		Phycocyanine	Ethanol
		Phycoerythrine	Ethanol
		Zeaxanthine	Ethanol
		Indigo	DMSO
Bactéries		Spir comp	Méthanol
			Ethanol
		Spiruline	Ethanol
	Serratia marescens	Eau	
Prymnesiophycées (algues dorées)			Méthanol
			Ethanol
		Isogal floc	Eau
Rhodellophycées (algues rouges)		Pocru norm	Méthanol
			Eau
			Ethanol
		Pocru norm 5/25 mL	Ethanol
		Pocru norm 10/10 mL	
		Pocru norm 5/25 mL	Méthanol
		Pocru norm 10/10 mL	
		Pocru norm 5/25 mL	Dichlorométhane
		Pocru norm 5/25 mL	Chloroforme
		Porphyridium purpureum	Ethanol
			Eau
		Pocru-norm-1/160207-EtOH-filtred-Ar - brut	Ethanol
		Pocru-norm-2/160207-EtOH-filtred-Ar - brut	Ethanol
		Pocru-norm-3/160207-eau-filtred-Ar - brut	Eau
		Pc eau	Eau
		Pc DMSO	DMSO
		Pc éthanol	Ethanol
		Pc méthanol	Méthanol
		Pn DMSO	DMSO
		Pn acétone	acétone
		Pn éthanol	Ethanol
		Pn méthanol	Méthanol
		Pn Dichlorométhane	Ethanol
	Pn Chloroforme	Ethanol	
	Pn éther diéthylique	Ethanol	

Eustigmatophycées		Nano EtOH 1	Ethanol
		Nano EtOH 2	Ethanol
		Nano EtOH 3	Ethanol
		Nano EtOH 4	Ethanol
		Nano EtOH 5	Ethanol
		Nano EtOH 6	Ethanol
		Nano EtOH 8	Ethanol
Chlorophycées		DS EtOH	Ethanol
		DS DMSO	DMSO
		DS MeOH	Méthanol
		DS EtOH	Ethanol
Coccinodiscophycées			Méthanol
		Ske norm 5g/25mL	Ethanol
			Acétone
		Sc eau	Eau
		Sc acétonitrile	Acétonitrile
		Sc éthanol	Ethanol
		Sn acétone	acétone
		Sn éthanol	Ethanol
		Sn méthanol	Méthanol
		Sn dichlorométhane	Ethanol
		Sn chloroforme	Ethanol
		Sn éther diéthylique	Ethanol
		Sn éthanol 130407	Ethanol
		Sn éther diéthylique 130407	Ethanol
		Cylindra DMSO	DMSO
		Cylindra EtOH	Ethanol
		Cylindra EtOH CC	Ethanol
		GS1	Ethanol
		GS2	Ethanol
		GS3	Ethanol
	GS4	Ethanol	
	GS5	Ethanol	
	TP EtOH	Ethanol	
	TP DMSO	DMSO	
	TP MeOH	Méthanol	
	TP Vert EtOH	Ethanol	

		TP Vert EtOH	Ethanol	
		F2 TP EtOH	Ethanol	
		F2 TP EtOH	Ethanol	
			EtOH 122	Ethanol
			Solution Aqueuse 122	Eau
			Solution Ethanologique 123	Ethanol
			Solution Aqueuse 123	Eau
	Dinophycées (Dinoflagellé)		Hn éthanol	Ethanol
		Hn éther diéthylique	Ethanol	

Tableau 3 : extraits de micro-algues obtenus dans le cadre du projet Photomer

Les extraits de microalgues ont été conservés à 4°C sous argon. Leur concentration n'étant pas connue, nous avons choisi pour pouvoir les comparer de les diluer de manière à ce que la densité optique au pic d'absorption testé soit de 0,2. Les dilutions ont été faites extemporanément dans de l'eau ppi. Les extraits insolubles dans l'eau, même après utilisation d'un solvant intermédiaire (éthanol, DMSO, PEG 400) ont été écartés pour être testés dans un second temps. En effet les tests sur cellules cancéreuses exigent une mise en solution dans le milieu de culture, aqueux.

6. Nouvelles synthèses

Une fois qu'une nouvelle molécule photoréactive a été identifiée, il est souvent nécessaire de la re-synthétiser puis de la substituer pour améliorer ses caractéristiques pour la photochimie. Ces modifications peuvent avoir pour but de modifier la pharmacocinétique (cas du SIM01 par rapport à la m-THPC), de décaler le spectre d'absorption vers le rouge (substitutions bathochromes), d'améliorer la stabilité, d'augmenter la liposolubilité (phthalocyanines et cyanines) pour augmenter la résorption, d'améliorer la sélectivité vis-à-vis des cibles biologiques (cas des indirubines). Dans tous les cas, ces modifications chimiques peuvent complètement changer la stabilité des composés, notamment vis-à-vis des protéines, et leur photoréactivité, ce

qui signifie qu'ils doivent être re-testés. Pour ne pas compliquer la présentation des données, nous présentons dans une seule catégorie, en fonction de leur origine, les molécules initiales et leurs dérivés.

B. Les modèles cellulaires

1. Culture cellulaire

Toutes les cellules ont été cultivées dans une salle de culture en surpression munie d'un sas d'entrée. Elles ont été conservées dans des incubateurs à 37°C, dont l'atmosphère était saturée en humidité et contenait 5% de CO₂. Les cellules se multiplient dans des flasques de culture de 25 cm² contenant 6,5 mL de milieu RPMI 1640 (Cambrex/Lonza, France) ne contenant pas de rouge de phénol et supplémenté en L-glutamine (2 mmol/L), auquel on rajoute de la pénicilline (100 unités /mL), de la streptomycine (100 mg/mL) et du sérum de veau fœtal (FCS, 10% en volume). Lorsque ces cellules, toutes adhérentes, arrivent à confluence au bout de deux ou trois jours, elles sont décollées de la flasque par un rinçage avec 2 mL de PBS suivi d'une mise en contact (5 min) avec une solution de PBS - trypsine (0,25%) – EDTA (ethylene diamine tetra-acetic acid, 0.02%). Après centrifugation (10 minutes, 3500 t/min), et reprise du culot cellulaire dans du milieu RPMI, 10 à 20 % des cellules sont remises en culture dans une nouvelle flasque avec un nouveau milieu de culture.

2. Lignées tumorales

Toutes les cellules utilisées ont la particularité de pouvoir induire des tumeurs si elles sont greffées chez l'animal. Cela permet d'effectuer les tests *in vitro* et les tests *in vivo* avec la même lignée, ce qui facilite l'interprétation des résultats obtenus.

a) F98

Les cellules F98 (réf. CRL 2397, American Type Culture Collection, Rockville) sont des cellules d'astrocytome de rat. Elles peuvent être greffées chez la souris "nude" pour donner des tumeurs sous-cutanées, ou chez le rat Fisher de manière intra-cérébrale pour former des gliomes. Elles présentent l'avantage d'être très faiblement immunogènes, contrairement à la plupart des autres modèles de gliomes chez le rat, et d'être chimiorésistantes et radiorésistantes^{160,161}, comme le sont la plupart des glioblastomes humains.

b) A549

Les cellules A549 (ECACC N° 86012804) dérivent d'un adénocarcinome pulmonaire humain. Elles peuvent, greffées chez la souris, donner des tumeurs sous-cutanées ou pulmonaires.

c) HT29

Les cellules HT29 (ECCAC N° 91072201) sont des cellules d'adénocarcinome colique humain. Elles sont fréquemment employées en photochimiothérapie, in vitro ou greffées sous la peau de souris "nude", car elles sont particulièrement résistantes à ce traitement, et les tests réalisés avec cette lignée permettent donc de ne sélectionner que les composés les plus efficaces.

C. Animaux

Les animaux d'expérimentation sont :

Pour les tests de toxicité aiguë, des souris "Swiss" RjOrl mâles de 6 semaines (Elevage Janvier, France). Ce sont des souris albinos à croissance rapide.

Pour les tests d'efficacité sur tumeurs HT 29 : des souris NMRI "nude" mâles de 5 semaines (Elevage Janvier, France). Ce sont des souris caractérisées par une absence presque totale de pelage et une aplasie du thymus ; leur système immunitaire ne rejette pas les greffes, même les xénogreffes, et il est donc possible de leur implanter des tumeurs humaines.

Pour les tests thérapeutiques sur les gliomes de rat : des rats Fisher mâles de 6 semaines (Charles River, France).

Tous ces animaux sont dits « IOPS », c'est-à-dire indemnes de germes pathogènes spécifiques. Ils ont accès à de l'eau et de la nourriture (Aliment d'entretien pour rats/souris, Safe/Augy, France) à volonté ; la nourriture ne contient pas de chlorophylle qui pourrait perturber les mesures de fluorescence in vivo. Ils sont entretenus dans un incubateur situé dans une pièce climatisée (température constante 20°C), avec des cycles d'éclairage et d'obscurité de 12h. La lumière pendant les périodes d'éclairage est réduite pour éviter tout risque d'activation des photosensibilisants chez les animaux traités.

D. Appareillage

1. Mesure de l'absorbance

a) Spectrophotomètre d'absorption

Pour réaliser les spectres d'absorption des photosensibilisants, et déterminer ainsi les meilleures longueurs d'onde d'excitation ainsi que les modifications spectrales induites par une irradiation ou différents solvants, nous avons utilisé un spectrophotomètre double faisceau 8500 UV/VIS (Techcomp[®], Chine). Cet appareil permet des mesures dans une bande spectrale de 190 à 1100 nm grâce à un monochromateur holographique éclairé par une lampe tungstène-halogène et une lampe deutérium. Les échantillons sont placés dans des cuves « semi-micro » en polystyrène avec 2 faces optiques et 1 cm de trajet optique (Starlab, France).

b) Lecteur de microplaques

Pour lire l'absorbance de solutions contenue dans des plaques de culture après une réaction colorimétrique (en particulier les tests de vitalité cellulaire au MTT, cf. ci-dessous), nous avons utilisé un lecteur Opsys MR (Dynex Technologies, USA) qui est un photomètre d'absorption permettant de déterminer la densité optique de solutions contenues dans des 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.

2. Mesure de la fluorescence

a) Spectrofluorimètre à cuve

Pour déterminer le spectre de fluorescence des photosensibilisants, nous avons utilisé un spectrofluorimètre Varian[®] Cary Eclipse, qui permet la mesure des spectres de fluorescence de 4 échantillons simultanément et de réaliser un suivi de fluorescence. La température, qui peut avoir une influence importante sur la fluorescence est réglée et maintenue stable par un système de circulation d'eau (Varian[®] Cary PCB 150 Peltier). La longueur d'onde d'excitation est sélectionnée par un monochromateur à partir d'une lampe à Xénon 150 W. L'émission de fluorescence est détectée dans le plan horizontal perpendiculairement à l'axe du faisceau excitateur par un photomultiplicateur après passage dans un monochromateur. Les échantillons sont placés dans des cuves de section carrée (1 cm de côté) en polyméthacrylate avec 4 faces optiques (Starlab, France).

b) Fluorescence en microscopie

Il est possible d'observer la fluorescence des photosensibilisants directement à l'intérieur de cellules en culture. Nous avons pour cela utilisé une station d'imagerie confocale (Olympus BX 40, France). La lumière excitatrice provient d'un laser (le type diffère en fonction de la longueur d'onde souhaitée). La fluorescence peut être analysée par le système confocal, ou, comme cela a été le cas ici, enregistrée par une caméra (Kappa CF 8/4 monochrome de très haute sensibilité - jusqu'à 2.10^{-5} Lux-) après passage au travers d'un filtre « passe-haut » (ne laissant passer que les longueurs d'onde supérieures à une certaine valeur, et choisi ici pour couper la lumière excitatrice).

c) Spectrofluorimètre à fibre optique

Pour mesurer *in vivo* la fluorescence d'un photosensibilisant après injection nous avons utilisé un spectrofluorimètre à fibre optique (SFFO). Grâce à une fibre optique qui conduit la lumière excitatrice et recueille en même temps l'émission de fluorescence, il est donc possible d'effectuer une détection *in vivo* de la fluorescence en plaçant la fibre directement en contact du tissu cible.

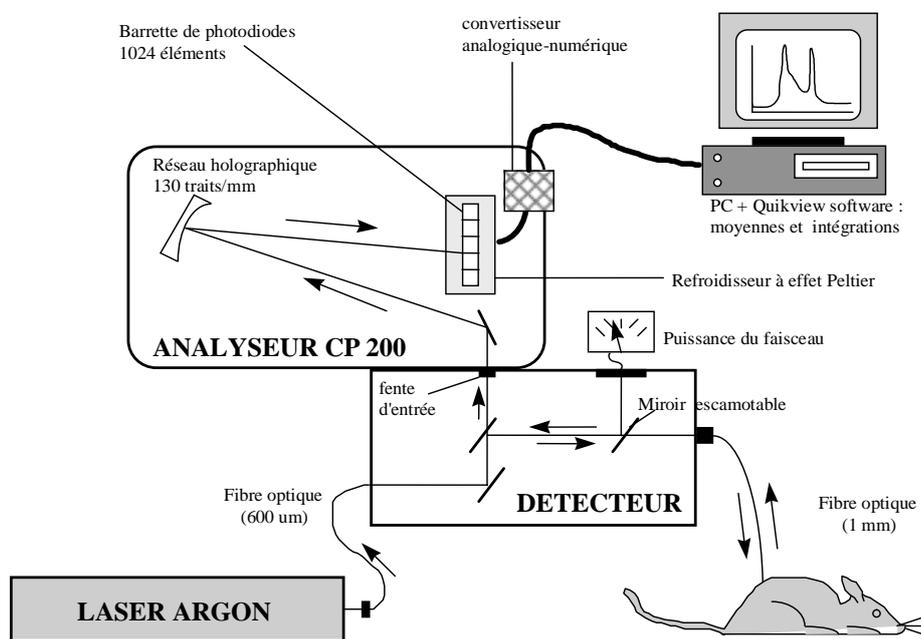


Figure 42 : Schéma de principe du spectrofluorimètre à fibre optique

Le faisceau monochromatique de lumière excitatrice est fourni par un laser argon utilisé en mode monoraie. Cette lumière est conduite jusqu'au SFFO par une fibre optique en silice-silicone de 600 µm de cœur. Elle est ensuite atténuée par une réflexion sur plusieurs miroirs et introduite

dans une monofibre à saut d'indice en silice-silicone avec un diamètre de cœur de 1 mm, après passage à travers une lame semi-réfléchissante à 45° et une lentille achromatique. Cette fibre placée directement sur le tissu, va permettre de conduire la lumière excitatrice et de récupérer la fluorescence émise. Cette fluorescence effectuant le trajet inverse dans la fibre, est séparée de l'excitatrice par des filtres et par un monochromateur soustractif. Le faisceau lumineux est dispersé spectralement par un réseau holographique et transformé en signal électrique par une barrette de photodiodes (1024 éléments) refroidie par effet Peltier et couvrant le domaine spectral 180-1100 nm. Le signal est traité par un ordinateur PC 386 équipé du logiciel Quikview (Jobin Yvon).

3. Sources lumineuses : lasers

Le laboratoire laser dispose de plusieurs lasers continus fournissant les lumières monochromatiques nécessaires à l'excitation des photosensibilisants. Comme nous l'avons vu, les longueurs d'onde les plus intéressantes en photochimiothérapie sont situées dans le rouge et le proche infrarouge, et c'est donc naturellement dans cette gamme que les sources sont les plus nombreuses. Toutefois, il est parfois nécessaire d'utiliser des longueurs d'onde plus courtes, pour les analyses de fluorescence par exemple : les porphyrines ont différents pics d'absorption, le plus intense correspondant à la bande de Soret (390-430 nm). Du fait de la très forte absorption, la fluorescence induite est intense. Par ailleurs il est plus facile de séparer la lumière excitatrice et la fluorescence lorsqu'elles sont de couleurs différentes que lorsqu'elles ne sont distinctes que de quelques nanomètres.

a) Laser Argon ionisé

Le laser à argon peut osciller simultanément à plusieurs fréquences avec des puissances de sortie différentes comme l'indique le tableau ci-contre. Nous avons utilisé des lasers argon Innova 70 et 90 (Coherent, USA) comme source excitatrice de fluorescence (*in vivo*).

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

b) Laser à colorant

Le laser à colorant CR-599 (Coherent, USA) est accordable et peut produire différentes longueurs d'onde. La plage des longueurs d'onde disponibles dépend du colorant utilisé et de son spectre de fluorescence. Nous avons utilisé le colorant DCM spécial qui permet d'obtenir des couleurs allant du rouge orangé au rouge grenat (610 à 710 nm). Ce laser doit être pompé par un autre laser pour fonctionner ; nous avons utilisé un laser argon Inova 90 en mode multi-raies produisant un faisceau d'une puissance d'environ 7 watts.

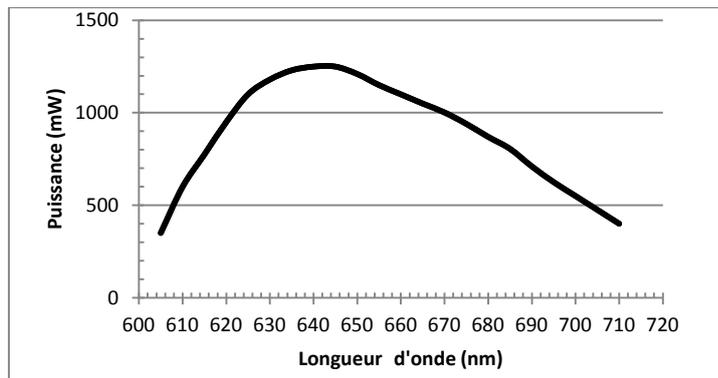


Figure 43 : Puissance laser obtenue avec du colorant DCM special et une puissance de pompe de 5W

c) Laser titane-saphir

Le laser titane-saphir 890 (Coherent, USA) permet d'obtenir des longueurs d'onde allant de 690 à 880 nm (des longueurs d'ondes plus longues sont disponibles en changeant les miroirs). Il est pompé par un laser argon Inova 70.

d) Diodes laser

Nous avons également utilisé 3 diodes laser, qui produisent chacune une seule longueur d'onde, particulièrement adaptée à l'excitation de certains sensibilisants :

Diode 632 nm (Diomed, UK), destinée à l'irradiation de l'HPD.

Diode 652 nm (Diomed, UK), destinée à l'irradiation de la m-THPC et du SIM01.

Diode Pharaon 664 nm (Osyris, France), destinée à l'irradiation de la chlorine e6 et de la Radachlorine.

Ces diodes sont toutes couplées à des fibres optiques (400 ou 600 de diamètre de cœur) et produisent des faisceaux laser d'une puissance pouvant atteindre 2,5 watts en sortie de fibre. Elles sont très simples d'utilisation et ne nécessitent pas de préchauffage.

IV. Méthodes

A. *In vitro*

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

Les spectres d'absorption ont été obtenus sur une plage de longueurs d'onde allant de 300 à 800 nm avec des solutions de photosensibilisants à une concentration de 10 µg/mL. Les dilutions ont été réalisées dans de l'eau ppi.

La stabilité du produit est évaluée en fonction de deux facteurs, la présence de FCS (immédiatement et après 24h) et l'irradiation.

Sauf exception signalée, 4 spectres d'absorption ont été réalisés :

- 1- Un spectre du photosensibilisant à 10 µg/mL en solution dans l'eau.
- 2- Un spectre d'une solution à la même concentration et contenant 10% (en volume) de FCS (Cambrex/Lonza, France)
- 3- Un spectre de cette même solution (conservée à 20°C, à l'abri de l'air et de la lumière) après 24 heures.
- 4- Un spectre d'une solution contenant le PS à 10 µg/mL, 10% de FCS, après irradiation au maximum d'absorption (1 mL de solution dans une cuve carrée de 1 cm de côté irradiée à 10 Joules/cm²).

2. *Spectrofluorimétrie*

Le spectre est réalisé avec une solution à 10 µg/mL avec 10% de FCS. Les longueurs d'onde d'excitation testées correspondent à tous les pics et épaulements identifiés sur le spectre d'absorption. La fluorescence a été analysée sur une plage allant de la longueur d'onde immédiatement supérieure à la longueur d'onde d'excitation (cf. loi de Stokes, *II.A.2.e*), jusqu'à 900 nm.

3. *Tests de photoréactivité*

a) Test à la DCFH

La dichlorofluorescéine a été stockée sous forme de diacétate de dichlorofluorescéine (DCFDA, Sigma-Aldrich, France) très stable. Nous avons préparé des solutions alcooliques de DCFDA à 0,5 mg/mL. 2 mL de ces solutions ont été ajoutés à 8 mL d'une solution aqueuse de soude (NaOH) à 10⁻² mol/L. La solution ainsi obtenue a été mise à l'abri de la lumière à 20°C pendant 30 minutes, temps pendant lequel se forme la DCFH. Cette solution a ensuite été neutralisée par

l'ajout de 40 mL de tampon phosphate à 250 mmol/L à pH 7,2 (1,7 g de KH_2PO_4 + 1,78 g de Na_2HPO_4 pour 100 mL d'eau distillée). Le réactif ainsi constitué a été mis au bain marie (30°C) et est utilisée dans les 4 heures suivant sa préparation. Pour tous les tests de photoréactivité, le même lot de FCS a été utilisé (Sérum de veau fœtal, lot 3SB0008, Cambrex/Lonza, France).

Le test fait intervenir 3 cuves de spectrofluorimètre :

- La cuve 1 contient 50 μL d'une solution de photosensibilisant à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 μL de FCS et 400 μL d'eau. Cette cuve est irradiée à la longueur d'onde adaptée au photosensibilisant avec une fluence 10 ou 20 J/cm^2 .
- La cuve 2 contient le même mélange mais n'est pas irradiée. Elle permet de vérifier qu'aucune oxydation n'intervient en absence de lumière.
- La cuve 3 contient 50 μL de FCS et 450 μL d'eau, et est irradiée. Elle permet de tenir compte de la légère photoréactivité du sérum, due aux photosensibilisants endogènes (cf. I.B.3).

1 mL de la solution de DCFH est ajouté immédiatement après la fin de l'irradiation, ou directement après préparation pour la cuve 2. Les 3 cuves sont placées dans le spectrofluorimètre Cary Eclipse thermostaté à 30°C. La fluorescence de la DCF (pic à 525 nm après excitation à 488 nm) dans les 3 cuves a été mesurée toutes 2 minutes pendant 66 minutes. L'aire sous la courbe correspondant à l'évolution de la fluorescence dans la cuve 1 est d'autant plus grande que le produit est photoréactif. Le score attribué au produit testé correspond à cette aire et est exprimé en unités arbitraires (1 U = l'aire d'une fluorescence constante de 100 pendant 66 min).

b) Test au luminol

Les solutions de luminol ont été préparées ainsi : 1,42 g de Na_2HPO_4 et 50 mg de luminol (luminol 3-aminophthalhydrazide, Sigma-Aldrich, France) ont été dissouts dans 90 mL d'eau distillée. 10 mL de soude (NaOH) à 1 mol/L ont été ajoutés à la solution. La solution ainsi préparée a été conservée à 4°C et à l'abri de la lumière avant utilisation. Elle a été utilisée dans les 72 heures suivant sa préparation.

Les réactifs ont été placés au bain-marie à 30°C avant utilisation. Le test fait intervenir 5 cuves :

- La cuve 1 contient 50 μL d'une solution de photosensibilisant à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 450 μL d'eau et 1 mL de solution de luminol. Cette cuve est irradiée à la longueur d'onde adaptée au photosensibilisant avec une fluence 10 ou 20 J/cm^2 .
- La cuve 2 est identique à la cuve 1 mais n'est pas irradiée.
- La cuve 3 contient 50 μL d'une solution de photosensibilisant à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50 μL de FCS, 400 μL d'eau et 1 mL de solution de luminol. Cette cuve est irradiée.

- La cuve 4 est identique à la cuve 3 mais n'est pas irradiée.
- La cuve 5 contient 50 µL de FCS, 450 µL d'eau et 1 mL de solution de luminol. Cette cuve est irradiée.

Les cuves sont conservées à l'abri de la lumière pendant 15 minutes, puis sont placées dans le spectrofluorimètre Cary Eclipse (thermostaté à 30°C) pour mesurer la fluorescence du luminol oxydé (acide aminophtalmique, pic de fluorescence à 485 nm après excitation à 395 nm). L'intensité de fluorescence est d'autant plus grande que le photosensibilisant testé est photoréactif. Le score attribué à la drogue testée correspond à l'intensité de fluorescence en unités arbitraires.

4. Pharmacocinétique et biodistribution des photosensibilisants par imagerie de fluorescence

Après trypsination, centrifugation et reprise du culot dans du milieu RPMI, les cellules (HT29 ou F98) ont été dénombrées, et la solution diluée de manière à obtenir une concentration de 10^5 cellules/mL. 100 µL de cette solution ont été déposés sur des lamelles rondes (Ø 14 mm) en verre disposées dans une plaque de culture à 24 puits. Après 24 h les cellules ont adhéré à la lamelle, et l'on a rajouté dans chaque puits 400 µL de milieu de culture contenant le sensibilisant (10 µg/mL). Les plaques de culture ont ensuite été conservées dans l'incubateur à 37°C. Toutes les heures suivant l'ajout du photosensibilisant, une lamelle a été rincée avec du PBS (pH 7,2, 37°C), déposée sur une lame et observée au microscope à fluorescence. L'analyse de la fluorescence du photosensibilisant a été réalisée après excitation par la lumière d'une lampe Xénon 150 W filtrée ou d'un laser, en utilisant la caméra Kappa.

La cinétique d'incorporation a été déterminée en utilisant les images de fluorescence. L'intensité moyenne de fluorescence du cytoplasme (aucun PS étudié ici n'a engendré de fluorescence nucléaire) de 10 cellules a été calculée au moyen du logiciel d'analyse d'images Kappa Image Base et de Photoshop® pour chaque condition.

5. Détermination de la phototoxicité

a) Implantation et incubation

100 µL d'une solution contenant 10^5 cellules par millilitre ont été déposés dans chacun des 24 puits centraux d'une plaque de culture 96 puits. Cette disposition facilite l'étape d'irradiation. Quatre puits ont été utilisés pour chaque condition expérimentale. Pour chaque temps d'incubation, 2 plaques de cultures ont été préparées, une servant à étudier la toxicité en absence

de lumière et l'autre la phototoxicité. Les plaques de culture ont été conservées pendant 24 heures dans l'incubateur (37°C, 5% CO₂).

Les cellules ont ensuite été mises en contact avec des concentrations croissantes de photosensibilisant, de 0 (solvant uniquement) à 10 µg/mL sauf indication contraire, pendant 1, 2 ou 4 heures. A partir de cette étape, les plaques ont été conservées à l'abri de la lumière pour éviter toute activation intempestive du photosensibilisant. Les dilutions des solutions de photosensibilisants dans le milieu de culture ont été effectuées extemporanément, mais en dehors des plaques de culture, ce qui est particulièrement important dans le cas des photosensibilisants en solution dans le DMSO (cas des indirubines), car la dissolution est très exothermique.

Cas du SIM01 en association avec des inhibiteurs de protéine-kinase:

Pour vérifier que les deux traitements étaient compatibles et que les IPK ne modifiaient pas la captation ou la métabolisation du photosensibilisant, nous avons procédé comme indiqué ci-dessus, mais les cellules ont été exposées, dès leur implantation en plaque de culture, à différentes concentrations d'IPK (0; 50 ou 100 µmol/L de thalidomide; 0; 1,75; 3,5 ou 7 µmol/L de STI571).

b) Irradiation

Les irradiations des plaques de culture ont été réalisées avec la lumière de lasers dont la longueur d'onde correspondait au pic d'absorption du PS. Le faisceau était focalisé dans une fibre optique en silice-silicone de 400 µm de cœur. La fibre était maintenue orthogonalement aux plaques de cultures à une distance permettant l'irradiation de l'ensemble des puits en une seule fois. La puissance en sortie de fibre (500 mW) a été calibrée avec un mesureur de puissance (Coherent, France), et le temps d'exposition a été ajusté pour obtenir une densité énergétique de 10 ou 20 J/cm².

c) Mesure de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été déterminée par l'utilisation du test colorimétrique MTT¹⁶². Le MTT est un sel de couleur jaune, du bromure de 3-[4,5-Diméthylthiazol-2-yl]2,5-diphényltétrazolium 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 (irradiation) 15 µl de MTT en solution (5 mg/mL) dans du PBS ont été ajoutés à chacun des puits contenant les cellules et 100 µl de milieu sans FCS (les puits ont été préalablement rincés). Après une incubation de 4 h (37°C, 5% de CO₂), les cellules ont été lysées avec 150 µl par puits d'une solution d'HCl et d'isopropanol (1:24 vol/vol) afin de solubiliser le

formazan (MTT réduit). L'utilisation d'une sonde à ultrasons a permis d'homogénéiser la solution présente dans chaque puits. Le lecteur de plaque 96 puits Opsys MR (Dynex Technologies, USA) a été utilisé pour déterminer la densité optique (DO) à 570 nm. Les valeurs de DO mesurées sur des puits « contrôles » (contenant le milieu, le mélange isopropanol/HCl et le MTT mais ne contenant pas de cellules) ont été moyennées et soustraites des valeurs brutes. Le pourcentage de survie cellulaire a été déterminé en prenant pour témoin (100 %) les 4 puits contenant des cellules non traitées.

B. Les modèles tumoraux in vivo

Les premières tumeurs HT29 ou A549 ont été obtenues après injection sous cutanée à une souris "nude" (en regard du grand trochanter droit) de 0.1 mL d'une solution contenant entre 1×10^6 et 2×10^6 cellules tumorales. Après environ 3 semaines l'animal a été sacrifié, et la tumeur, mesurant alors environ 2 cm de diamètre, prélevée, en évitant soigneusement les zones hémorragiques ou nécrotiques. La tumeur a ensuite été dilacérée dans du sérum physiologique pour former une suspension épaisse, qui a été injectée (0,1 mL SC) aux souris qui ont été incluses dans l'expérimentation. Les traitements ont été entrepris lorsque les tumeurs greffées avaient un diamètre 8 à 10 mm (après 10 jours environ).

1. Etude de pharmacocinétique

Cette étude n'a été réalisée ici que pour la Radachlorine et la chlorine e6 dont la fluorescence est facilement utilisable pour de telles études. L'injection du photosensibilisant a été réalisée par voie intraveineuse (IV). Les concentrations des solutions étaient adaptées pour que le volume injecté soit toujours de 0,2 mL pour tous les groupes.

La détermination de la sélectivité d'accumulation tumorale du photosensibilisant, par calcul du rapport $\frac{\text{fluorescence tumorale}}{\text{fluorescence cutanée}}$ et du rapport $\frac{\text{fluorescence tumorale}}{\text{fluorescence oreilles}}$ a été réalisée avec des souris "nude" porteuses de greffes HT29. Grâce au spectrofluorimètre à fibre, la mesure de l'évolution de l'intensité de fluorescence du PS au sein des tissus est non invasive et a pu être fréquemment répétée. Pour une expérimentation, 3 souris ont été utilisées. La fluorescence a été mesurée au niveau de la tumeur, du muscle quadriceps fémoral droit (mesure transcutanée), et de la peau (au niveau des oreilles), régulièrement après l'injection (0,5 ; 1 ; 2 ; 3 ; 4 ; 5 ; 6 ; 7 et 24 heures).

Pour connaître l'évolution de la concentration dans d'autres organes, le PS a également été injecté à des souris "Swiss" qui ont été sacrifiées à différents temps, choisis en fonction de l'étape précédente (0 -pas d'injection-; 1 ; 5 ; 7 ; 9 ; 25 heures ; 3 souris par condition). Les organes ont

été prélevés et la fluorescence du PS mesurée immédiatement. Les mesures ont été effectuées sur:

- le cerveau
- la peau (prélevée en regard du thorax)
- le quadriceps fémoral droit
- les poumons
- le foie
- la vésicule biliaire
- la rate
- les reins
- la vessie (prélevée avec précaution, pour conserver l'urine qu'elle contient)
- les fèces (prélevées dans le rectum)

Pour ces mesures, l'extrémité de la fibre optique a été mise au contact des tissus étudiés et le signal de fluorescence recueilli. La lumière excitatrice provenait d'un laser à Argon dont la raie (501,7 nm) avait été choisie en fonction des résultats de spectrofluorimétrie. Trois mesures ont été réalisées pour chaque organe de manière à minimiser l'impact des imprécisions de mesure et 3 souris par temps, pour compenser les variations individuelles de distribution de chaque photosensibilisant. Les spectres ont été enregistrés sur toute la plage de longueurs d'onde possibles (280 – 1200 nm) de manière à pouvoir prendre en compte les décalages (« shifts ») éventuels du maximum de fluorescence (situé à 666 nm), et à détecter l'apparition éventuelle de pics secondaires.

2. Etude de l'effet de la photochimiothérapie sur souris "nude"

Les photosensibilisants ont été dilués à différentes concentrations de manière à ce que le volume injecté soit toujours de 0,2 mL, et que la quantité de solvant injectée soit toujours la même quelle que soit la dose de photosensibilisant administrée. Les photosensibilisants ont d'abord été injectés (IP ou IV) aux souris "nude" porteuses d'une tumeur greffée. Après différents délais choisis selon les résultats des études pharmacocinétiques, les souris, préalablement anesthésiées avec du thiopental (40 mg/kg) ont été placées en décubitus latéral gauche et ont été irradiées à l'aide d'une diode laser ou du laser à colorant, avec une puissance en sortie de fibre de 300 mW. La distance entre l'extrémité de la fibre, perpendiculaire à la surface cutanée, et la souris a été ajustée de manière à ce que la tumeur soit inscrite dans le disque lumineux (l'irradiation est

effectuée à travers la peau). Les durées d'irradiation ont été choisies pour délivrer une énergie de 100 à 300 J/cm².

Systématiquement, des souris témoins ayant subi la même greffe mais non traitées ont permis de connaître la croissance tumorale "normale". De plus des souris « contrôles », traitées uniquement avec le photosensibilisant ou seulement irradiées ont permis de s'assurer de l'absence d'effets liés à la toxicité du photosensibilisant ou un éventuel effet thermique de l'irradiation. Les résultats sont présentés sous forme d'un graphique qui représente l'évolution de l'indice de croissance tumoral en fonction du temps.

Cet indice de croissance a été déterminé tous les deux jours après PDT jusqu'au sacrifice des animaux, et a été calculé à partir du diamètre moyen de la tumeur (nodule à peu près sphérique) :

$$\frac{D_J - D_0}{D_0} \times 2$$

L'indice du jour J est calculé ainsi : _____.

L'indice est donc égal à 1 au jour du traitement (J₀), et égale à 2 lorsque le diamètre tumoral a doublé.

3. Modèle de gliome chez le rat

a) Injection de cellules gliales

Les animaux utilisés étaient des rats mâles Fisher (Charles River, France) âgés de 7 semaines et pesant 200 grammes environ au moment de leur inclusion.

Les cellules de gliomes de rat F98 ont été trypsinées, centrifugées puis mises en suspension dans du milieu de culture (sans FCS). Les cellules ont été dénombrées et la concentration ajustée à 10⁶ (ou 2 x 10⁶) cellules par mL. Cette solution a été injectée aux rats au maximum 1 heure après préparation.

L'analgésie des animaux était assurée par une injection sous-cutanée de morphine, à 2 mg/kg, 15 minutes avant l'intervention. Les animaux ont été ensuite anesthésiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique, à 1 mL/kg, et la peau de la zone opératoire rasée et désinfectée.

Les animaux ont ensuite été placés dans un support opératoire, et l'intervention chirurgicale débute:

-Incision cutanée.

-Trépanation de 1 mm de diamètre 3,5 mm latéralement au bregma, à droite.

-Injection de 10^4 cellules F98 dans 5 ou 10 μ L de milieu de culture (RPMI), 7 mm sous la table osseuse (seringue Hamilton 10 μ L, aiguille 27 gauges). Les cellules sont injectées dans le noyau caudé.

-Obstruction du trou de la boîte crânienne par de la cire Horsley.

-Suture cutanée.

Les rats présentant des troubles liés au développement tumoral tels que des saignements oculaires, des convulsions, une apathie marquée, ou d'autres signes de douleur ont été euthanasiés par injection de pentobarbital sodique à 5 mL/kg (nous avons ajouté 1 jour pour les calculs de durée de survie).

b) Traitement par PDT

Le 11^{ème} jour après la greffe intra-cérébrale, les animaux ont subi une injection intra-péritonéale de SIM01 (2 mg/kg, 4 mg/kg ou 10 mg/kg).

12 heures après l'injection de photosensibilisant, l'irradiation laser intra cérébrale a été réalisée au moyen d'une diode Laser (DIOMED) à une longueur d'onde de 652 nm. Le faisceau laser était transmis jusqu'au tissu cible par une fibre optique en silice-silicone avec un diamètre de cœur de 400 μ m (Quartz et Silice[®], France). La puissance du laser en sortie de fibre a été calibrée avec un puissance-mètre (Coherent, Orsay, France) pour atteindre 100 mW. La fluence utilisée était de 100 ou 150 J/cm².

Les animaux présentant un œdème après le traitement ou des signes de déficit nerveux centraux ont été traités avec des corticoïdes (dexaméthasone, 0,4 mg/kg, SC).

c) Analyse anatomo-pathologique

Elle visait à évaluer les caractéristiques de la tumeur gliale (atypies nucléaires, index mitotique, prolifération endothéliale et nécrose) et la nécrose induite par le traitement photochimique. Elle a été réalisée par le Dr Delphine Loussouarn du département d'Anatomie Pathologique du CHU de Nantes.

C. Statistiques

Les comparaisons statistiques de moyennes ont été réalisées en utilisant le test t de Student ou le test de Mann-Whitney pour les échantillons n'ayant pas une distribution normale (logiciel Sigmastat[®], Systat Software Inc., USA) ; les comparaisons statistiques des courbes de croissance tumorale ont été réalisées au moyen d'un test non paramétrique spécifique publié par J.A. Koziol et D.A. Maxwell¹⁶³ implémenté dans le logiciel "Test non paramétrique de comparaison de courbe de croissance" mis à disposition par l'Institut de Statistique de

l'Université de Louvain, Belgique. Ce test a l'avantage de permettre la comparaison de courbes de croissance tumorale sur de petits échantillons (sans hypothèse de normalité des échantillons), et peut être réalisé même s'il manque des données pour quelques individus à un temps donné. Le résultat du test est positif ($p < 0,05$) si au moins une des courbes comparées est inférieure aux autres.

RESULTATS

V. Résultats

A. In vitro

Pour clarifier la présentation des résultats nous allons dans un premier temps présenter des exemples de résultats obtenus pour chaque type d'expérimentation, puis nous fournirons ensuite des tableaux synthétiques avec l'ensemble des données numériques pertinentes pour les composés testés.

1. Spectrométrie et stabilité en solution

a) Spectre d'absorption

(1) SIM01

Le spectre d'absorption du SIM01 sans FCS obtenu immédiatement après la préparation de la solution à 10 $\mu\text{g/mL}$ (cf. Figure 44, courbe noire), montre quatre pics principaux à 417 nm ($\epsilon_{417\text{nm}} = 33479 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 511 nm ($\epsilon_{511\text{nm}} = 9374 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 595 nm ($\epsilon_{595\text{nm}} = 4141 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) et 647 nm ($\epsilon_{647\text{nm}} = 13017 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

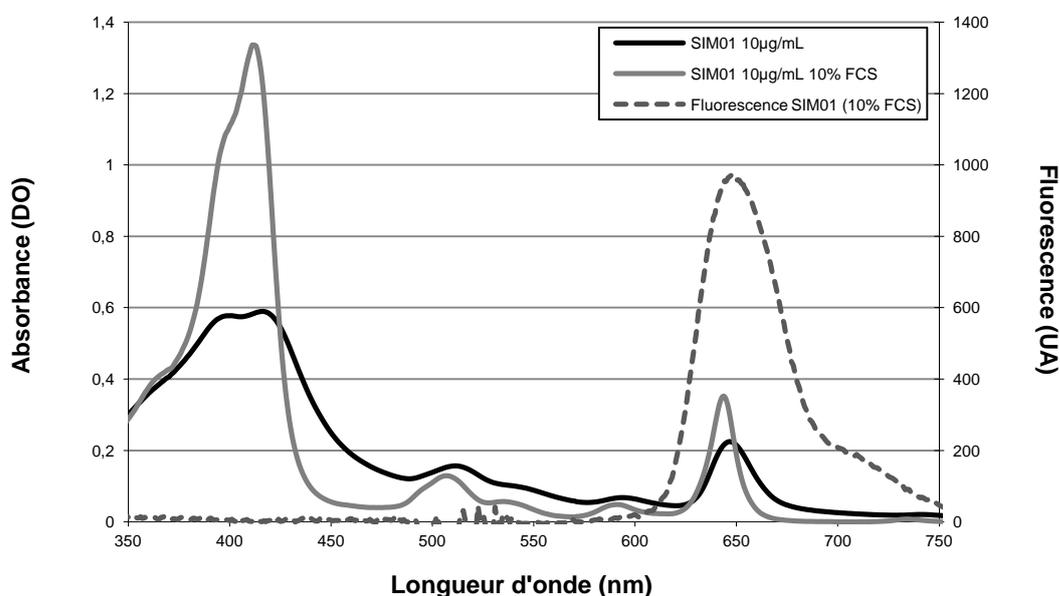


Figure 44 : Spectres d'absorption et de fluorescence du SIM01.

(2) Cyanines et phthalocyanines

Les composés testés n'ont dans un premier temps pas été choisis en fonction de leur capacité à absorber la lumière rouge, mais en fonction de leur photoréactivité supposée. Cela explique que les pics d'absorption observés se répartissent sur presque tout le spectre visible, de 427 à 707 nm (cf. *Figure 45* et *Tableau 4* p 93). Ils présentent en général un seul pic d'absorption, étroit et intense.

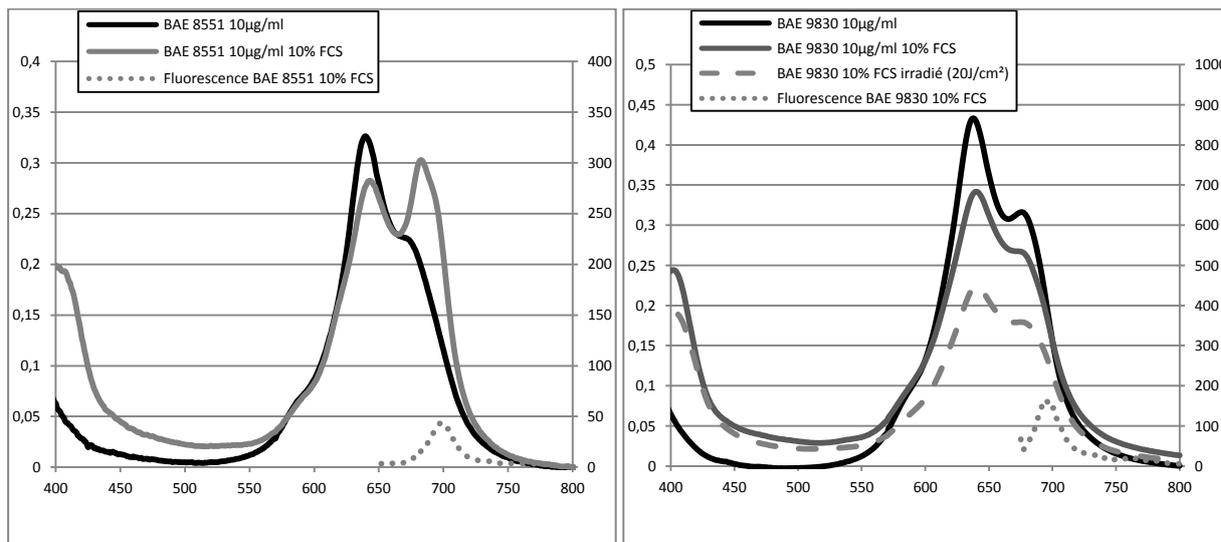


Figure 45 : spectres d'absorption et de fluorescence de 2 phthalocyanines.

(3) Radachlorine

Le spectre d'absorption du mélange Radachlorine a 4 pics d'absorption principaux (cf. *Figure 46*, courbe noire), à 403 nm ($\epsilon_{403nm}=170,5 \text{ dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), 504 nm ($\epsilon_{504nm}=13,9 \text{ dm}^3 \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$),

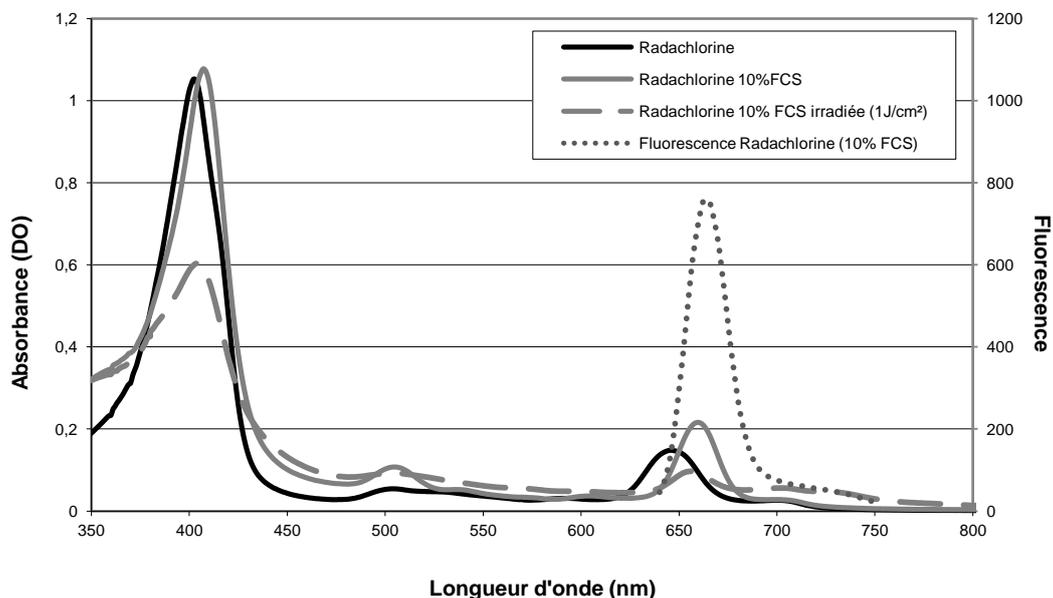


Figure 46 : Spectres d'absorption et de fluorescence de la Radachlorine.

646 nm ($\epsilon_{646\text{nm}}=38,1 \text{ dm}^3.\text{g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) et 700 nm ($\epsilon_{700\text{nm}}=5,5 \text{ dm}^3.\text{g}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). De légers décalages de longueur d'onde peuvent apparaître si l'on fait varier la concentration.

(4) Indirubines

Les indirubines absorbent la lumière entre 420 et 600 nm (cf. *Figure 47*), avec un pic d'absorption entre 481 et 535 nm à l'exception de la bis-indigotine qui a un pic à 560 nm. Le détail des pics d'absorption des indirubines testées est présenté sur le *Tableau 6* (p 96).

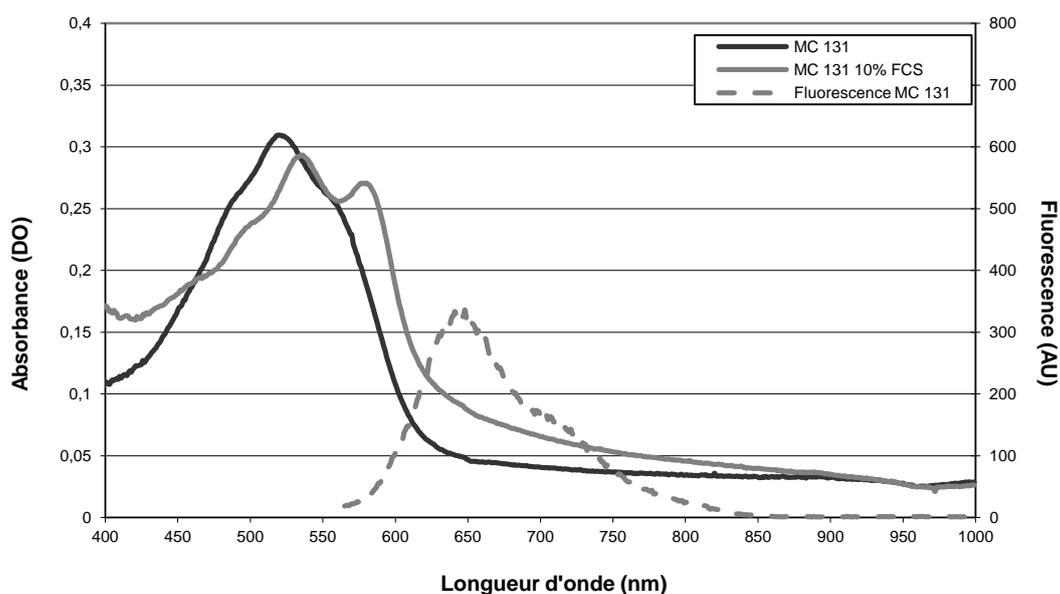


Figure 47 : Spectres d'absorption et de fluorescence d'une indirubine.

(5) Extraits de microalgues

Les extraits de microalgues reçus par le laboratoire sont des mélanges de pigments en solution, dont la concentration n'est pas connue (la purification et la caractérisation des fractions actives est en cours actuellement). La réalisation des spectres d'absorption permet d'identifier les pics dont on testera la photoréactivité. Ces mélanges contenant des composés tétrapyrroliques, nous retrouvons fréquemment un pic d'absorption dans la bande de Soret, ainsi que des pics secondaires entre 500 et 700 nm (cf. *Tableau 9*, p 100).

b) Stabilité

(1) Stabilité en milieu protéique

(a) SIM01

Le SIM01 est stable en présence de sérum (FCS). De légers décalages et variations d'intensité sont toutefois observés (cf. *Figure 44*), comme par exemple un décalage du pic à 647 nm qui est observés à 644 nm avec une augmentation d'intensité, comme cela a été décrit précédemment¹⁵⁵.

(b) *Cyanines et phthalocyanines*

La série de composés testés comprend des produits très instables, dont le spectre est fortement modifié en présence de sérum (X-blue-5, IM35, MOD 216, BAE 9516...), des modifications allant jusqu'à la disparition d'un pic sur le spectre et l'apparition d'un autre (cf. *Figure 45* et *Tableau 4 p 93*). D'une manière générale, ces composés sont susceptibles de s'agréger en milieu protéique, l'agrégation se caractérisant par la formation d'un pic fin et intense ; les premiers composés testés ont été les moins stables. Au fur et à mesure que leur sont parvenus les résultats des tests de stabilité en milieu protéique, les chimistes de l'Université de Fribourg ont identifié les facteurs d'instabilité et les liaisons à protéger, et ont donc adressé au laboratoire des composés de plus en plus stables. Les derniers composés chez l'animal, BAE 9048 et BAE 9830 présentent des décalages de moins de 10 nm des pics d'absorption en présence de protéines ; l'ajout de FCS entraîne en revanche une diminution d'environ 20% de l'absorption du BAE 9830.

(c) *Radachlorine*

La présence de FCS dans une solution de Radachlorine induit des modifications immédiates, dont un décalage du premier pic de 403 à 407nm, sans changement d'intensité. Le pic à 504 nm présente une augmentation de 50%, et celui à 646 nm de 32%, associée à un décalage de +14 nm. Le pic à 700 nm ne subit qu'un décalage de 1 nm et une augmentation de 7% (cf. *Figure 46*, courbe grise). Après 24h, les changements observés sont plus limités, le plus important étant une augmentation de 13% du 4^{ème} pic.

(d) *Indirubines*

Lorsqu'on réalise le spectre en présence de FCS, on observe pour 12 composés des modifications spectrales importantes (décalage du pic d'absorption de plus de 5 nm, ou modification de l'intensité du pic de plus de 15%). On observe même un épaulement ou un nouveau pic après 24h pour MC131 (580 nm), MLS2044 (533 nm), MLS2048 (566 nm), MC136 (571 nm), MLS2041 (573 nm), MLS2039 (582 nm), et 6BIO (694 nm), ce qui suggère une interaction forte entre ces composés et le FCS.

(e) *Extraits de microalgues*

A ce stade de purification, il est difficile d'interpréter les résultats obtenus. Il est en revanche indispensable de connaître les longueurs d'onde absorbées par les extraits après mise en contact avec du sérum pour connaître les longueurs d'onde à utiliser pour les tests de photoréactivité (cf. *Tableau 9*, p 100).

(2) Stabilité sous flux lumineux

(a) *SIM01*

Le SIM01, de même que la m-THPC dont il est dérivé, est très stable sous flux lumineux.

(b) *Cyanines et phthalocyanines*

De la même manière que pour la stabilité en présence de protéines, ces composés ont donné des résultats très hétérogènes. La majorité présente une bonne stabilité sous flux lumineux, à l'exception des JA7407, 3RS/PE3077, 2RS/PE2449, 1RS/PE2439 pour lesquels on observe un fort bleaching après une irradiation de 20 J/cm².

(c) *Radachlorine*

La Radachlorine, de même que son composant principal la chlorine e6, est fortement « bleachée » après une irradiation en présence de sérum. Une irradiation de seulement 1 J/cm² induit une diminution de 50% de l'intensité des pics d'absorption (cf. *Figure 46*, courbe grise discontinue). Une irradiation supplémentaire modifie le spectre de manière beaucoup plus modérée. On observe également après irradiation une augmentation de pics auparavant à peine détectables, à 703 et 730 nm. Ces pics peuvent correspondre à une augmentation de la concentration en purpurine 18 qui est un produit d'oxydation de la chlorine e6 et de la purpurine 5.

(d) *Indirubines*

Ces composés n'étant disponibles qu'en très faible quantité, le test de stabilité sous flux lumineux n'a pas été effectué.

(e) *Extraits de microalgues*

Le test de stabilité sous flux lumineux n'a pas été réalisé sur ces mélanges de pigments, mais sera réalisé sur les produits purifiés.

c) Spectrofluorimétrie

(1) SIM01

Excité à 488nm, la molécule de SIM01 présente un pic de fluorescence à 649 nm puis un épaulement entre 700 et 750 nm (cf. *Figure 44*). La position des pics n'est pas modifiée par la présence de sérum, mais l'intensité de fluorescence est fortement augmentée.

(2) Cyanines et phthalocyanines

Ces composés sont presque tous fluorescents, et leur fluorescence est le plus souvent intense (*Tableau 4*, p 93). Il est en revanche difficile d'exploiter cette fluorescence pour un suivi pharmacocinétique de ces drogues, car le pic de fluorescence est proche du pic d'absorption utilisé pour l'excitation.

(3) Radachlorine

Le spectre de fluorescence de la Radachlorine présente un pic à 657 nm, avec un épaulement à 710 nm. La fluorescence la plus intense a été obtenue après une excitation à 402 nm. Curieusement, le spectre de fluorescence et le spectre d'excitation de la Radachlorine (intensité de fluorescence à 657 nm en fonction de la longueur d'onde d'excitation), ne sont pas différents de ceux de la chlorine e6, ce qui signifie que les différents constituants de la Radachlorine ont des propriétés de fluorescence très proches.

(4) Indirubines

Pour les indirubines fluorescentes, nous avons observé un pic principal plus ou moins étendu, avec parfois l'apparition d'un plateau ou même d'un second pic. D'une manière générale, les indirubines sont des composés faiblement fluorescents. Aucune fluorescence n'a été détectable pour 11 composés (bis-indigotine, 5BIO, 6BIO, MLS2048, MLS2044, MLS2060, MLS2061, MC 135, MC 136, AB 187, AB 194). Lorsque la fluorescence a été mesurée en présence de FCS, des modifications des spectres ont été notées, consistant en une modification de l'intensité de fluorescence (augmentée ou diminuée), associée ou non à un décalage du maximum de fluorescence (cf. *Tableau 7*, p 97). La forme du spectre n'a en revanche pas été modifiée.

(5) Extraits de microalgues

Ces extraits sont fluorescents. Il n'a pourtant pas paru pertinent d'étudier en détail cette fluorescence, car dans les étapes ultérieures utilisant des cellules, il n'aurait pas été possible de savoir si la fluorescence observée était le fait du constituant le plus photoréactif, ou d'un composé seulement fluorescent.

Notons que l'on observe sur les spectres de fluorescence des pics, étroits, qui ne correspondent pas à de la fluorescence : les raies Rayleigh (provenant de la diffusion de la lumière excitatrice et observables à la longueur d'onde d'excitation), Raman (raie du solvant), et de second ordre (raie observée à 2 fois la longueur d'onde d'excitation). Ces raies sont facilement identifiables car elles sont également observées dans une cuve ne contenant que le solvant.

2. Photoréactivité

Les scores, qui dépendent directement d'intensités de fluorescence (grandeurs sans unité), sont exprimés en unité arbitraires, et l'interprétation nécessite donc de les comparer aux scores de photosensibilisants connus.

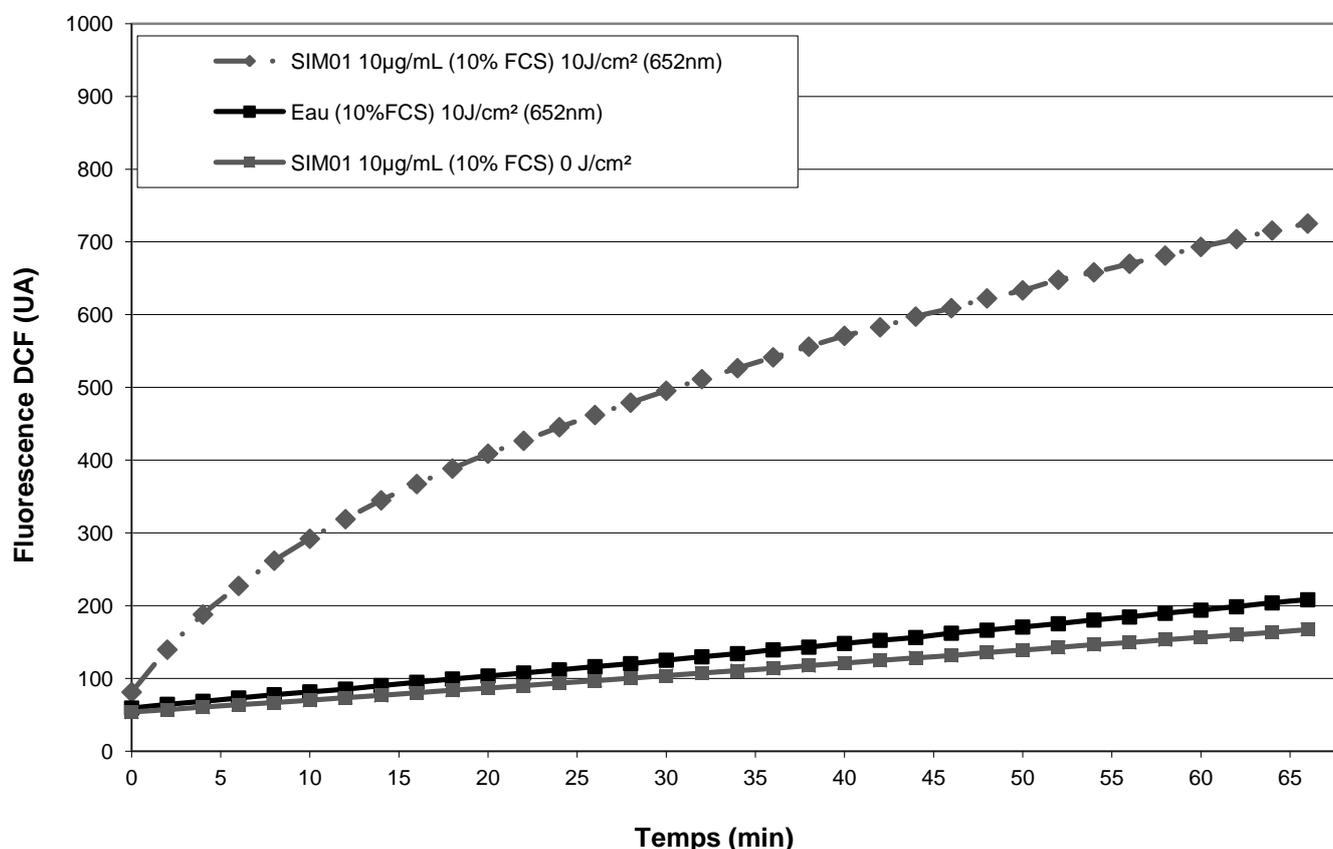


Figure 48 : Résultat du Test de photoréactivité pour le SIM01.

a) SIM01

Le SIM01 a montré, après une irradiation de 20 J/cm² à 652 nm une production de ROS de 6,63 avec le test DCF (cf. Figure 48), ce qui est un excellent score. Pour des raisons optiques et d'influence du pH, le test au luminol donne un résultat positif mais faible (51 UA).

b) Cyanines et phthalocyanines

Le Dr D. Moigno disposait déjà d'informations sur ses composés de synthèse. Ceux qui ont été adressés au laboratoire ont entre autre été sélectionnés parce qu'ils étaient instables à la lumière. Ce critère était pertinent puisque tous les produits testés se sont avérés photoréactifs. Les tests de photoréactivité ont ensuite permis d'identifier les séries de composés les plus prometteuses, car nous avons trouvé une très grande hétérogénéité de réactivité avec des scores (DCF) allant de 0,18 à 6,37 (cf. *Tableau 5*, p 94). Il a également été possible d'améliorer les drogues synthétisées : lorsque des composés très photoréactifs ont donné des résultats décevants en photochimiothérapie sur cellules (comme les BAE 8506, BAE 8507, BAE 9010, BAE 9012), nous avons pu déterminer que cette faible phototoxicité devait être due à une pénétration cellulaire insuffisante et non à un déficit de photoréactivité. Effectivement, la synthèse de composés proches mais disposant de substituants lipophiles a permis de nettement améliorer l'efficacité sur cellules (BAE 8557, BAE 8551, BAE 9048, BAE 9177).

c) Radachlorine

La Radachlorine a donné un score de 4,97 UA (DCF) légèrement supérieur à celui de son constituant principal testé pur dans les mêmes conditions, la chlorine e6 (4,83 UA) après une irradiation de 20 J/cm² à 664 nm. Compte tenu des résultats précédents concernant la stabilité sous flux lumineux, faible pour ces composés, nous avons testé des fluences plus faibles (1, 2, 5 et 10 J/cm²). Une irradiation d'1 J/cm² permet d'obtenir un score de 3,95 UA (DCF) et une irradiation de 2 J/cm² un score de 4,39, ce qui signifie qu'il est inutile d'effectuer une longue irradiation de ce composé : dès les premières secondes d'irradiation a lieu une intense production de ROS qui participe au "bleaching" du photosensibilisant. L'énergie lumineuse apportée par la suite n'est quasiment pas absorbée et ne conduit en conséquence qu'à une faible augmentation de la quantité de ROS produits. Nous avons souhaité étudier le comportement de la Radachlorine sous irradiation pulsée, en espérant pouvoir limiter le "bleaching" et donc augmenter la quantité de ROS produits. En utilisant les fonctionnalités de la diode Pharaon 664, nous avons délivré 1 J/cm² en 6 secondes, mais en faisant varier l'intensité des "pulses", leur nombre (de 10 à 99) et le délai les séparant (de 10 à 480 ms). La

production de ROS mesurée a été de 3,28 à 3,43 UA, soit légèrement inférieure à celle mesurée avec une irradiation continue. Nous avons également essayé d'exploiter le pic d'absorption à 703 nm dont nous pensions qu'il pouvait être du à la formation de purpurine 18, dont la photoréactivité est connue¹⁶⁴, par oxydation de la chlorine e6. Effectuer une irradiation de 10 J/cm² à 703 nm après une irradiation à 664 nm n'améliore pas significativement la production de ROS.

d) Indirubines

Les résultats des tests de photoréactivité (luminol) pour les indirubines sont présentés dans le Tableau 7 (p 97). Les indirubines dont la fluorescence croît (n=12) après l'addition de FCS ont montré une production de ROS significativement plus importante (71,3 U.A.) que celle des produits non fluorescents (16 UA, test de Mann Whitney : p= 0,011).

e) Extraits de microalgues

Pouvoir tester rapidement la photoréactivité des différents extraits in vitro, ainsi que celle des différents pics d'absorption de ces extraits s'est avéré particulièrement utile dans le cadre du projet Photomer. Comme nous l'avons indiqué, ne connaissant pas les différents constituants des extraits, ni leurs concentrations relatives, nous avons effectué des dilutions pour que l'absorbance de la solution au pic testé soit toujours de 0,2 ce qui signifie que l'intensité lumineuse absorbée par les différents extraits a toujours été la même. Certains extraits ou pics n'ont montré aucune photoréactivité, et ont été écartés. Inversement, certains extraits ont donné d'excellents résultats, allant jusqu'à saturer notre système de détection (cf. *Tableau 9*, p 100, valeurs ">"). Ces résultats sont excellents, supérieurs aux meilleurs photosensibilisants connus, et cela est d'autant plus remarquable, que nous avons testé des mélanges, et qu'il est peu probable que l'absorbance au pic testé ne soit due qu'à des composés photoréactifs. Nous espérons donc identifier dans ces extraits des produits extrêmement photoréactifs. Nous avons également comparé les résultats obtenus à ceux de composés extraits d'algues et déjà décrits comme étant photoréactifs, comme la chlorine e6 (cf. *ci-dessus*), ou le phéophorbide a (6,81 UA après irradiation à 674 nm) testé dans les mêmes conditions : si, lorsque les pics d'absorption sont communs, ces produits étaient responsables de la photoréactivité observée, alors le résultat ne pourrait être au mieux qu'équivalent. Ce n'est pas le cas, et nous pouvons donc espérer à ce stade isoler des composés nettement plus réactifs.

Résultats

Nom	Solvant	Absorbance			Nouveau pic (nm)	Stabilité avec FCS après 24h		Fluorescence (avec FCS) λ en nm (intensité)
		Sans FCS	Avec FCS			Décalage (nm)	Variation d'intensité (%)	
		λ en nm	Décalage (nm)	Variation d'intensité (%)				
Bae 7883	Eau	628		-20%		-7nm	-10%	
Bae 7876	Eau	638	+2nm	-20%		+2nm		683 (+)
Bae 8506	Eau	647	+2nm	-20%		+54nm	-4%	710 (+)
Bae 8507	Eau	688	+5nm	-40%		+5nm	-15%	700 (+ + + +)
Bae 7877	Eau	661		-32%			-6%	
PF 55/I	Eau	534	+20nm	-10%				561 (+ + + +)
BAE 5838/2	Eau	498	+4nm					550 (+ + + +)
		533						
BAE 7451	DMSO	396	+12nm					531 (+ +)
JA 7407	DMSO	535	+7nm (1er pic)	-38% (1er pic)				613 (+ + + +)
		585	+13nm (2nd pic)	-12%(2nd pic)				
1BS/PE2470	DMSO	388	+5nm					445 (+ +)
3BS/PE2543	Eau	408		-20%	464			500 (+ + + +)
		428						
1GS/PE2562	DMSO	494	+6nm					524 (+ +)
3GS/PE2240	Eau	473	+2nm (1er pic)			+5nm (1er pic)	-18% (1er pic)	521 (+ + +)
		501	+9nm (2nd pic)				+29% (2nd pic)	
3RS/PE3077	DMSO	520	+13nm	-10%			-10%	584 (+ + +)
		560						
2RS/PE2449	Butanol	625	+6nm					658 (+ + +)
BAE 5102	Ethanol	506	+2nm (1er pic)	-20% (1st pic)				582 (+ +)
		539	+4nm (2nd pic)	-15% (2nd pic)				
BAE 8524	Ethanol	460	-10nm	+41%		+2nm		537 (+ +)
BAE 8510	Ethanol	506	+5nm (1er pic)	-20% (1st pic)				571 (+ +)
		533	+8nm (2nd pic)	-24% (2nd pic)				
BAE 8543	Ethanol	537	-6nm	-25%		-2nm		589 (+ + + +)
BAE 8557	Eau	621						704 (+ +)
		690	+4nm (2nd pic)	-75% (2nd pic)		+3nm (2nd pic)		
BAE 8551	Eau	640	+3nm (1er pic)	-20% (1er pic)				698 (+ + +)
		671	+12nm (2nd pic)	+32% (2nd pic)		+1nm (2nd pic)		
X-Blue-5	Ethanol	543		-100% (1er pic)		+3nm (2nd pic)	-32% (2nd pic)	627 (+ + +)
		589	+5nm (2nd pic)	-38% (2nd pic)				
KF 711	DMSO	406	+5nm (1er pic)			-1nm (1er pic)	-12% (1er pic)	479 (+ + + +)
		426		+1nm (2nd pic)		+3nm (2nd pic)	-5% (2nd pic)	
1RS/PE2439	Ethanol	515	+7nm (1er pic)	+50% (1er pic)	563 (+5nm)			588 (+ + + +)
		622		-100% (2nd pic)				
BAE 8570	Ethanol	639	+4nm (1er pic)	-20% (1er pic)		+1nm (1er pic)	-11% (1er pic)	699 (+ + + +)
		674	+10nm (2ndpic)	+29% (2nd pic)		+1nm (2nd pic)	-2% (2nd pic)	
IM35 (PE2476)	DMSO	513	+14nm nouveau max 589nm	+250% (plus de pic UV)		-48% à 526nm	-23% à 589nm	540 596 (+ + + +)
MO8-1	DMSO	427	+3nm	-5%		+1nm	-0,11	478 (+ + + +)
M07-3-b	DMSO	519	+6nm					592(+ + +)
		562		-38% (2nd pic)		-0,1		
M023-3-b	DMSO	427	-2nm	-19%				483(+ + +)
BAE 9011	Eau	641 plateau 675	+5nm (1er pic) +8nm (plateau > pic)	-24% (1er pic)		-1nm (1er pic) -1nm (2nd pic)	-10% (1er pic) -11% (2nd pic)	700(+ +)

Résultats

BAE 8579	Eau	641 Plateau 680	+6nm (1er pic) +6nm (2nd pic)	-14% (1er pic) +11% (2nd pic)		+6nm (1er pic) +5nm (2nd pic)	-12% (1er pic) +12% (2nd pic)	701 (+)
BAE 9010	Eau	642 plateau 670	+4nm	-22%	676		-12%	697 (+)
BAE 9012	Eau	640 Plateau 670	+3nm	-25%	683		-11% (1er pic) +7% (2nd pic)	699 (+++)
MOD 216	DMSO	588 656	-19nm (1er pic) +19nm (2nd pic)	-62% (1er pic) -65% (2nd pic)	plateau 755	-3nm (1er pic) +19nm (2nd pic)	+15% (Plateau 755)	583 695 (++++)
MOD 222	DMSO	588 656	+13nm (1er pic) +17nm (2nd pic)	-58% (1er pic) -54% (2nd pic)	plateau 755	+3nm (1er pic)	+1% (1er pic) -2%(2nd pic) +28% (plateau)	688 695 (+++)
BAE 9041	Eau	627 680	-4nm (1er pic) +4nm (2nd pic)	-2% (1er pic) -11% (2nd pic)		-4nm (1er pic) +4nm (2nd pic)	-2% (1er pic) +5% (2nd pic)	700 (+++)
BAE 9042	Eau	635		-8% (1er pic)	680 (+2nm, +10%)	-1 nm	-2%	695 (++)
BAE 9043	Eau	641 673	+2nm (1er pic) +9nm (2nd pic)	-14 % (1er pic) +11% (2nd pic)		+2 nm (1er pic) +1nm (2nd pic)	-3% (1er pic) +9% (2nd pic)	700 (++)
BAE 9044	Eau	635	+7nm	+4 % (1er pic)	679 (-1%)	-2 nm	-7 %	700 (++)
BAE 9047	Eau	635		-8%		-2 nm	-1%	708 (+)
BAE 9048	Eau	640 665	+8nm (1er pic) -4nm (2nd pic)	+4 % (1er pic) +4% (2nd pic)		-5 nm (1er pic) -2nm (2nd pic)	-8 % (1er pic) -2% (2nd pic)	697 (++)
BAE 9049	Eau	683 707	+4nm (1er pic)	-30 % (1er pic)		-2 nm	+9 %	710 (++)
BAE 5180	Eau	681	+2nm	-5%				
BAE 9175	Eau	638	-7nm	-38%				
BAE 9177	Eau	641	+3 nm	-25%				
BAE 9514	Eau	637 670	+4nm (1er pic) +5nm (2nd pic)	-7% (1e pic) -6% (2nd pic)				
MOD 302-2	Eau	517						
MOD 395-2	Eau	590						
MOD 332-2	Eau	524 569		-6% (1er pic) -11% (2nd pic)			+4% (1er pic) +1% (2nd pic)	
MOD 396-2	Eau	521 565	+1nm (1er pic) +1nm (2nd pic)	-26% (1er pic) -21% (2nd pic)			+2% (1er pic) +2% (2nd pic)	
MOD 258	Eau	593 641 plateau 688	+26nm (2nd pic)	-100% (1er pic) +13% (2nd pic)			+4%	
MOD 256-2	Eau	587 656						
MOD 331-2	Méthanol	513 550	+2nm (1er pic) +7nm (2nd pic)	-12% (1er pic) +38% (2nd pic)	625	+1nm (1er pic) +1nm (2nd pic)	-24% (1er pic) -15% (2nd pic)	
MOD 244	DMSO	565	+1nm	-2%			+10%	
MOD 348-2	Méthanol	489 570 623	+1nm (1er pic) +5nm (2nd pic) +1nm (3ème pic)	+27% (1er pic) +127% (2nd pic) +13% (3ème pic)		-2nm (2nd pic)	-69% (1er pic) +66% (2nd pic) -92% (3ème pic)	
MOD 247	DMSO	565 plateau 675						
MOD 319	DMSO	518 558		-100% (1er pic) +40% (2nd pic)			-8% (2nd pic)	
MOD 393-2	DMSO	537 566		-100% (1er pic) +4% (2nd pic)			+3% (2nd pic)	
BAE 9516	Eau	528 566		-100% (1er pic) -7% (2nd pic)			+3% (1er pic) +2% (2nd pic)	

Résultats

MOD 392-3	DMSO	570	+9nm (1er pic)	+17% (1er pic)			-27% (1er pic)	
		671	+7nm (2nd pic)	+30% (2nd pic)			-25% (2nd pic)	
BAE 9761	PEG/Ethanol/Eau	630	+9nm	+24%		+3 nm	+19%	694 (+)
BAE 9817	PEG/Ethanol/Eau	638	+2nm	+6%	677	+2nm	+20%	695nm (+)
BAE 9820	PEG/Ethanol/Eau	640	+2nm	-7%		+1nm	+7%	700 (+)
BAE 9762	PEG/Ethanol/Eau	636	+5nm	+27%	680	-1nm	+12%	695 (+)
BAE 9823	PEG/Ethanol/Eau	639	+3nm	-9%		+1nm	+14%	698 (+)
BAE 9826	PEG/Ethanol/Eau	639	+3nm (1er pic)	- 10% (1er pic)		+2nm (1er pic)	-2,5% (1er pic)	692 (++)
		677		+ 3% (2nd pic)			+7% (2nd pic)	
BAE 9830	PEG/Ethanol/Eau	638	+2nm (1 ^{er} pic)	-22% (1er pic)				695 (+)
		676	+2nm (2 nd pic)	-17% (2 nd pic)				
Ro 578	PEG/Ethanol/Eau	Plateau 570						
		580						
		638						
Bg 9784	PEG/Ethanol/Eau	Plateau 604						
		637						
Bg 9289	PEG/Ethanol/Eau	580		-27% (1 ^{er} pic)				
		638	+2nm (2 nd pic)	-4% (2 nd pic)				
Bg 9688	PEG/Ethanol/Eau	628						

Tableau 4 : Absorption, stabilité et fluorescence des cyanines et phthalocyanines, avec et sans sérum

Nom	Photoréactivité (test DCF)	Toxicité : DL50 en µg/mL	Phototoxicité : DL50 en µg/mL	Nom	Photoréactivité (test DCF)	Toxicité : DL50 en µg/mL	Phototoxicité : DL50 en µg/mL
Bae 7883	1,17	-	-	BAE 9043	4,1	-	-
Bae 7876	2,23	-	-	BAE 9044	7,5	-	9,5
Bae 8506	4	-	-	BAE 9047	2,7	-	-
Bae 8507	4,97	-	>10	BAE 9048	4,1	-	4
Bae 7877	1	-	-	BAE 9049	2,4	-	-
PF 55/I	0,88	-	-	BAE 5180	3,2	-	-
BAE 5838/2	1,33	-	-	BAE 9175	3,65	-	-
BAE 7451	1,05	5	-	BAE 9177	4,14	>10	4
JA 7407	1,7	3	0,8	BAE 9514	3,57	-	-
1BS/PE2470	1,03	6	-	MOD 302-2	2,39		
3BS/PE2543	4,91	-	-	MOD 395-2	0,29	ND	ND
1GS/PE2562	0,58	-	-	MOD 332-2	1,54		
3GS/PE2240	2,2	-	9,5	MOD 396-2	1,77		
3RS/PE3077	1,15	-	-	MOD 258	0,64	-	-
2RS/PE2449	1,08	>10	>10	MOD 256-2	0,24	4	-
BAE 5102	0,78	ND	ND	MOD 331-2	1,76		
BAE 8524	3,1	ND	ND	MOD 244	1,76	-	-
BAE 8510	0,66	ND	ND	MOD 348-2	0,19	-	-
BAE 8543	5,26	-	>10	MOD247			
BAE 8557	1,99	-	7	MOD 319	1,41		
BAE 8551	3,15	-	4	MOD 393-2	2,55	-	-
X-Blue-5	0,94	ND	ND	BAE 9516	1,24		
KF 711	2,66	3	0,7	MOD 392-3	0,18		
1RS/PE2439	1,27	>10	>10	BAE 9761	5,05	>10	>10
BAE 8570	2,75	-	-	BAE 9817	5,3	-	5
IM35 (PE2476)	0,94	ND	ND	BAE 9820	5,91	-	-
MO8-1	1,12	-	-	BAE 9762	3,11	>10	5
M07-3-b	2,16	8.5	2	BAE 9823	6,37	-	>10
M023-3-b	1,1	ND	ND	BAE 9826	6,12	-	2
BAE 9011	1,96	-	-	BAE 9830		-	1
BAE 8579	2,34	-	-	Ro 578		8	1
BAE 9010	2,57	-	-	Bg 9784		7	3
BAE 9012	3,33	-	-	Bg 9289		4	1
MOD 216	1,31	10	6	Bg 9688	1,2	6	1
MOD 222	1,5	-	2	BAE9042	3,1	-	-
BAE 9041	4,1	-	-				

Tableau 5 : Photoréactivité, toxicité et phototoxicité des cyanines et phthalocyanines (ND: non disponible)

Résultats

Nom	Masse molaire (g/mol)	Absorbance				Stabilité avec FCS après 24h		Fluorescence			
		Sans FCS		Avec FCS		Absorption (%)	Remarques	λ en nm	fluo en UA (λ d'excitation)	λFCS en nm	fluo avec FCS en UA (λ d'excitation)
λ en nm	Abs	λFCS en nm	Abs FCS								
MC131	489,35	514	0,81	538	0.53 (65.43%)	0.5 (94,61%)	+24nm Pic 580 nm	613	10 (514 nm)	644	336 (538 nm)
MC 125	452,90	525	0,12	522	0.12 (100%)	0.07 (56%)		675 (+630)	187 525 nm)	630 (+675)	187 (522 nm)
MC 132	505,35	522	0,33	522	0.34 (103.0%)	0.34 (98.81%)		679	281 (522 nm)	672	274 (522 nm)
MC 129	468,90	531	0,1	531	0.11 (110%)	0.09 (84.5%)		409	112 (531 nm)	624	84 (531 nm)
MLS 2049	499,83	512	0,48	518	0.41 (85.41%)	0.04 (100.91%)			0 (512 nm)	622	67 (518 nm)
MLS 2041	466,90	518	0,09	520	0.1 (111.11%)	0.10 (98.71%)	Pic 573 nm	618	109 (518 nm)	609	245 (520 nm)
MLS 2048	519,35	521	0,54	521	0.56 (103.70%)	0.53 (95,38%)	+6nm Pic 566nm		0 (521 nm)		0 (521 nm)
MLS 2044	482,90	519	0,31	519	0.36 (116.13%)	0.30 (83.66%)	Pic (max) 533 nm		0 (519 nm)		0 (519 nm)
MLS 2060	486,35	517	0,34	535	0.36 (105.88%)	0.34 (94,54%)	+5 nm		0 (517 nm)		0 (535 nm)
MLS 2061	500,35	485	0,15	481	0.17 (113.33%)	0.15 (89%)			0 (485 nm)		0 (481 nm)
MLS 2046	449,90	535	0,49	537	0.2 (40.81%)	0.19 94.75%)		646	465 (535 nm)		0 (537 nm)
MLS 2047	463,90	485	0,1	485	0.09 (90%)	0.07 (78,39%)		624	117 (485 nm)	625	136 (485 nm)
MLS 2064	539,80	510	0,6	525	0.43 (71.67%)	0.38 (89.3%)			0 (510 nm)	639	228 (525 nm)
MLS 2063	466,90	513	0,46	518	0.39 (84.78%)	0.36 (92.78%)		635	40 (513 nm)	630	179 (518 nm)
MLS 2050	463,35	513	0,67	526	0.57 (85.07%)	0.50 (87,88%)	+8nm	606	177 (513 nm)	611	374 (526 nm)
MLS 2052	477,35	513	0,32	517	0.3 (93.75%)	0.27 (89,60%)		618	77 (513 nm)	605	214 (517 nm)
MLS 2039	426,90	535	0,55	535 Pic 582	0.52 (94.54%)	0.05 (101.18%)		643	455 (535 nm)	639	453 (535 nm)
MLS 2040	440,90	524	0,07	524 Pic 578	0.09 (128.57%)	0.07 (83.85%)		631	225 (524 nm)	627	192 (524 nm)
MC 117	453,33	521	0,096	525	0.13 (135.42%)	0.17 (90,00%)			0 (521 nm)	592 639	140 (525 nm) 128 (571 nm)
MC 118	489,78	516	0,075	522	0.085 (113.33%)	0.06 (70%)			0 (516 nm)	595	185 (522 nm)
MC 135	556,45	481	0,063	488	0.061 (96.82%)	0.05 (87%)			0 (481 nm)		0 (488 nm)
MC 136	629,38	513	0,092	490	0.049 (53.26%)	0.04 (90%)			0 (513 nm)		0 (490 nm)
bis indigotin	490,51	560	0,051	580	0.059 (115.69%)	0.04 (65%)			0 (560 nm)		0 (580 nm)
5 BIO	355,90	511	0,129	514	0.069 (53.49%)	0.06 (88%)			0 (511 nm)		0 (514 nm)
6 BIO	355,90	509	0,254	496 Pic 694	0.3733 (146.97%)	0.36 (95.39%)			0 (509 nm)		0 (496 nm)
7 BIO	355,90	508	0,237	505	0.032 (13.50%)	0.003 (109%)			0 (508 nm)	579	288 (505 nm)

Résultats

indirubine 3' oxime	277,00	504	0,156	506	0.215 (137.82%)	0.21 (98,22%)			0 (504 nm)	580	107 (506 nm)
AB 187	280,00	501	0,253	503	0.108 (42.69%)	0.01 (100,81%)	+23nm		0 (501 nm)		0 (503 nm)
AB 194	506,00	502	0,248	524	0.063 (25.40%)	0.06 (95,93%)			0 (502 nm)		0 (524 nm)

Tableau 6 : Absorption, stabilité et fluorescence des indirubines, avec et sans sérum

Nom	Fluorescence (UA)		Photoréactivité (test au luminol)	Cellules F98 (DL 50, µg/mL)	
	-FCS	+ FCS		Toxicité	Phototoxicité (20J/cm²)
MC 131	10	336	219	4	2
MLS 2049	0	67	137	>5	4.5
MLS 2041	109	245	86	>5	>5
MLS 2047	117	136	23	>5	>5
MLS 2064	0	228	27	0.6	0.6
MLS 2063	40	179	107	1.5	1.5
MLS 2050	177	374	96	4	2.5
MLS 2052	77	214	50	2	1.5
MC 117	0	128	65	>5	3.5
MC 118	0	185	46	5	5
indirubine 3' oxime	0	107	0	>5	>5
7 BIO	0	288	0	>5	3
Production de ROS moyenne			71,3		
Nom	-FCS	+ FCS	Photoréactivité	Toxicité	Phototoxicité (20J/cm²)
MC 125	187	187	39	>5	>5
MC 132	281	274	0	>5	>5
MC 129	112	84	0	>5	>5
MLS 2046	465	0	70	>5	>5
MLS 2039	455	453	0	>5	>5
MLS 2040	225	192	17	>5	4
Production de ROS moyenne			21,0		
Nom	Composés non fluorescents		Photoréactivité	Toxicité	Phototoxicité (20J/cm²)
MLS 2044			8	2	2
MLS 2060			12	>5	>5
MLS 2061			19	>5	>5
MC 135			0	>5	>5
MC 136			0	>5	>5
AB 187			0	>5	>5
AB 194			5	>5	>5
5 BIO			0	>5	>5
6 BIO			0	>5	>5
MLS 2048			116	>5	>5
bis indigotin			7	>5	>5
Production de ROS moyenne			16,0		
Nom	-FCS*	+ FCS*	Photoréactivité	Toxicité	Phototoxicité (20J/cm²)
HPD	2080	2458	969	>10	7

Tableau 7 : fluorescence, production de ROS, Toxicité et Phototoxicité des indirubines. (* Intensité de fluorescence calculée pour une sensibilité de détecteur identique à celle utilisée pour les indirubines, 800V)

Nom	CDK5 / p25	GSK-3	Cellules SH-SY5Y
MC 131	>10	3	2
MLS 2049	>10	>10	4
MLS 2041	>10	>10	4
MLS 2047	>10	>10	Inactif (10)
MLS 2064	>10	>10	6
MLS 2063	>10	5	6,2
MLS 2050	>10	>10	1
MLS 2052	>10	>10	9
MC 117	0,15	0,026	5,5
MC 118	0,18	0,054	2,35
indirubine 3' oxime	0,1	0,022	12
7 BIO	33	32	7,1
MC 125	>10	7	2,3
MC 132	>10	>100	Inactif (10)
MC 129	>10	0,57	Inactif (10)
MLS 2046	>10	9	Inactif (10)
MLS 2039	>10	8	2
MLS 2040	>10	>10	5,5
MLS 2044	>10	>10	Inactif (10)
MLS 2060	>10	11	Inactif (10)
MLS 2061	>10	>10	Inactif (10)
MC 135	0,3	0,014	>100
MC 136	0,43	0,033	>100
AB 187	0,041	0,05	9
AB 194	0,071	0,069	12,5
5 BIO	0,028	0,016	12
6 BIO	0,083	0,005	9,5
MLS 2048	>10	>10	Inactif (10)
bis indigotine	>100	>100	>100

Tableau 8 : Effet inhibiteur de kinase et toxicité vis-à-vis des cellules SH-SY5Y des indirubines (CI50 en μM ; en cas d'absence d'effet, la plus forte concentration est notée entre parenthèses)

Résultats

Code extrait	Absorption		Photo-réactivité (test DCF)
	λ (nm)	λ FCS	
Xanthophylle	380 (514)	381	0
Phycocyanine	615	613	0
Phycocerythrine	502 540	PPT	ND
Zeaxanthine	390 514	391	0
Indigo	666	666	0
Spir comp MethOH	403 491 671	419 491 671	5,23 4,19
Spir comp EthOH	403 493 671	402 495 671	0,53 1,82
Spiruline	418 661	414 667	1,31
Serratia marescens	540	540	0,45
Isogal floc MethOH	413 652	PPT	ND
Isogal floc EthOH	412 670	411 671	0,18
Isogal floc	PPT	-	-
Pocru norm MethOH	564	564	2,32
Pocru norm			1,34
Pocru norm EthOH	PPT		ND
Pocru norm 5/25 mL	424 489 665	416	5,96
Pocru norm 10/10 mL	517 671	493 590 671	>9,57 >8,91 >8,62
Pocru norm 5/25 mL	425 488 667	413 567 667	0,64 3,98
Pocru norm 10/10 mL	564	542 562	0,1
Pocru norm 5/25 mL	562	541	0,7
Pocru norm 5/25 mL	563	561	0,69
Porphyridium purpureum EthOH	402 509 582 671	403 509 582 671	1,89 4,02
	415 491 673	415 491 673	0,29
	416 479	413	
Pocru-norm-1/160207-EtOH-filtred-Ar - brut	668	566 612 669	>9,14
Pocru-norm-2/160207-EtOH-filtred-Ar - brut	431 476 666	413 667	>7,66
Pocru-norm-3/160207-eau-filtred-Ar - brut	371 411 545 561	406 544 561	0,28 0,51
Pc eau	417 545 619 675	412 543 620 675	2,74 4,92 5,84 >7,60
	429 479 668	411	1,46 4,95
	433 483 621 667	433 619 667	1,67 >6,75
	437 477 666	PPT	ND
Pn DMSO		409 546 562	0,76
Pn acétone	411 478 666	PPT	ND

Pn ethanol	414 501 545 562 671	407 501 542 562 670	3,95		
	Pn méthanol	407 501 543 563	0,55		
		Pn Dichlorométhane	412 667	ND	
			Pn Chloroforme	413 667	ND
Pn éther diéthylique	413 668			ND	
	Ske norm 5g/25mL MethOH	406 539 615 672		407 538 674	>8,72
		Ske norm 5g/25mL EthOH	410 538 619 675	406 540 676	>8,55
Ske norm 5g/25mL ACTN			428 670	414 670	>6,73
			Sc eau	401 506 682	406 682
Sc acétonitrile	410 495 664	412 535 570 603 665		ND	
	Sc ethanol	408 664		PPT	ND
		Sn acétone	404 538 617 672	407 540 613 672	>7,82
	Sn ethanol		383 404 683	406 541 617 674	1,67 >7,89
Sn méthanol			403 501 539 615 673	406 502 541 616 673	>7,80 >8,30
			Sn Dichlorométhane	407 505 538 608 666	410 506 539 608 667
	Sn chloroforme	407 504 538 607 666		410 503 539 608 667	ND
		Sn éther diéthylique		407 506 539 607 666	410 505 539 607 666
Sn ethanol 130407				404 538 616 672	407 501 540 613 670
			Sn éther diéthylique 130407	404 502 535 607 666	408 479 536 666
	Cylindra DMSO			424 449 494 600	445 586 640 669
		Cylindra EtOH		664 417 421 429	417 434 437 580
Cylindra EtOH CC 18-12-07				619 671	632 671
			420 671	415 672	

Résultats

GS1	415	415	6,19
	509	509	
	540	539	
	615	615	
	671	671	
GS2	410	411	
	508	509	
	535	533	
	618	619	
	673	675	
GS3	417	416	3,37
	620	621	
	669	669	
GS4	423	425	2,60
	616	616	
	670	670	
GS5	416	419	
	670	637	
		670	
TP EtOH	415	407	ND
	671	670	
TP DMSO	430	410	ND
	666	666	
TP MeOH	417	410	ND
	668	667	
TP Vert EtOH 18-12-07	370	370	1,39
	383		
	406	411	
	640	441	
TP Vert EtOH bis 18-12-07	370	370	ND
	383		
	409	411	
	638	456	
		640	
F2 TP EtOH 18-12-07	-	456	0,04
Solution EtOH 122	468	472	0,89
	613	613	1,28
	672	672	0,04
	419	445	
	460		5,27
	672	678	4,45
Solution Aqueuse 122	534	607	3,96
	666	667	
	521		
	552	553	
	665		1,79
Solution EthOH 123	426	422	1,47
	613	613	
	671	671	0,72
	415	422	
	458		6,22
	673	671	
Solution Aqueuse 123	414	414	1,70
	667	665	
		861	

Solution Aqueuse 123 (suite)	415	414	0
	552	485	
	667	552	
		668	
		758	
	837		
	879	877	
	415	415	ND
	488	486	
Nano EtOH 1	444	443	0,56
	620	481	
	670	615	
	670	670	2,40
Nano EtOH 2	449	448	0,53
	670	614	
		670	
	670	670	1,68
Nano EtOH 3	452	426	0,12
	668	450	
		480	
	668	668	0,61
Nano EtOH 4	449	424	0,65
	669	480	
		669	
	669	669	
Nano EtOH 5	450	424	0,82
		449	
		481	
	670	669	
	670	669	4,15
Nano EtOH 6	449	425	0,37
		448	
		481	
	670	670	2,10
Nano EtOH 8	427	427	5,02
		570	
		669	
	671	669	
	671	669	>8,68
DS EtOH	424	421	5,52
	443		
	478	476	
	576	578	
	666	666	
		666	
DS DMSO	414	413	4,12
		473	
		530	
	665	669	
DS MeOH	413	413	ND
	664	665	
DS EtOH 18-12-07	420	416	3,6
	444	442	
	474	474	
	668	667	
		667	
Hn ethanol	417	416	2,71
	465	464	
		499	
	613	613	
	672	672	
	672	672	2,37
	672	672	>8,3
Hn Ether	416	414	4,57
	463	464	
		495	
	613	613	
	671	671	

Tableau 9 : Pics d'absorption et photoréactivité des extraits de microalgues (ND : non disponible. PPT : formation d'un précipité.)

Nom	Toxicité (DL50 en DO)	Phototoxicité (DL50 en DO à la longueur d'onde d'irradiation)		
		1h	2h	4h
Pocru norm 5/25 mL	>0,06	> 0,06	0,0038	0,0591
Ske norm 5g/25mL (MethOH)	-	0,0033	0,0028	0,0024
Ske norm 5g/25mL (EthOH)	-	0,0058	0,023	0,0032
Sn acétone		0,0025	0,0013	0,0016
Sn ethanol	0,088	0,0087	0,0021	0,0022
Sn méthanol	-	0,0039	0,0036	0,0017
GS5		637nm : 0,006 670nm : 0,0034	637nm : 0,0047 670nm : 0,0033	637nm : 0,0037 670nm : 0,0031
Solution EtOH 123	-	0,0239	0,027	0,0019
Nano EtOH 5	>0,04	-	0,0303	
Nano EtOH 8	-	0,0081	0,0085	0,0045
Hn ethanol		0,01	0,0053	0,0051
<i>Phéophorbide A</i>	-	<i>0,0172</i>	0,0030	<i>0,0137</i>
<i>Chlorine e6</i>	-	<i>0,108</i>	<i>0,0672</i>	<i>0,02885</i>
<i>m-THPC</i>	-	<i>0,02</i>	<i>0,0039</i>	<i>0,0084</i>

Tableau 10 : Phototoxicité des extraits de microalgues

Concernant les cyanines et les phthalocyanines, plusieurs conditions opératoires ont pu être testées, en faisant varier la longueur d'onde d'irradiation, le solvant utilisé pour préparer la solution mère ou le temps d'incubation. Les valeurs numériques que nous présentons ici correspondent aux meilleurs résultats obtenus.

B. Pharmacocinétique et distribution intracellulaire

1. SIM01

Avant d'entreprendre des essais thérapeutiques chez le rat avec des cellules F98 greffées, il convenait de vérifier dans un premier temps que ce produit pouvait pénétrer dans ces cellules selon une cinétique comparable à celle observée avec d'autres lignées cellulaires, pour savoir si les paramètres thérapeutiques déterminés avec ces modèles⁶ étaient extrapolables au cas des tumeurs F98.

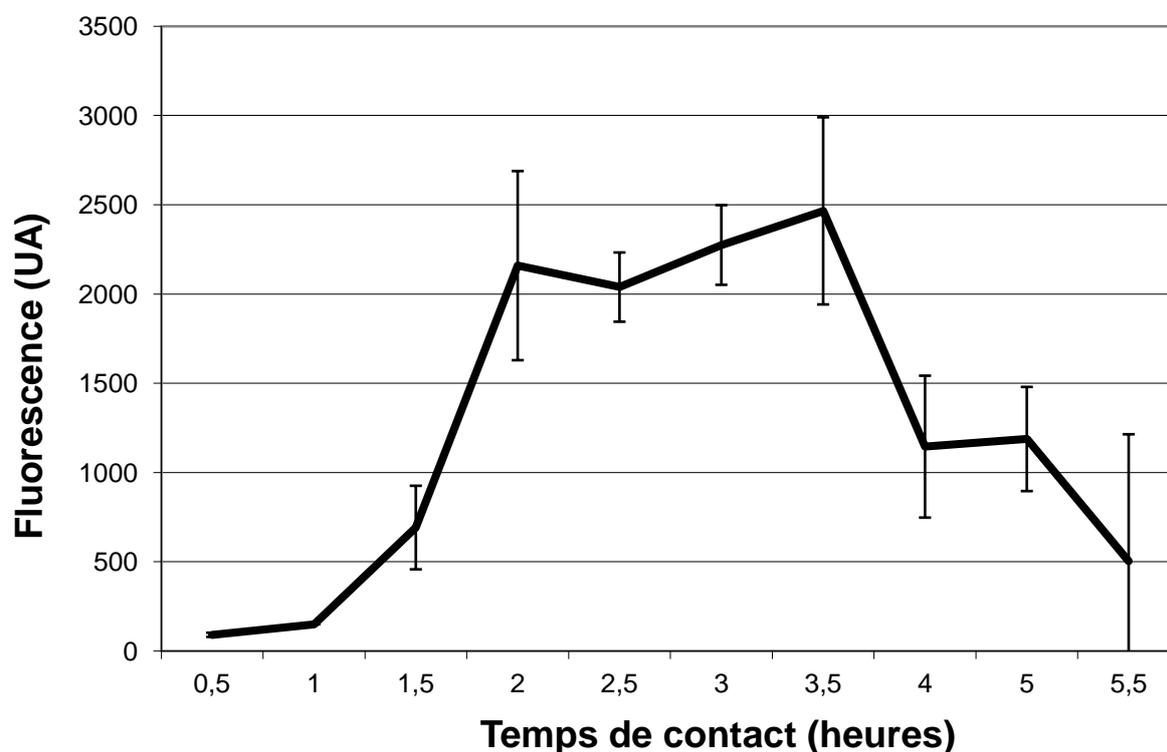


Figure 49 : Evolution de la fluorescence intra-cellulaire du SIM01 au sein de cellules F98

La *Figure 49* présente l'évolution de la fluorescence du SIM01 dans les cellules F98. L'incorporation est rapide puisque le niveau maximum est atteint entre 2 et 3,5 heures. Ces résultats, y compris la décroissance observée à partir de 4 heures d'incubation sont similaires à ceux obtenus précédemment dans le laboratoire avec une autre lignée gliale, C6¹⁵⁵. Comme le montre la *Figure 50*, aucun des clichés n'a montré une fluorescence nucléaire, confirmant que le SIM01 ne pénètre pas dans le noyau, ce que l'on peut mettre en relation avec sa très faible génotoxicité¹⁰².

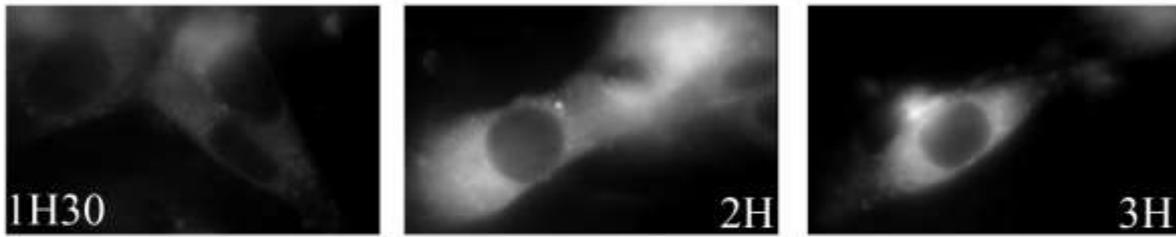


Figure 50 : Fluorescence intra-cellulaire du SIM01

2. Radachlorine

D'après ses inventeurs, la Radachlorine se démarque de la Chlorine e6 in vivo par une cinétique de résorption et d'élimination plus rapide. Nous avons voulu vérifier si ces différences étaient également observables sur cultures cellulaires. Dans ce cas, nous avons utilisé la lignée A549, car elle avait été choisie pour les expériences in vivo ultérieures.

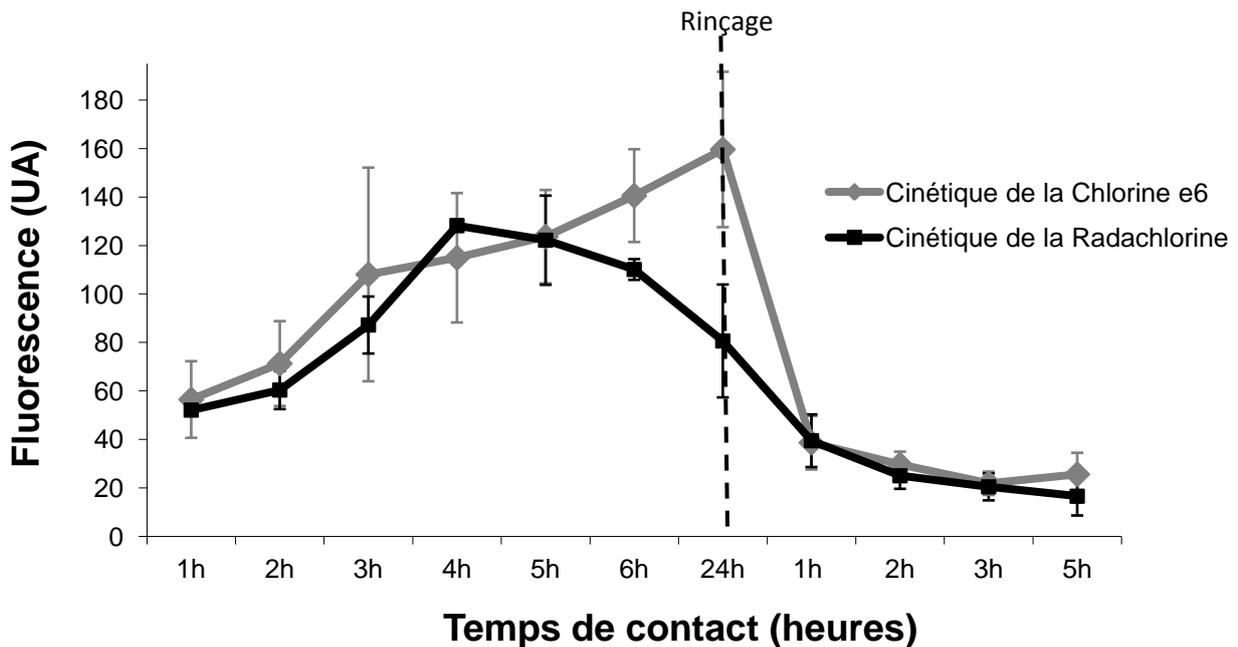


Figure 51 : Evolution de la fluorescence intracellulaire de la Radachlorine et de la chlorine e6

Pendant les 4 premières heures d'incubation, la fluorescence des 2 composés croît (cf. Figure 51). Ensuite, la fluorescence observée dans les cellules incubées avec de la Radachlorine décroît, alors que la fluorescence de la Chlorine e6 augmente toujours. Pour observer la vitesse d'élimination lorsque les cellules ne sont plus exposées aux photosensibilisants, nous



Figure 52 : Fluorescence intracellulaire de la Radachlorine

avons rincé le tapis cellulaire et changé le milieu de culture. La fluorescence décroît alors rapidement dans les 2 cas. La spectrofluorimétrie a permis de déterminer que la fluorescence de la Radachlorine et celle de la chlorine e6 étaient comparables, avec un pic à 666 nm. Les différences observées entre les 2 produits pourraient être dues à une liposolubilité supérieure des complexes chlorines/purpurines constituant la Radachlorine, d'autant plus que cette substance a une répartition cellulaire originale, restant toujours dans le cytoplasme, mais s'accumulant en périphérie du noyau (*Figure 52*).

3. Autres

Les caractéristiques de fluorescence des autres composés (indirubines et phthalocyanines) n'ont pas permis la réalisation de cinétiques intracellulaires. Toutefois, en effectuant plusieurs tests de phototoxicité et en faisant varier le délai entre ajout de photosensibilisant et irradiation nous avons pu déterminer le meilleur moment pour l'irradiation et connaître la meilleure DL50. Des études cinétiques utilisant la fluorescence seront réalisées pour les extraits de micro-algues, une fois que les composés photoréactifs auront été complètement purifiés, ce qui permettra de comparer leurs répartitions intracellulaires.

C. Phototoxicité et toxicité

1. SIM01

Nous avons testé l'efficacité de la photochimiothérapie avec SIM01 sur cellules F98 en culture, en vérifiant que la présence des anti-angiogènes, STI571 ou thalidomide que nous souhaitons tester *in vivo* ne modifiait pas cette activité. Nous n'avons observé aucune modification significative de la phototoxicité du SIM01 en présence de ces inhibiteurs (cf. *Figure 53* et *Figure 54*). La croissance cellulaire observée a été plus faible pour les cellules non irradiées, mais mis en contact de la plus forte dose de STI571 (7 $\mu\text{mol/L}$).

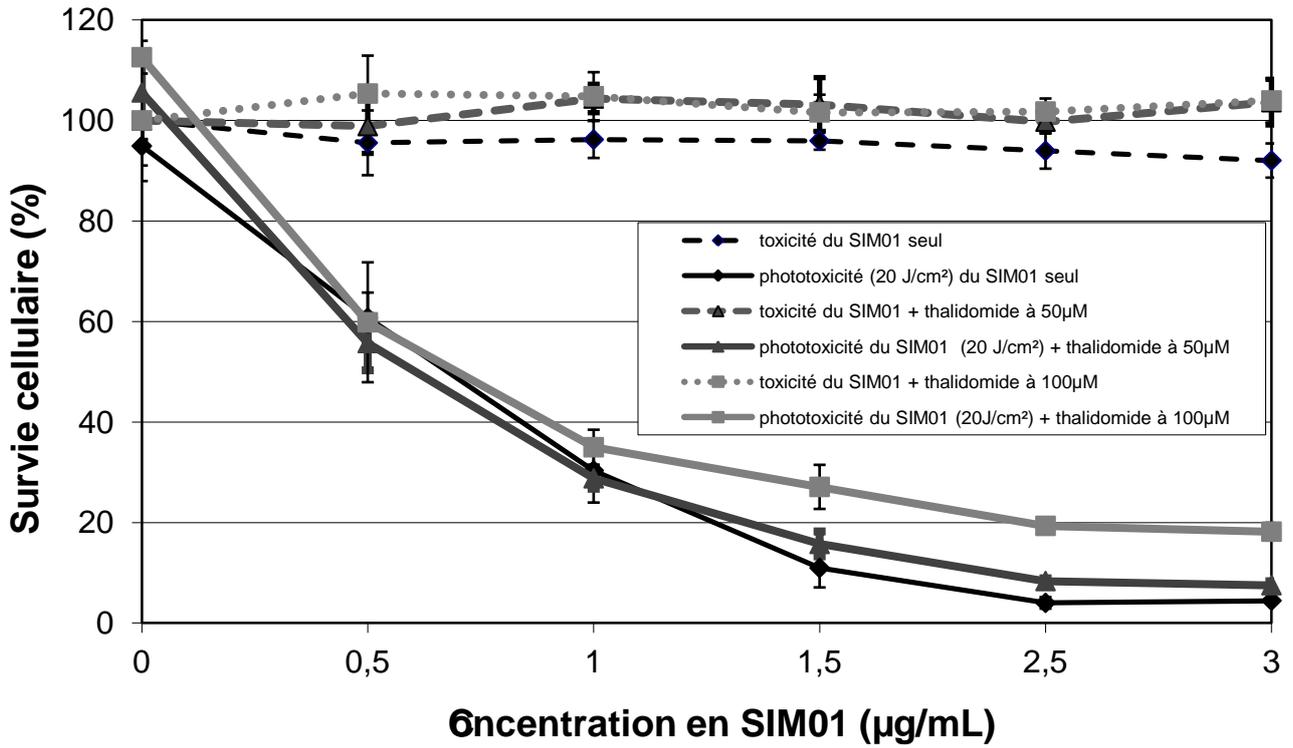


Figure 53 : Toxicité et phototoxicité du SIM01 en présence de Thalidomide

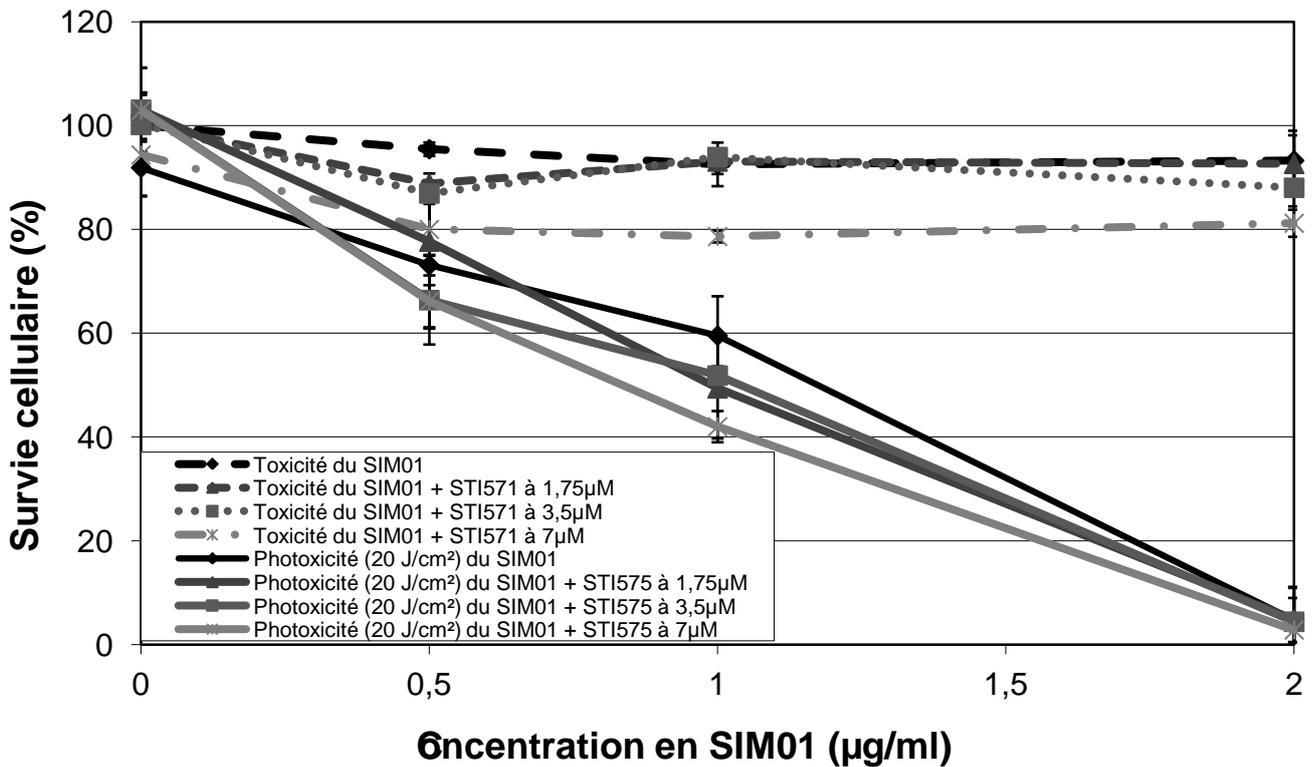


Figure 54 : Toxicité et phototoxicité du SIM01 en présence de STI571

2. Cyanines et phthalocyanines

Les résultats des tests de toxicité et de phototoxicité sont présentés dans le *Tableau 5* (p 100). Les DL50 sont exprimées en $\mu\text{g/mL}$. Le cas idéal est une absence de toxicité (-), associée à une phototoxicité forte ($\text{DL50} < 5 \mu\text{g/mL}$). Les composés n'ayant qu'une faible photoréactivité ($\leq 1 \text{ UA}$ au test DCF) n'ont pas été testés. Les composés BA7451, JA7407, KF711, MOD 256-2, Bg 9289 ont une toxicité forte en absence de lumière ($\text{DL50} \leq 5 \mu\text{g/mL}$) et ne présentent donc pas d'intérêt en PDT, même s'ils sont phototoxiques. Il est d'ailleurs difficile d'interpréter cette phototoxicité, qui peut être perturbée, s'ajouter ou être potentialisée par la toxicité. Le 1BS/PE2470, toxique sans être phototoxique est lui aussi sans intérêt pour la PDT. Les composés comme les BAE8507, 3BS/PE2543, BAE8543, BAE9043, BAE9044 qui ont de forts scores de production de ROS mais ne sont pas phototoxiques sont des composés qui ne pénètrent probablement pas les cellules, et ne peuvent donc pas avoir d'effet. Ceci est à mettre en relation avec leur très grande hydrophilie (indiquée par le Dr. D. Moigno et vérifiée expérimentalement). Nous remarquerons qu'aucun n'est toxique, pour les mêmes raisons. Les meilleurs composés sont les BAE 8551, BAE8557, BAE 9048, BAE 9817 et surtout le BAE 9830. Quatre d'entre eux ont donc été sélectionnés pour être étudiés chez l'animal.

3. Radachlorine

La Radachlorine n'a montré aucune toxicité en absence de lumière sur les 2 lignées cellulaires testées (cf. *Figure 55*) et ce quelque soit le temps d'incubation, et s'est révélée très phototoxique, avec des DL50 inférieures à $1 \mu\text{g/mL}$ pour les temps d'incubation supérieurs ou égaux à 2h. La lignée cellulaire A549 est sensible à une photochimiothérapie faisant intervenir la Radachlorine, et peut donc être utilisée pour les expériences in vivo.

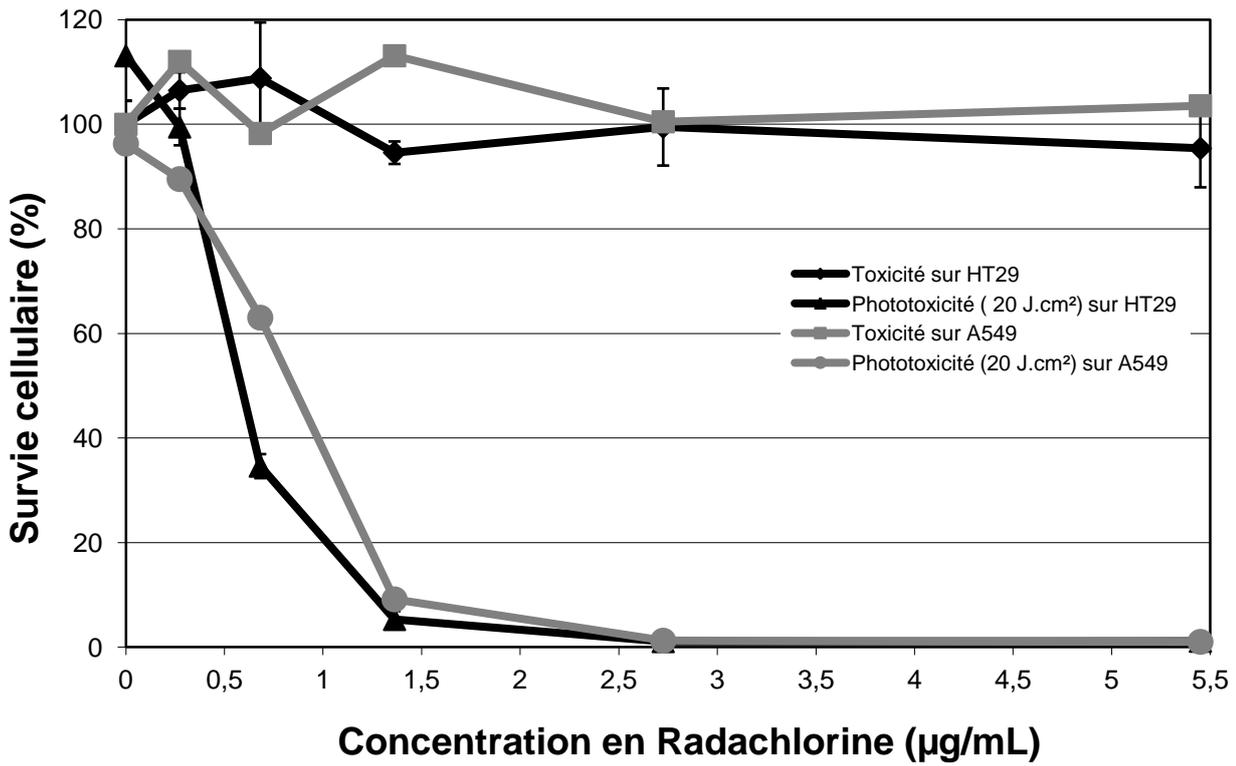
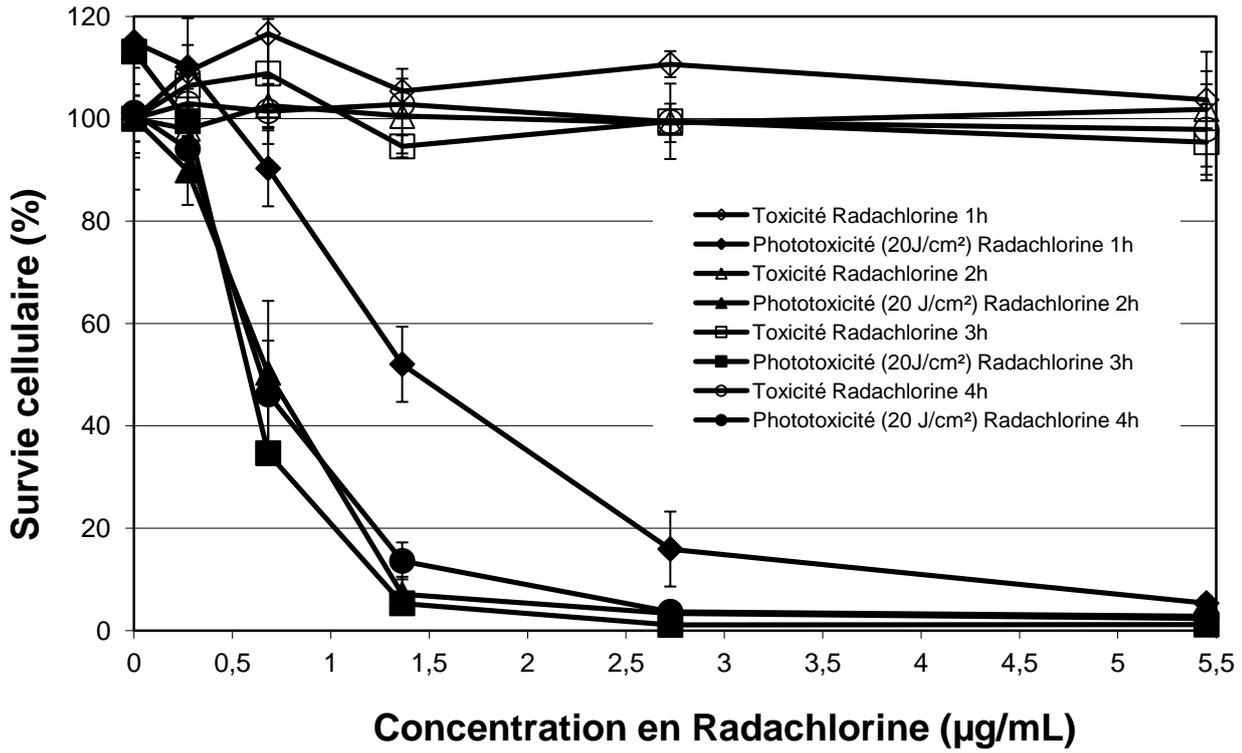
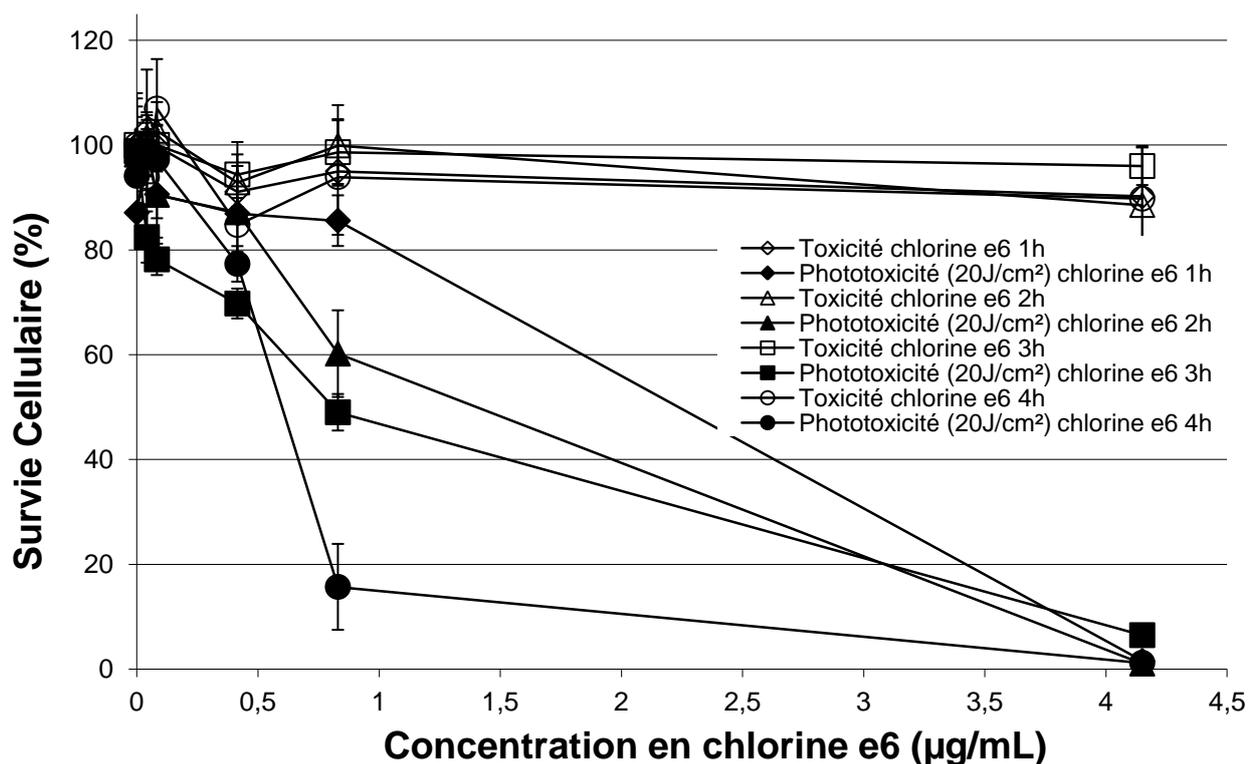


Figure 55 : Toxicité et phototoxicité de la Radachlorine



4. Indirubines

Les indirubines ont été testées sur des cellules cancéreuses gliales (F98) pour évaluer leur phototoxicité et leur toxicité. Contrairement au cas des photosensibilisants classiques, les indirubines peuvent exprimer une toxicité non négligeable en absence de lumière vis-à-vis de cellules cancéreuses qui sur-expriment certains récepteurs protéine-kinases potentiellement bloqués par ces indirubines. Nous verrons dans la discussion que cette toxicité n'est pas dans ce cas particulier rédhibitoire. Les doses testées sont assez faibles (0 – 5 µg/mL), l'objectif étant de mettre en évidence la phototoxicité de ces composés, ce qui est impossible si les doses employées induisent une trop forte toxicité. La dose létale 50 (DL50) en absence de lumière varie de 0,6 µg/mL à 5 µg/mL, les plus cytotoxiques étant le MLS2064 et le MLS2063 (Tableau 7, p 97). En ce qui concerne l'action anti-protéine kinase, nous présentons également pour information les résultats obtenus au Laboratoire Cycle Cellulaire de la station biologique CNRS de Roscoff (Tableau 8, p 98).

La phototoxicité est donc détectable si la toxicité n'est pas trop forte. Sur les 23 indirubines testées, ce sont naturellement celles qui produisent le plus de ROS qui se sont montrées les plus efficaces, à l'exception du 7BIO, dont la solubilité médiocre doit être prise en compte. Le MC131 a montré la meilleure phototoxicité, mais d'autres composés ont montré une DL50

significativement plus basse en absence de lumière (7 BIO, MLS2049, MLS2052, MLS2040, MC 117, cf. *Tableau 7*, p 97).

5. Extraits de microalgues

Nous n'avons testé sur culture cellulaires que 11 extraits parmi les meilleurs, avec différents temps d'incubation. En l'absence d'extraits purifiés, il est prématuré d'essayer de faire une étude complète de l'activité photochimique sur cultures cellulaires. Il était pourtant indispensable dans le déroulement du projet de confirmer l'activité des extraits identifiés *in vitro* sur cellules, pour vérifier leur photoréactivité et leur capacité à pénétrer dans les cellules. Nous ne commenterons pas la toxicité, car il est impossible à ce stade de savoir si elle est liée au(x) produit(s) photoréactifs. Les résultats (cf. *Tableau 10*, p 101) sont excellents, puisque ces produits non purifiés ont une phototoxicité supérieure (résultats en gras) à celle du meilleur photosensibilisant sur le marché et des photosensibilisants déjà décrits dans les algues, si l'on compare ces produits à intensité lumineuse absorbée identique.

D. In Vivo

1. Pharmacocinétique in vivo

La Radachlorine présente des caractéristiques de fluorescence permettant de suivre simplement l'évolution de sa fluorescence *in vivo*. Les données concernant le SIM01 ont déjà été obtenues précédemment^{6,155,157}. La trop grande proximité entre le pic d'absorption et le pic de fluorescence des phthalocyanines ne nous a pas permis d'effectuer le même suivi.

Ces expériences sont réalisées sur 2 types d'animaux, des souris blanches, sacrifiées après différents délais après l'injection et dont les organes sont prélevés pour réaliser les mesures de fluorescence, et des souris "nude", ayant subi une greffe tumorale, et pour lesquelles la fluorescence du photosensibilisant est mesurée à travers la peau. Ces données permettent de visualiser à quelle vitesse le photosensibilisant se distribue dans les différents organes. Les paramètres importants sont le temps au bout duquel le pic de concentration est atteint, et les rapports entre la fluorescence observée dans la tumeur et celle observée dans la peau ou le muscle. Ces derniers paramètres permettent de déterminer le moment auquel la sélectivité d'accumulation du photosensibilisant est optimale, et donc le moment le plus favorable pour le traitement.

L'évolution de la fluorescence de la Radachlorine dans différents organes est présentée dans la *Figure 56*. Aucun pic de fluorescence à 666 nm après excitation à 501,7 nm n'a été détecté

avant injection. Le maximum de fluorescence est atteint après seulement 1 heure, ce qui correspond à une distribution très rapide, dans tous les organes, excepté pour la vésicule biliaire et les fèces, ainsi que la tumeur. La fluorescence observée dans le cerveau est faible mais détectable (1252 UA \pm 282). La fluorescence dans la vésicule biliaire est au moins 3 fois supérieure à celle observée dans les autres organes, ce qui indique une rapide élimination hépatique. Après passage par le foie et la vésicule biliaire, une part importante du photosensibilisant injecté est excrétée avec la bile dans le tube digestif et se retrouve dans les fèces. La fluorescence y est maximale après 7 heures. Les niveaux de fluorescence observés dans les reins et la vessie (urines), indique que l'élimination est aussi partiellement rénale. 5 heures après l'injection, les niveaux de fluorescence sont très faibles (739 UA \pm 104 dans les poumons, 244 UA \pm 58 dans le muscle) sauf dans la peau (1416 UA \pm 540) et les organes d'élimination (18720 UA \pm 2284 dans la vésicule biliaire, 1631 UA \pm 291 dans la vessie).

Après 25 heures, la fluorescence est revenue au niveau basal et est à peine détectable. Ceci correspond à une élimination rapide, ce qui est très favorable pour un photosensibilisant, la photosensibilisation cutanée induite, principal effet indésirable, étant très limitée dans le temps.

La sélectivité observée des photosensibilisants n'est généralement pas tant une sélectivité d'accumulation, qu'une sélectivité de rétention, ce qui est le cas ici : le maximum de fluorescence est observé dans la tumeur après 2 heures, et la décroissance est ensuite plus lente que dans les autres organes. Nous observons donc les meilleurs rapports

_____ et _____ après 7 heures, respectivement 1,95 et 1,45. Lors des essais thérapeutiques, nous effectuerons donc les irradiations environ 7 heures après l'injection de Radachlorine, pour privilégier un effet sélectif vis-vis à du tissu tumoral.

Un exemple des spectres de fluorescence observés dans les différents organes est présenté dans la *Figure 58*. Nous n'avons pas observé de modification du spectre de fluorescence en fonction du temps, ce qui indique qu'il n'y a pas de biotransformation conduisant à la formation de métabolite fluorescent.

La *Figure 57* présente l'évolution de la fluorescence de la chlorine e6 après injection IV à des souris. Cette fluorescence est forte dans tous les organes une heure après l'injection, que ce soit au niveau de la peau (6927 UA \pm 569), du foie (7097 UA \pm 366) et des poumons (6195 UA \pm 935) ou de la tumeur (5049 UA \pm 1148). La chlorine e6 a également été détectée dans le cerveau (1252 UA \pm 282). Cette fluorescence décroît ensuite rapidement, sauf dans le cas de la

peau, pour la vésicule biliaire et les fèces. La fluorescence au niveau de la peau est supérieure à celle mesurée dans la tumeur à 1 et 3 heures après l'injection, et il n'y a pas de différence significative entre la fluorescence cutanée et la fluorescence tumorale 4 heures après l'injection. Les meilleurs rapports _____ et _____ ont été observés 8 heures après l'injection, avec des valeurs de 2,56 et 1,13 respectivement. Comme dans le cas de la Radachlorine, la fluorescence décroît ensuite rapidement dans tous les tissus, étant à peine détectable 24 heures après l'injection.

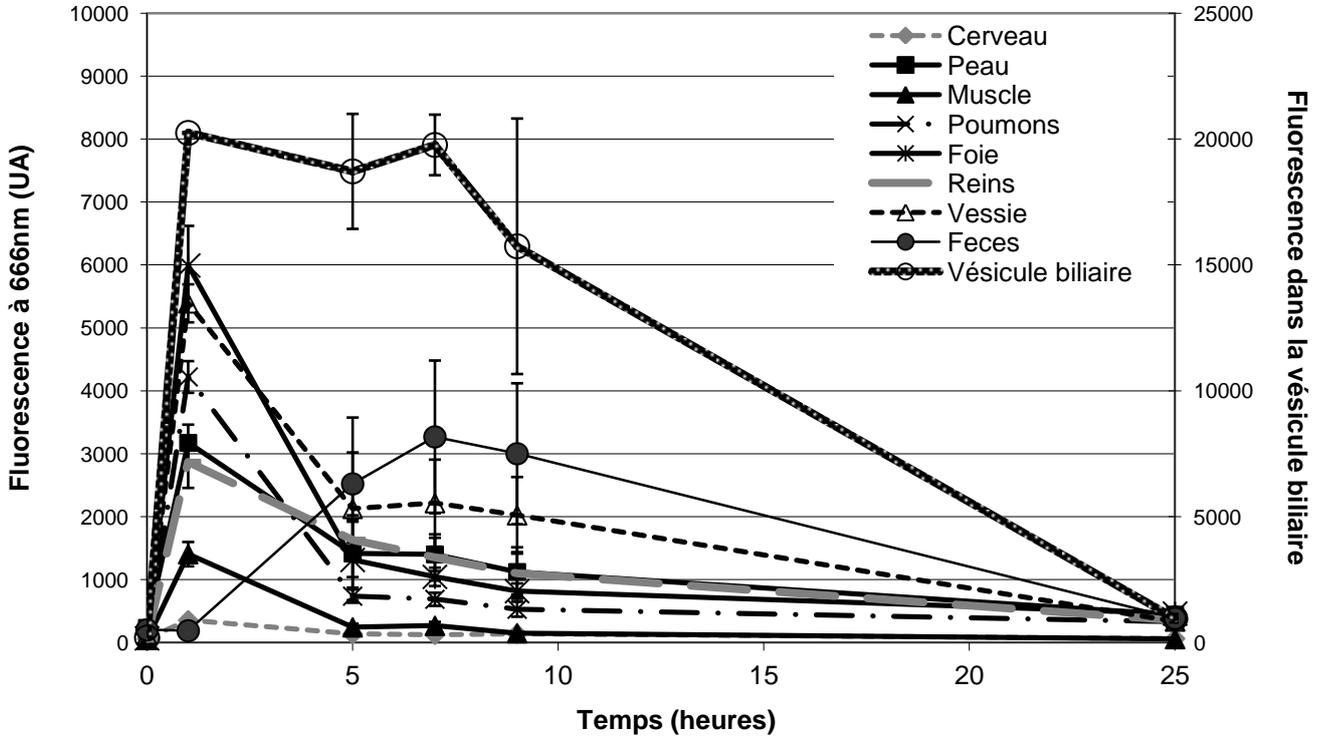
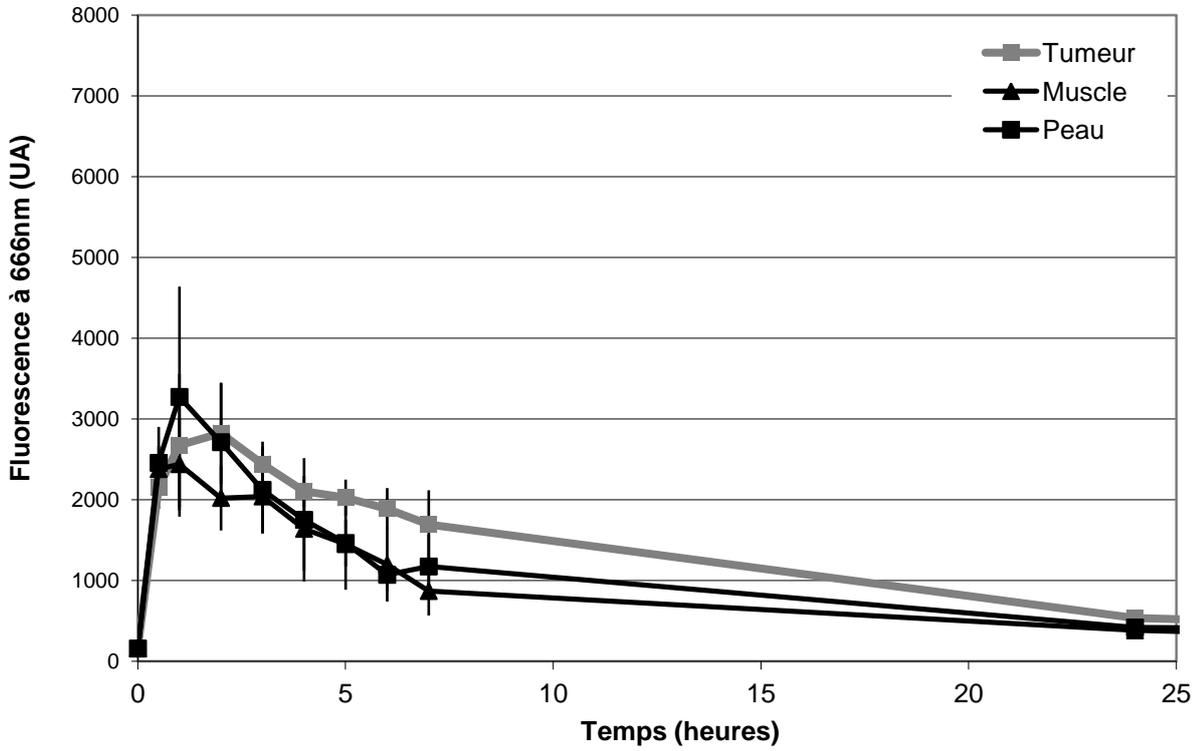


Figure 56 : Evolution de la fluorescence de la Radachlorine in vivo.

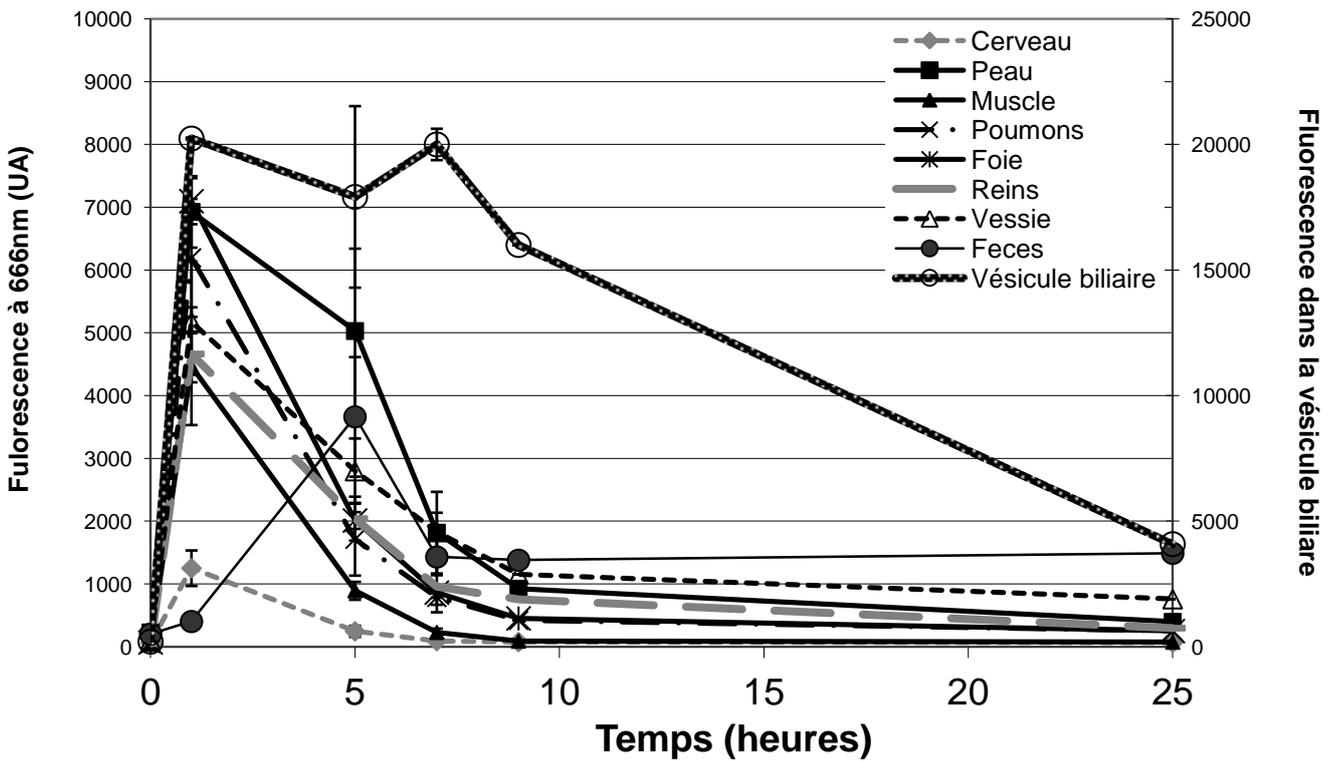
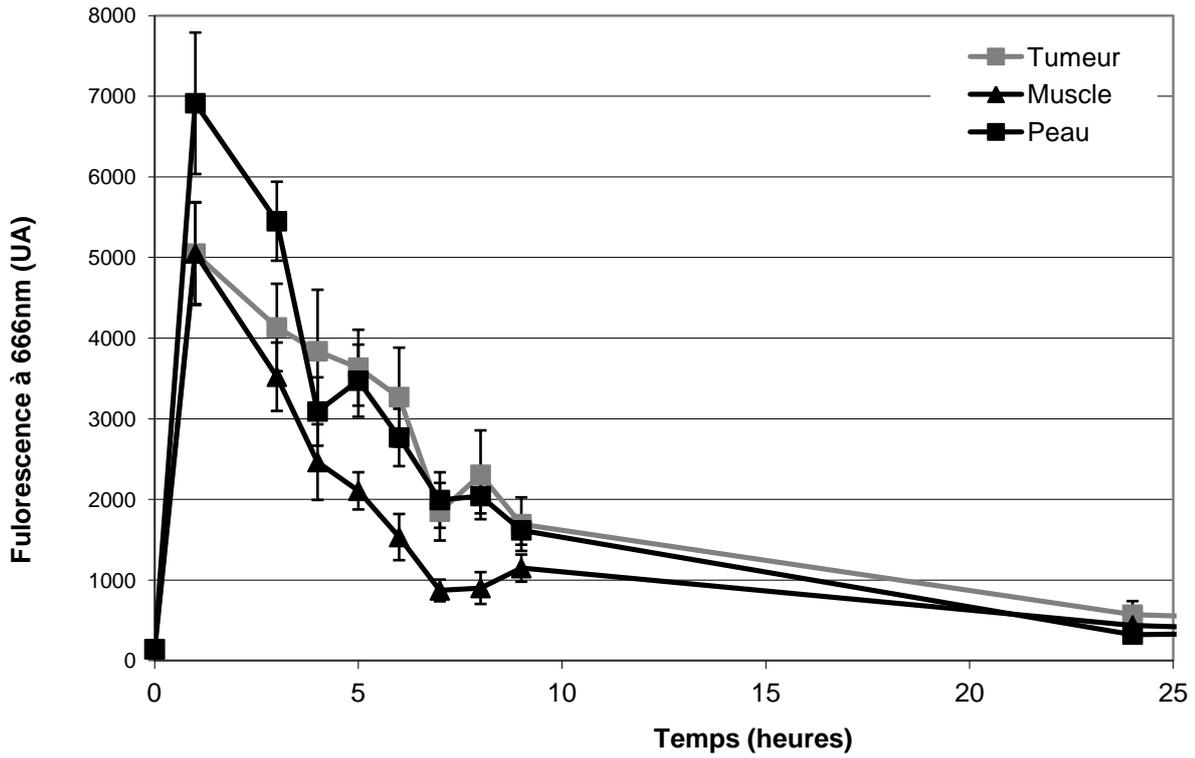


Figure 57 : Evolution de la fluorescence de la chlorine e6 in vivo.

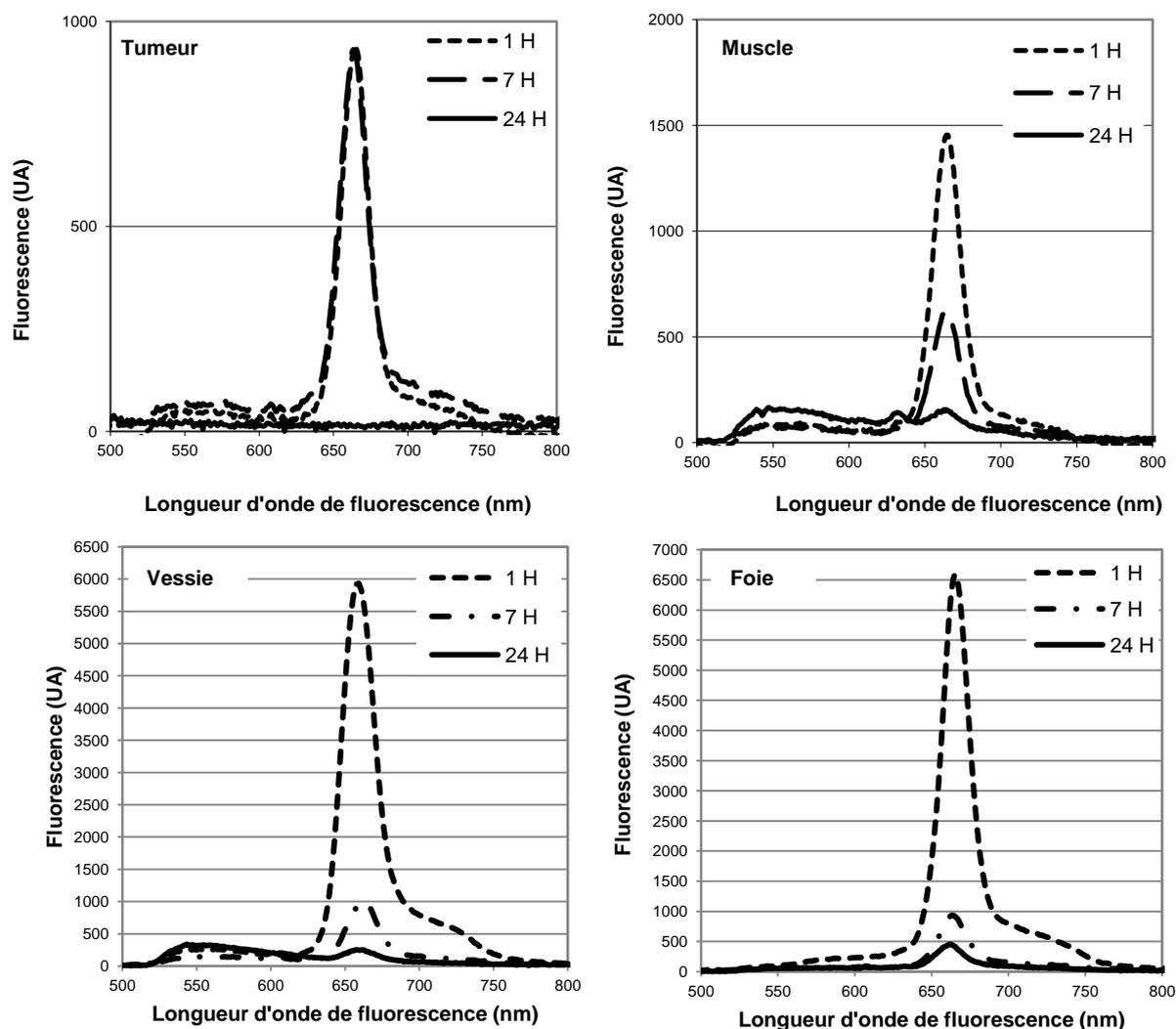


Figure 58 : Spectres de fluorescence de la Radachlorine dans différents organes.

2. Efficacité de la thérapie photodynamique sur souris "nude"

Comme nous l'avons indiqué, cette étape est indispensable au cours du développement d'un photosensibilisant, et permet de démontrer qu'il peut être résorbé, peut s'accumuler dans le tissu tumoral sans être immédiatement dégradé ou éliminé et sans induire d'effets toxiques généraux et qu'il peut permettre une destruction ciblée de la tumeur. La greffe sous-cutanée de tumeurs chez la souris "nude" est un modèle expérimental qui permet de sélectionner les meilleurs paramètres de traitement. On ne cherche pas à ce stade à reproduire chez l'animal un cancer ayant les mêmes caractéristiques et la même localisation que le cancer humain que l'on souhaite traiter. En revanche, il est souhaitable d'utiliser pour la greffe des cellules tumorales

issues de ce cancer, d'où l'utilisation de lignées différentes en fonction des indications envisagées.

Les photosensibilisants non irradiés ou des irradiations seules n'ont eu aucun effet sur la croissance tumorale (tests effectués sur 2 animaux). Nous pouvons parfois observer sur les courbes de croissance tumorale une légère augmentation de taille durant les premiers jours suivant l'irradiation ; cela est dû à l'inflammation générée par la réaction photochimique qui entraîne un œdème. En parallèle une décoloration de la zone, due à la nécrose sous-jacente, est observable. Par la suite, la zone traitée présente une coloration brune (cf. *Figure 59*). Cette coloration ne correspond pas à une brûlure due au laser (la puissance est choisie pour n'induire aucun échauffement du tissu), mais aux effets de la réaction photochimique. Si la concentration cutanée en photosensibilisant est encore importante au moment de l'irradiation, la nécrose cutanée peut être importante (cas du BAE 9048 sur la *Figure 59*).

a) Sur les tumeurs HT29

Les meilleures phthalocyanines ont été testées sur des tumeurs HT29. En l'absence de données sur la cinétique de distribution de ces composés, nous avons dans un premier temps irradié les tumeurs 24, 48 ou 72 heures après l'injection des photosensibilisants.

(1) BAE 8551 et BAE 8557

Ces 2 photosensibilisants sont les plus actifs de la première série qui nous a été adressée. Nous avons d'abord cherché à déterminer le meilleur délai entre injection et irradiation. Ensuite nous avons également testé à la demande du Dr. D. Moigno une autre longueur d'onde d'irradiation (640 nm) en plus des longueurs d'onde correspondant aux pics d'absorption (678 nm pour le BAE 8551 et 690 nm pour le BAE 8557). Nous n'avons observé, comme le prévoyaient les tests de toxicité aigue, aucun effet indésirable dû à l'administration des photosensibilisants.

La *Figure 61* et la *Figure 60* présentent l'évolution de la croissance tumorale en fonction de la dose injectée. Très logiquement, à irradiation constante (200 J/cm²) l'effet observé est d'autant plus intense que la dose de photosensibilisant est forte.

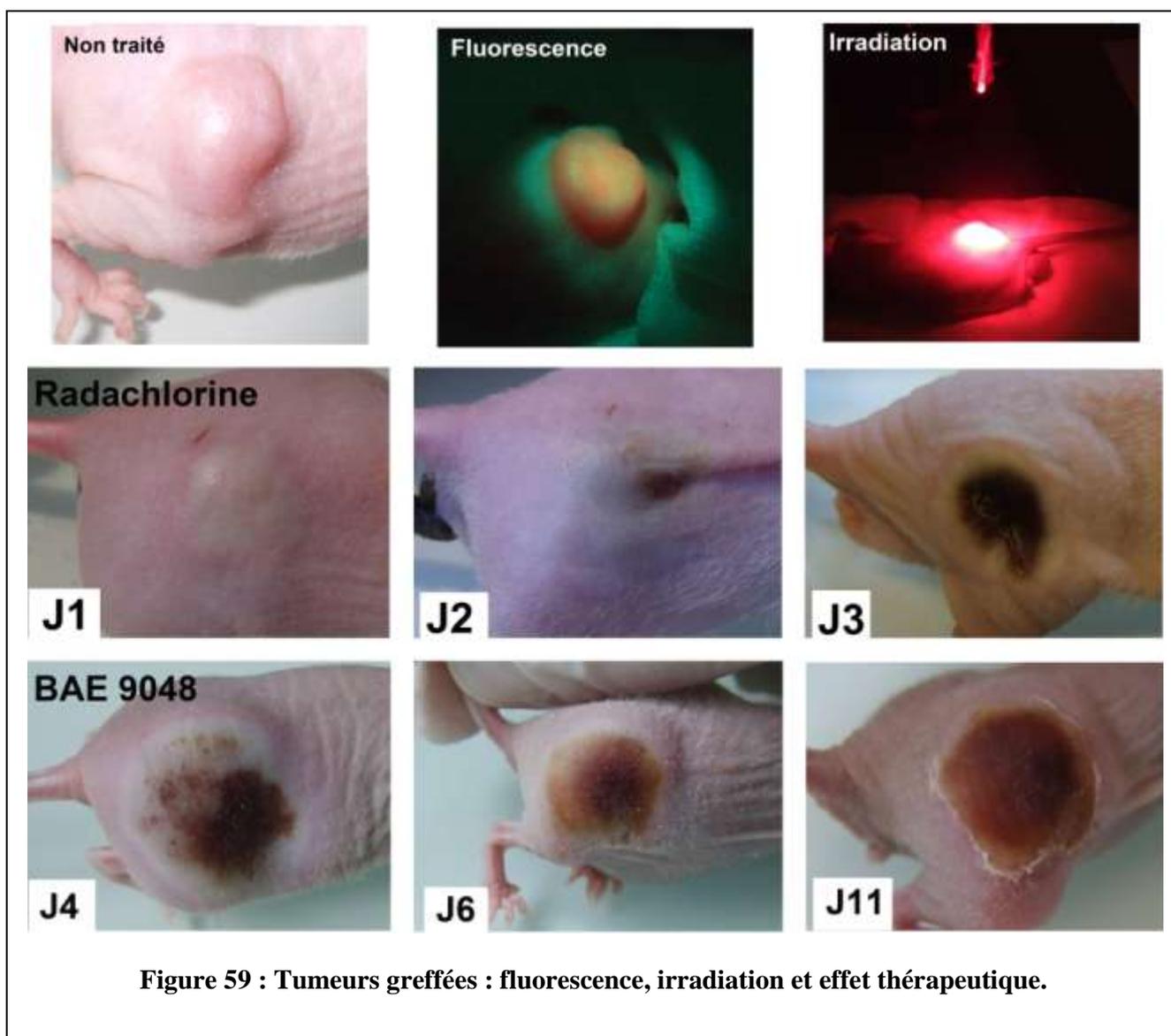


Figure 59 : Tumeurs greffées : fluorescence, irradiation et effet thérapeutique.

La plus forte dose (20 mg/kg) n'induit aucun effet adverse, et les doses plus faibles ne permettent d'obtenir qu'un effet thérapeutique limité. Les expérimentations ultérieures ont donc été effectuées avec une dose de photosensibilisant de 20 mg/kg.

La *Figure 62* présente l'évolution de la croissance tumorale en fonction du délai entre injection de BAE 8551 et irradiation. Faire varier ce délai peut faire varier l'efficacité thérapeutique (concentration absolue en sensibilisant dans la tumeur), ainsi que la sélectivité du traitement (rapport de concentration entre tumeur et tissu sain). Dans le cas du BAE 8551, les meilleurs résultats sont obtenus avec les délais les plus importants (48 et 72 heures).

Résultats

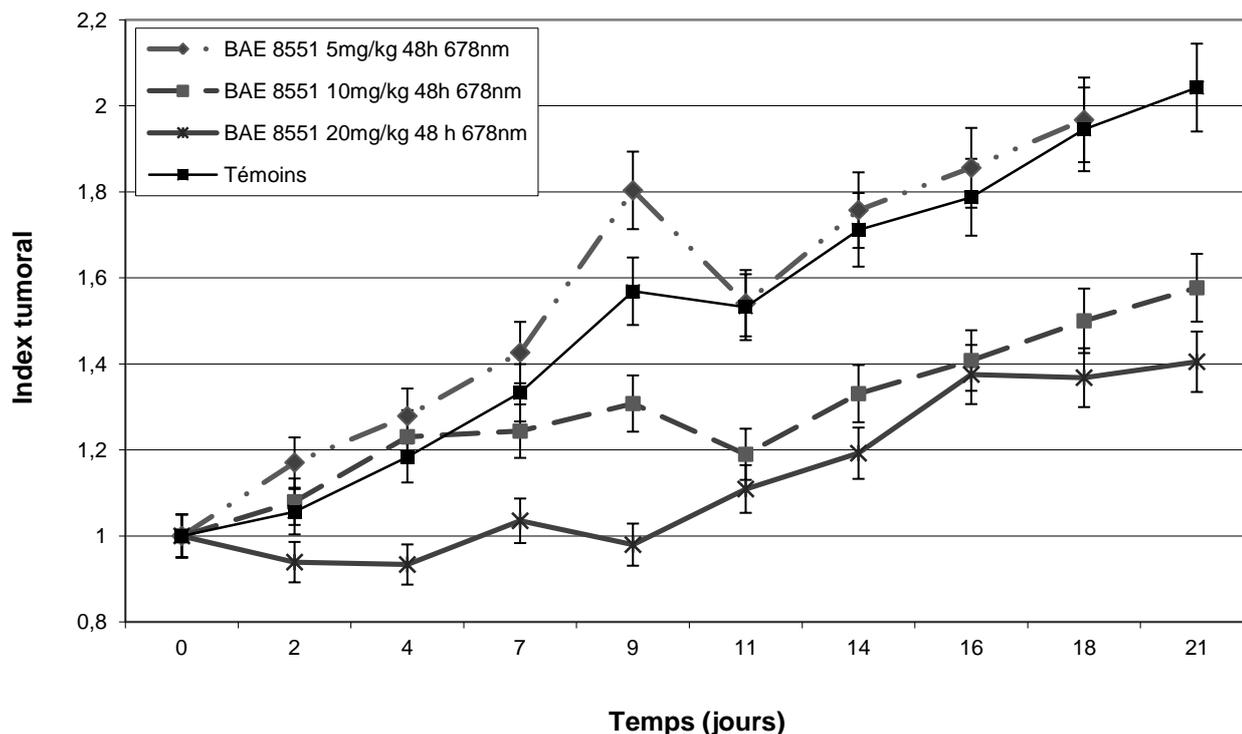


Figure 61 : Influence de la dose injectée pour le BAE 8551.

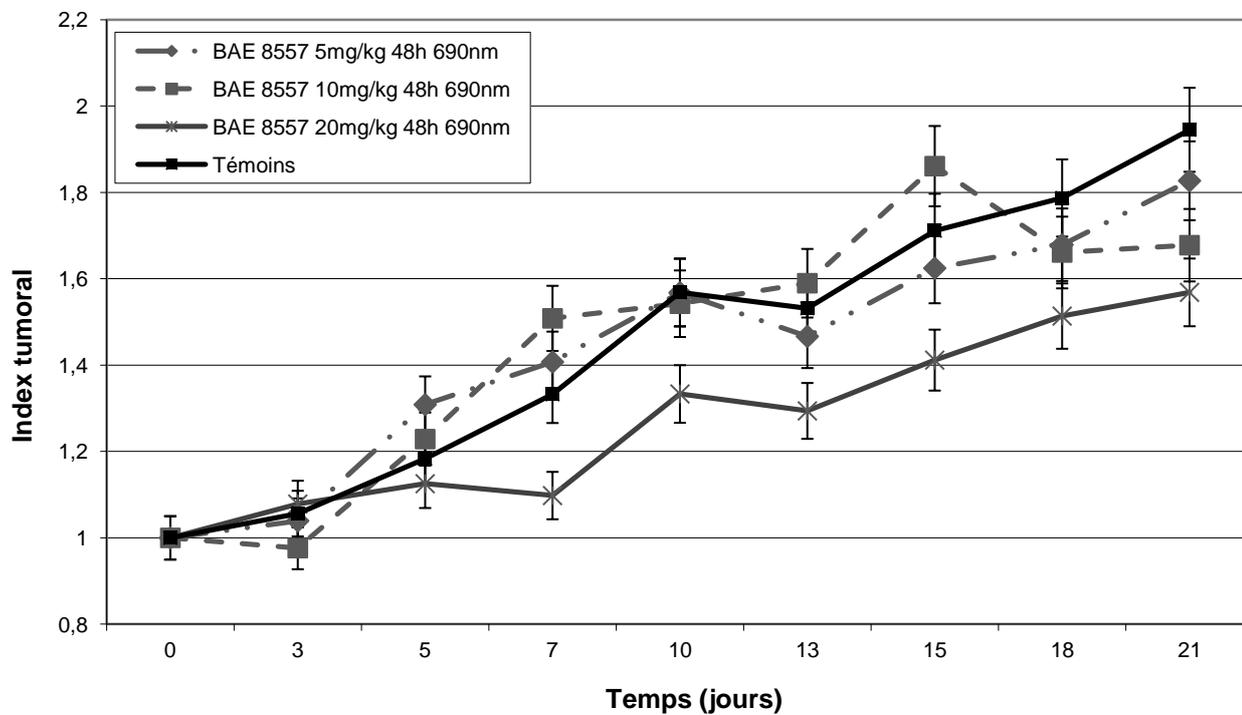


Figure 60 : Influence de la dose injectée pour le BAE 8557.

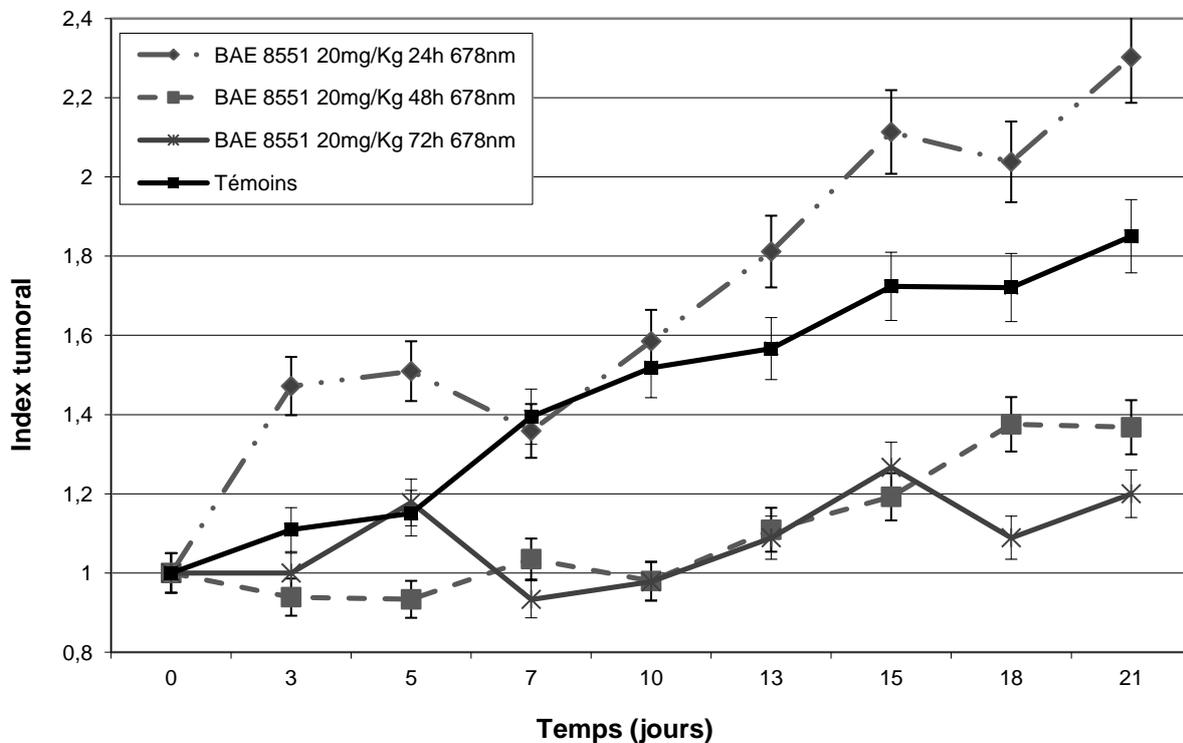


Figure 62 : Influence du délai entre injection et irradiation pour le BAE 8551.

Inversement, les délais courts donnent de meilleurs résultats avec le BAE 8557, comme le montre la *Figure 63*.

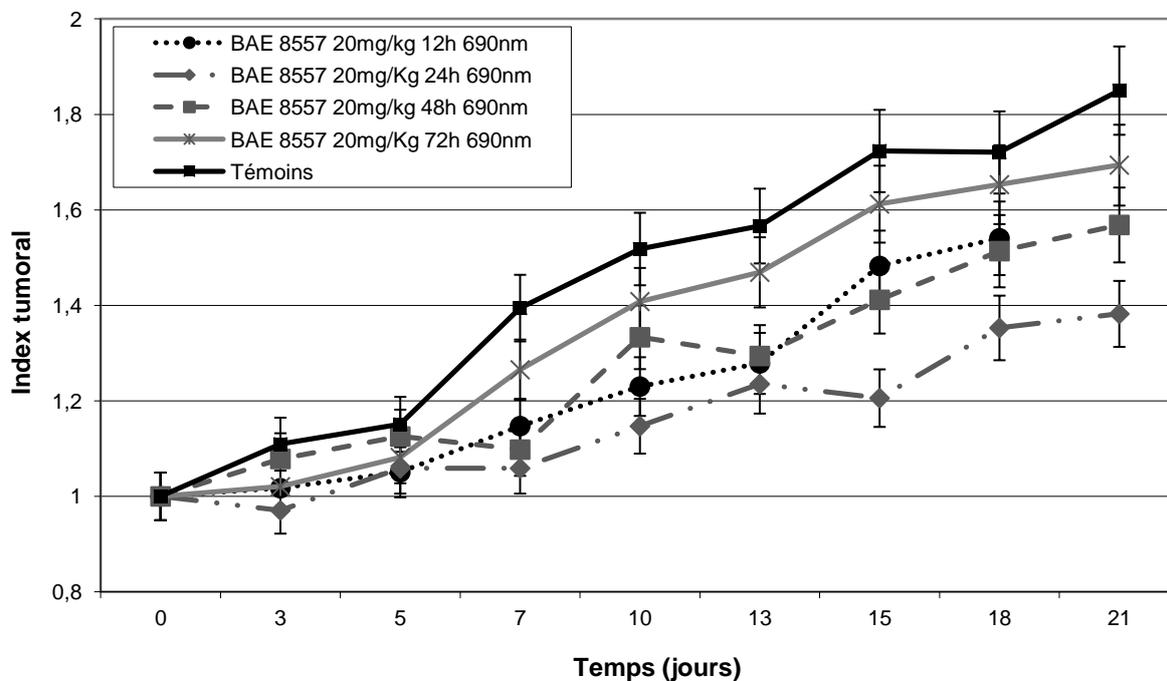


Figure 63 : Influence du délai entre injection et irradiation pour le BAE 8557.

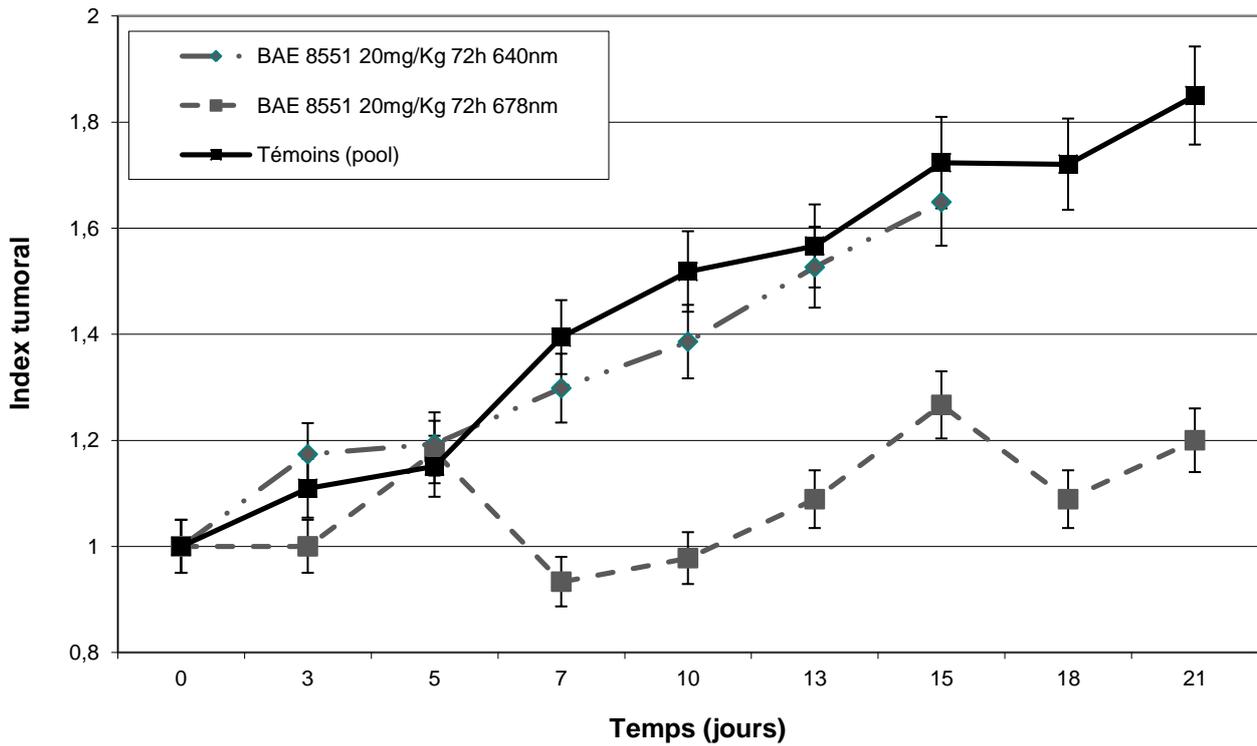


Figure 65 : Influence de la longueur d'onde d'irradiation pour le BAE 8551.

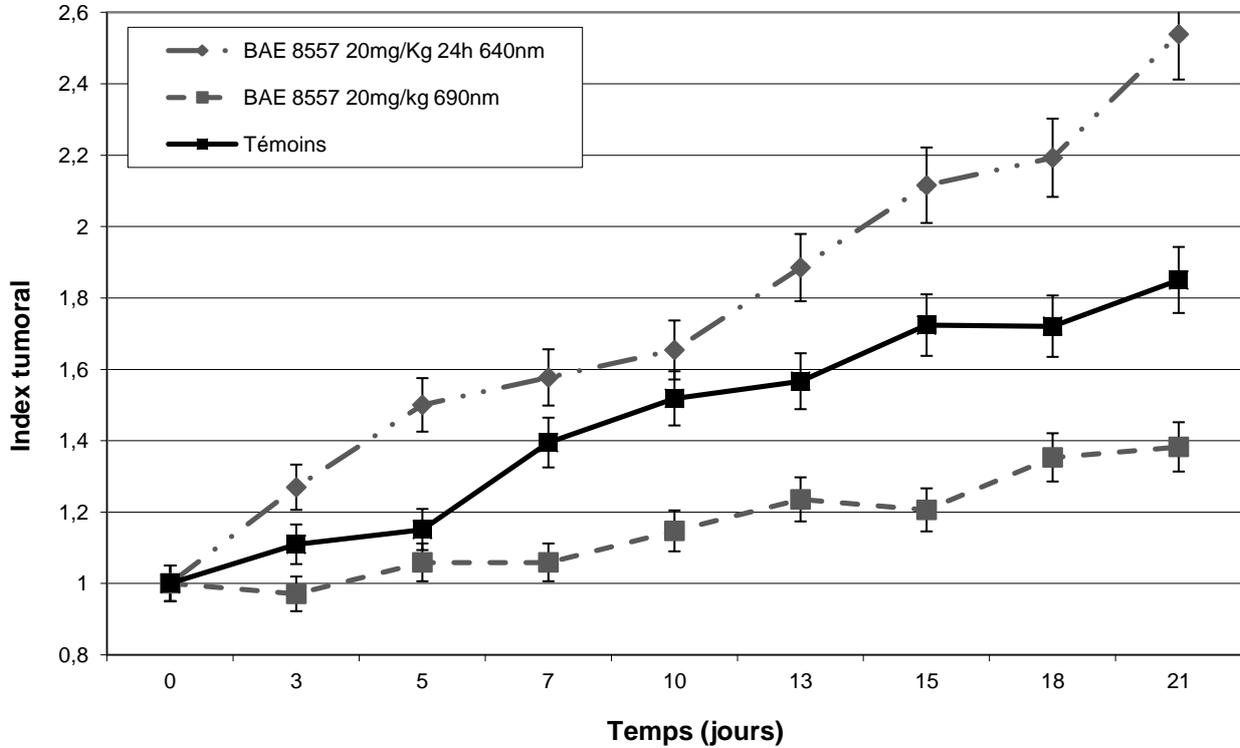


Figure 64 : Influence de la longueur d'onde d'irradiation pour le BAE 8557.

Conformément aux souhaits des inventeurs de ces 2 molécules, nous avons confirmé in vivo

que les longueurs d'onde sélectionnées in vitro (test DCF) pour l'irradiation donnaient bien les meilleurs résultats in vivo. La *Figure 64* et la *Figure 65* montrent qu'une irradiation à 640 nm en utilisant la plus forte dose de sensibilisant et le meilleur délai ne produit pas d'effet thérapeutique significatif. Dans le cas du BAE 8557, la courbe de croissance des souris irradiées à 640 nm dépasse la courbe des témoins. Comme aucun effet similaire de stimulation de la croissance tumorale n'a été observé avec une injection de photosensibilisant seul ou une irradiation seule, nous pensons que ce résultat surprenant n'est dû qu'au faible nombre d'animaux traités (2).

Nous avons enfin utilisé les meilleurs paramètres de traitement que nous avons déterminés (une dose de 20 mg/kg, 72 heures de délai et une irradiation à 678 nm pour le BAE 8551, et 24 heures de délai et une irradiation à 690 nm pour le BAE 8557), et nous les avons comparés avec des lots d'animaux plus importants (7 par conditions). Les 2 sensibilisants testés ont permis d'obtenir un ralentissement significatif de la croissance tumorale ($p=0,049$) pour une comparaison entre J₅ et J₁₃. Il n'y a toutefois pas d'amélioration significative par rapport à l'inhibition de croissance observée avec la m-THPC utilisée dans les mêmes conditions (données non présentées ici), ce qui ne permet pas d'espérer un bénéfice thérapeutique par

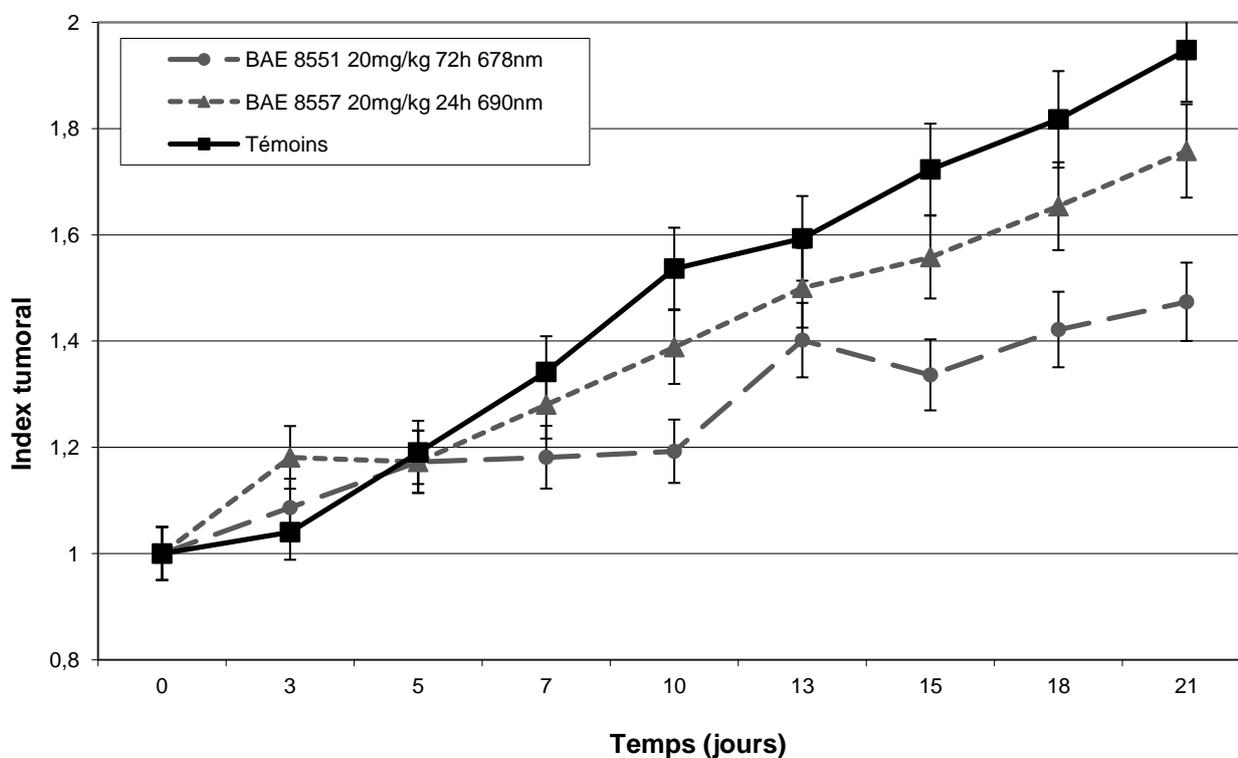


Figure 66 : Comparaison du BAE 8551 et du BAE 8557 avec les meilleurs paramètres de traitement.

rapport aux produits déjà sur le marché. Même si le développement de ces composés s'arrête à ce niveau, la démarche entreprise a permis de sélectionner des photosensibilisants actifs in vivo.

(2) BAE 9048 et BAE 9830

Après les résultats positifs mais insuffisants de la première série de composés, un deuxième screening nous a permis de sélectionner deux photosensibilisants prometteurs, dont les résultats in vitro (cf. ci-dessus) sont meilleurs que ceux des BAE 8551 et 8557.

Toutes les irradiations ont été effectuées à 679 nm, conformément à ce qui a été déterminé au cours des études in vitro.

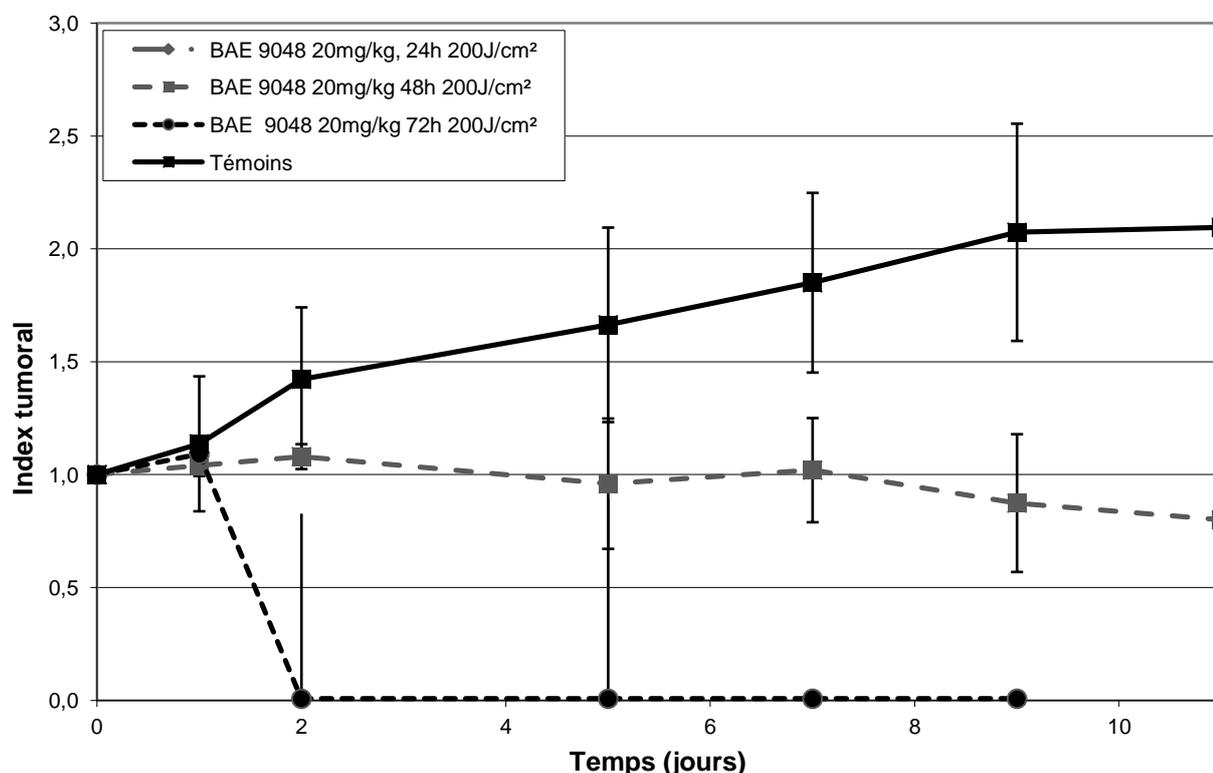


Figure 67 : Influence du délai entre injection de BAE 9048 à 20 mg/kg et irradiation.

La Figure 67 présente l'évolution de la croissance tumorale après une irradiation photochimique de 200 J/cm² 24, 48 ou 72 heures après une administration de BAE 9048 à 20 mg/kg. L'irradiation après 24 heures a malheureusement provoqué la mort des animaux traités, dans les 24 heures suivant l'irradiation. Cette toxicité n'est probablement pas liée à la seule toxicité du produit (absence d'effet toxique de l'injection seule de BAE 9048 à 20

mg/kg), mais plutôt à l'intensité et la brutalité de l'inflammation générée. Le délai court entre irradiation et injection peut expliquer une absence de sélectivité du traitement. D'autre part, du fait de la longueur d'onde d'irradiation, on peut penser que la lumière a pénétré suffisamment profondément pour déclencher une réaction photochimique dans des tissus sains sous-jacents. L'irradiation après 48 heures n'a pas entraîné d'effet indésirable, si ce n'est un œdème marqué de la zone traitée pour 1 des 2 animaux durant les jours suivant le traitement. L'irradiation à 72 heures a entraîné une nécrose sévère des tumeurs traitées. Sur un des animaux, aucune masse tumorale n'était détectable.

Pour les manipulations suivantes, nous avons utilisé des doses plus faibles. La *Figure 68* présente les résultats obtenus après une injection de BAE 9048 à 10mg/kg et une irradiation à 150 J/cm². La encore, la toxicité du traitement s'est avérée forte dans le cas d'une irradiation à 24 heures, et les 2 animaux traités sont morts. La nécrose induite est forte dans le cas d'un traitement à 48 heures, et durant 3 jours aucune masse tumorale n'était détectable chez les animaux traités. La croissance tumorale a malgré tout repris 1 semaine après le traitement. L'effet thérapeutique d'une irradiation 72 heures après l'injection a cette dose s'est avéré quasi nul.

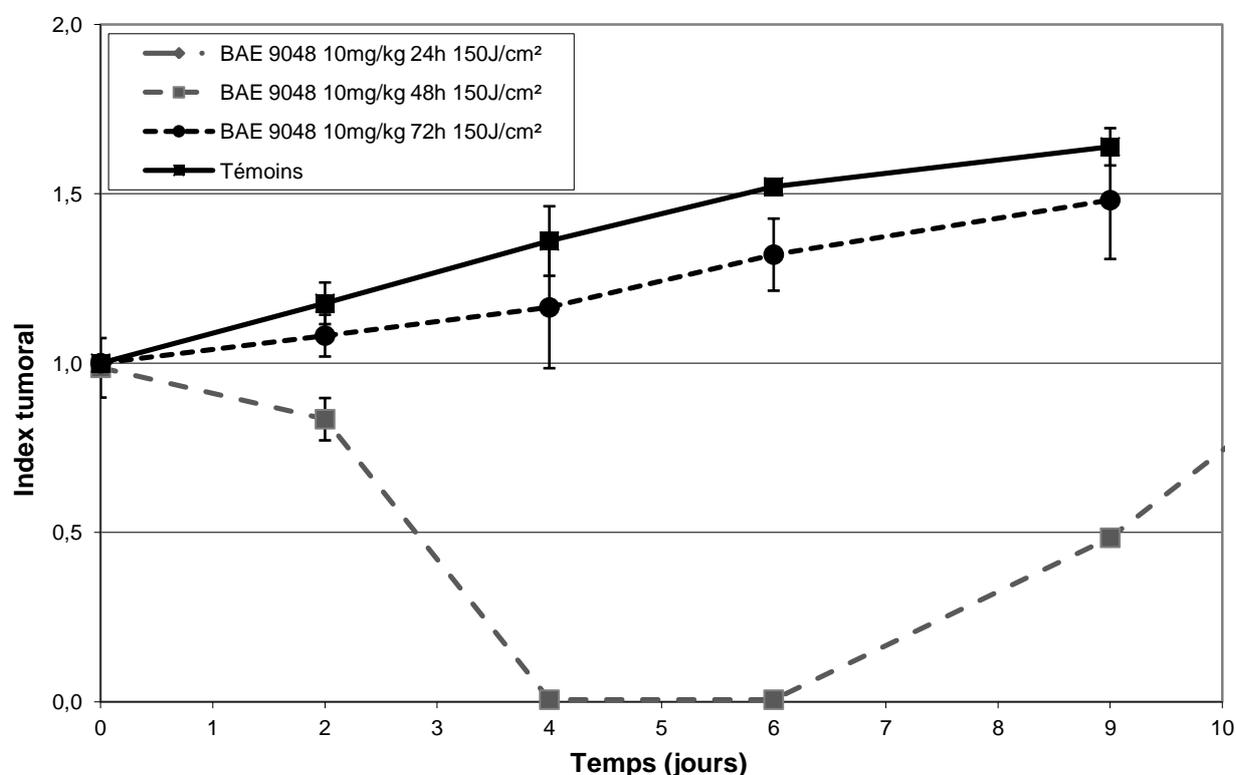


Figure 68 : Influence du délai entre injection de BAE 9048 à 10 mg/kg et irradiation.

La Figure 69 présente l'évolution de la croissance tumorale après des traitements photochimiques faisant intervenir des doses plus faibles. L'irradiation de 150 J/cm² effectuée 24 heures après une injection de BAE 9048 à 5 mg/kg a entraîné la mort d'un des deux animaux traités. L'autre animal a présenté une paralysie du membre traité, suggérant là encore un manque de sélectivité du traitement. Les irradiations à 75 J/cm² n'ont, elles, pas entraîné d'effet indésirable, mais seulement un œdème et une nécrose de la zone tumorale traitée. Alors qu'une irradiation de 200 J/cm² n'avait pas induit d'effet délétère chez les animaux ayant subi une injection à 20 mg/kg 48 heures avant le traitement, les 2 animaux irradiés avec une puissance de 200 J/cm² après une injection de 5 mg/kg sont morts dans les 24 heures suivant le traitement. Ce résultat étonnant peut être dû à des variations individuelles entre les animaux, ou peut-être une résorption incomplète du photosensibilisant lors de l'injection de la dose forte (problème éventuel de stabilité de la solution, variabilité du site d'injection intra-péritonéale). Ces résultats soulignent dans tous les cas une toxicité de la photochimiothérapie utilisant le BAE 9048, et une faible marge de sécurité entre les doses efficaces et les doses toxiques. Le Dr D. Moigno a choisi au vu de ses résultats de tester des doses plus faibles sur une dernière série d'animaux et en parallèle de modifier la structure du BAE 9048 pour se débarrasser de cette toxicité. Toujours dans le cas d'un traitement 48 h après l'injection de

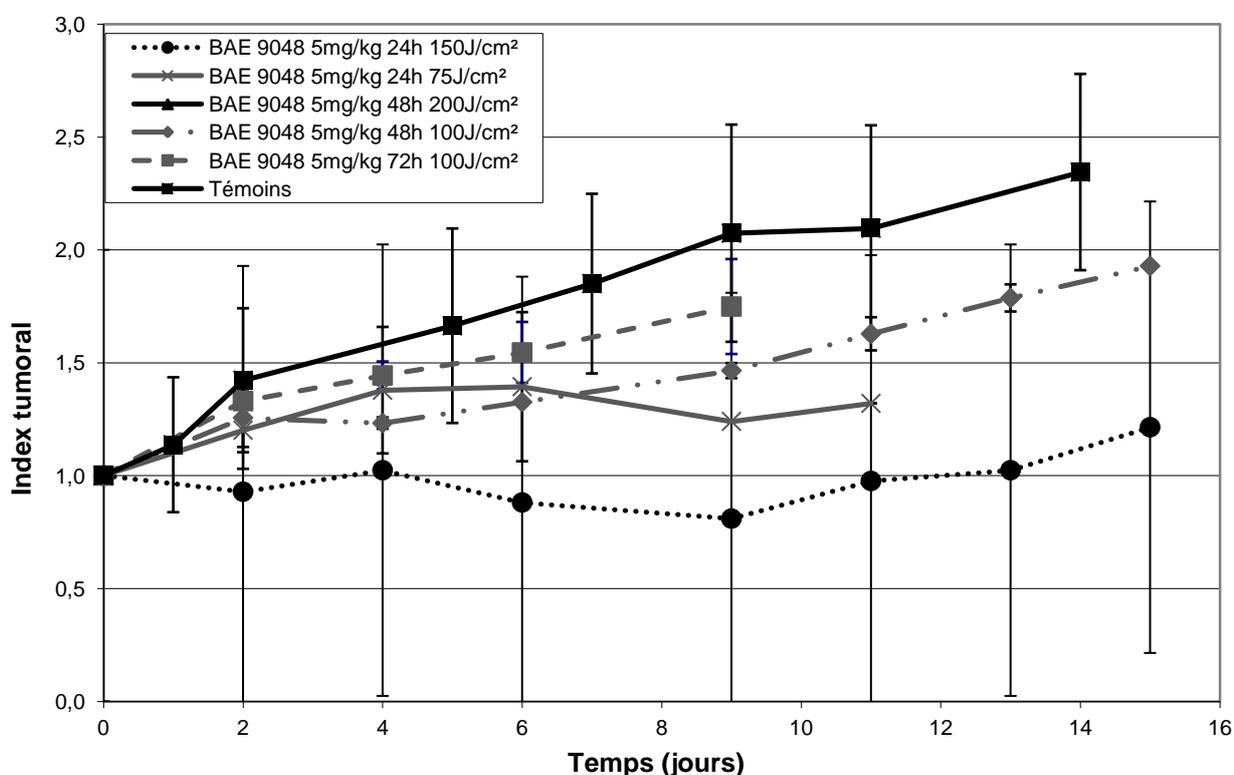


Figure 69 : Influence du délai entre injection de BAE 9048 à 5 mg/kg et irradiation.

photosensibilisant, une irradiation à 100 J/cm² a entraîné un retard de croissance de la tumeur, sans effet toxique associé. Pour finir, une irradiation à 100 J/cm² 72 heures après l'injection de BAE 9048 à 5mg/kg a entraîné des effets locaux (œdème, zone de nécrose tumorale), mais qui ne se sont pas traduits par une forte inhibition de la croissance tumorale.

La Figure 70 montre l'évolution de la croissance tumorale après injection de BAE 9048 à 2 mg/kg et des irradiations de 150 J/cm² après 24 heures et 200 J/cm² après 48 heures. Le traitement après 48 heures n'a pas eu d'effet significatif macroscopiquement. Le traitement après 24 heures a entraîné un œdème et une nécrose de la zone traitée, ainsi qu'un retard dans le développement tumoral. Les courbes obtenues avec une irradiation de 75 ou 150 J/cm² 24 heures après l'injection et 200 J/cm² 48 heures après l'injection sont significativement inférieures à la courbe de croissance des souris non traitées ($p < 0,05$), mais ce résultat devrait être confirmé sur des lots d'animaux plus grands. En accord avec le Dr. D Moigno, nous avons choisi de ne pas augmenter la taille des lots, mais de tester un dérivé du BAE 9048, qui a donné de meilleurs résultats in vitro, le BAE 9830.

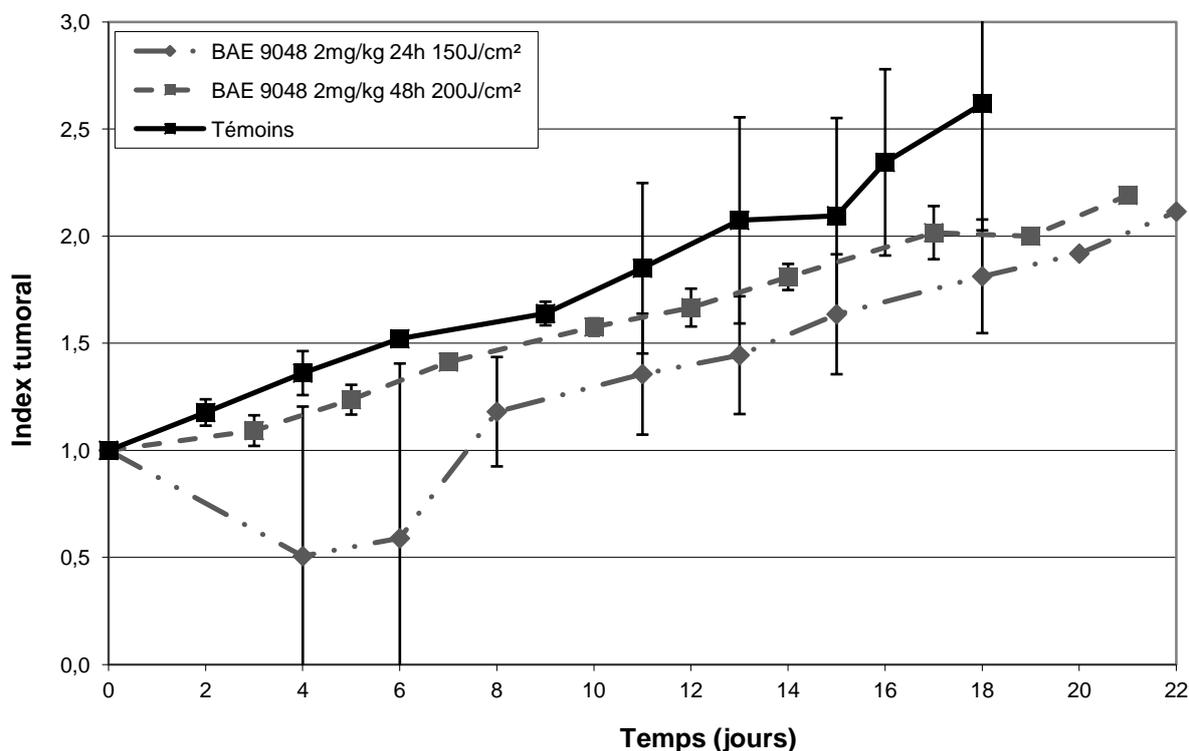


Figure 70 : Influence du délai entre injection de BAE 9048 à 2 mg/kg et irradiation.

La résorption du BAE 9830 s'est avérée mauvaise après administration intra-péritonéale, une grande partie (voire la totalité) du produit se retrouvant sous forme d'agrégats répartis dans toute la cavité abdominale plusieurs jours après l'injection. Après vérification du fait que ce produit ne précipitait pas en présence de sérum et qu'il n'induisait pas d'embolie, les

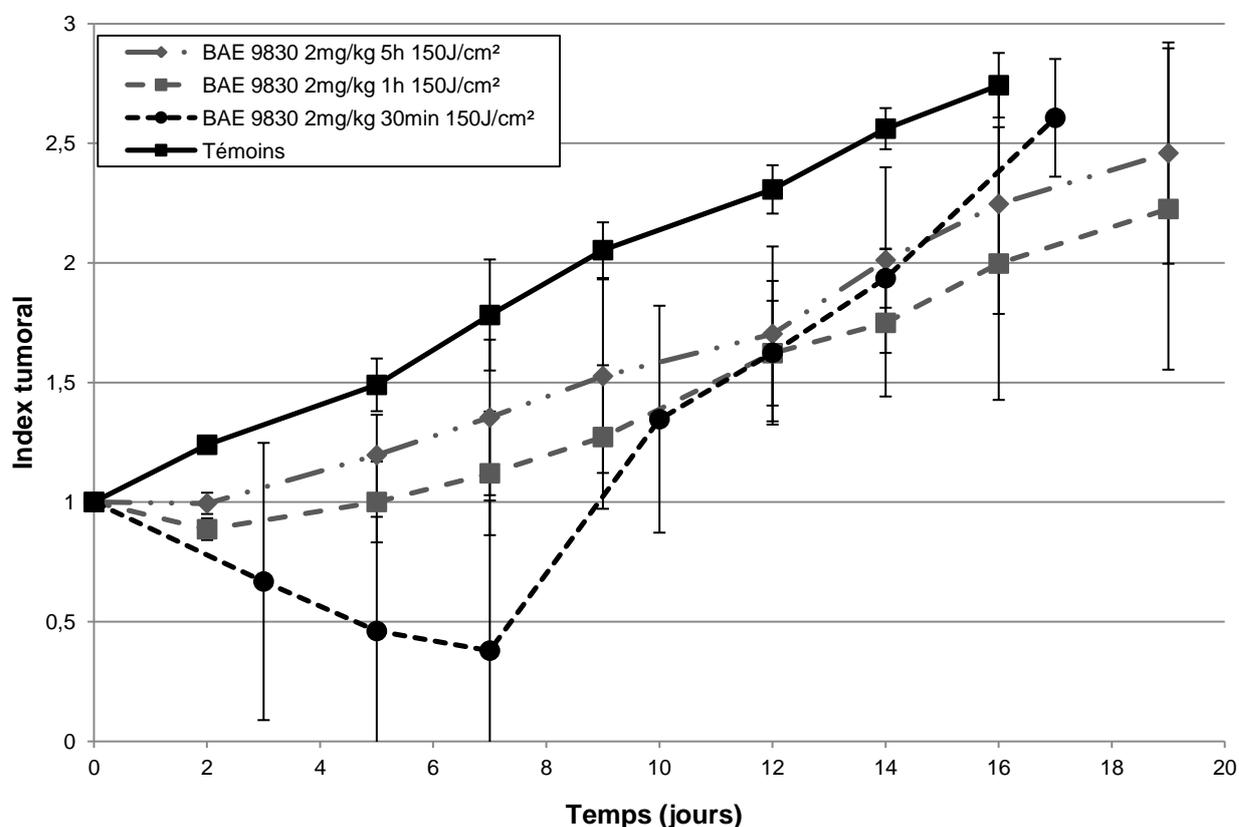


Figure 71 : Influence du délai entre injection de BAE 9830 à 2 mg/kg et irradiation.

administrations ont été réalisées par voie intraveineuse (veine caudale ventrale) à 2 mg/kg pour tous les animaux (4 par groupe). Les irradiations (150 J/cm²) effectuées 5 heures après l'injection n'ont eu qu'un effet modéré, que ce soit en termes de réaction locale ou de retard de croissance tumorale (cf. Figure 71). Les irradiations effectuées 1 heure après l'injection ont induit un œdème et une nécrose de la zone traitée, ainsi qu'une inhibition de croissance qui semble supérieure à celle observée dans le cas précédent. Dans le cas d'une irradiation effectuée 30 minutes après l'injection IV de BAE 9830, 1 animal (sur 4) est mort à la suite du traitement, et 2 ont présenté une paralysie du membre traité. Cette paralysie a régressé dans les jours suivant le traitement, pour n'être plus qu'un léger déficit locomoteur 7 jours après l'irradiation. Cette paralysie a pu être causée par une compression nerveuse liée à l'œdème de la zone traitée, ou éventuellement une névrite due à la photochimie. Un de ces 2 animaux a également présenté après le traitement un prolapsus pénien qui a perduré une dizaine de jours

(pas de lésion associée), probablement pour les mêmes raisons. Les courbes de croissance tumorale des souris traitées sont significativement inférieures ($p < 0,05$) à celle des souris non traitées.

b) Sur les Tumeurs A549

Le Dr A. Reshetnicov souhaite utiliser ce photosensibilisant pour le traitement des cancers du poumon. Les essais thérapeutiques ont été donc réalisés sur une lignée cancéreuse pulmonaire. Dans ce cas les greffes ont été faites sous la peau en regard de la tête du fémur droit, mais dans des études ultérieures, les greffes seront faites au niveau des poumons.

La Figure 72 présente les résultats de la photochimiothérapie sur la croissance de ces tumeurs. Les délais entre injection et irradiation ont été choisis en fonction des données de l'étude cinétique : le délai de 3 heures correspond pic de concentration dans la tumeur, et les délais de 5 et 7 heures aux moments où la sélectivité de rétention du photosensibilisant est la meilleure. Aux plus fortes doses (20 mg/kg et 200J/cm²), les traitements induisent des nécroses sévères des zones traitées, un œdème et un fort retard de croissance tumorale. 2 des 4 souris traitées après 1 heure sont mortes, de même qu'une des souris traitée après 5 heures. Les courbes de croissance des souris traitées avec ces fortes doses sont toutes très significativement

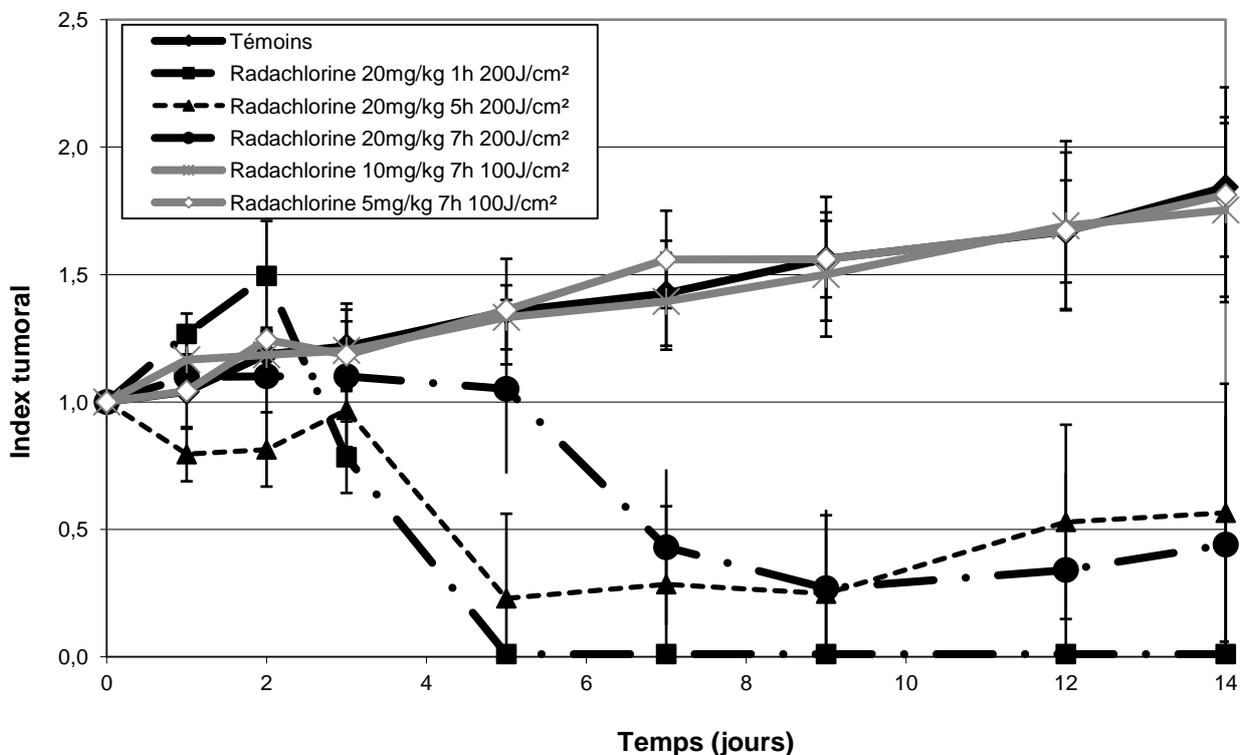


Figure 72 : Evolution de la croissance tumorale après PDT avec de la Radachhlorine.

inférieures aux courbes de croissance des souris témoins ($p < 0,001$). Les souris traitées à 1 et 5 heures présentent toute une paralysie du membre traité de même que 3 des 4 souris traitées à 7 heures. Pour privilégier la sélectivité du traitement et limiter ces effets indésirables, nous avons réduit l'énergie lumineuse (100 J/cm^2) apportée et la dose administrée (5 ou 10 mg/kg), et nous avons réalisé les traitements au moment où la sélectivité devait être la meilleure (7

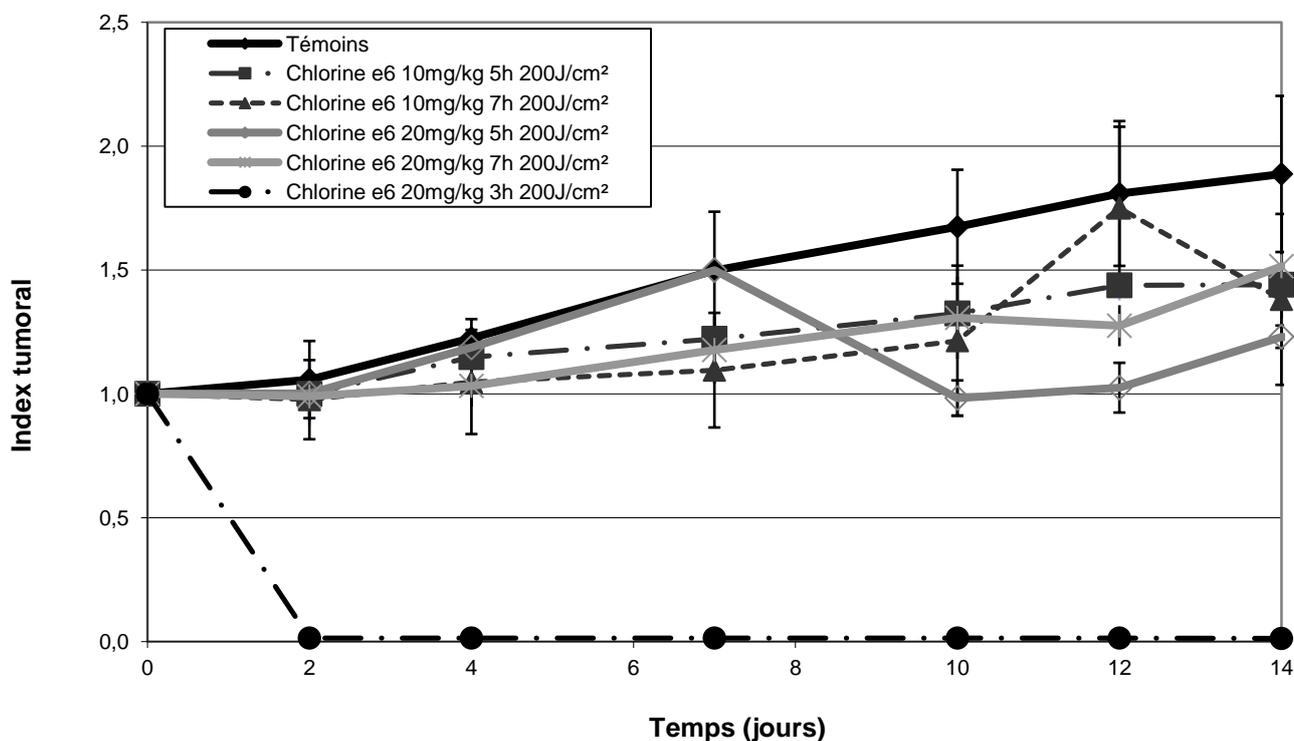


Figure 73 : Evolution de la croissance tumorale après PDT avec de la chlorine e6.

heures). Malheureusement, en dépit de réactions locales (œdèmes), ces traitements n'ont pas induit de retard dans la croissance tumorale. L'évolution de la croissance des tumeurs A549 des souris traitées avec de la chlorine e6 dans les mêmes conditions sont présentée sur la Figure 73.

3. Efficacité de la photochimiothérapie intra-cérébrale

Avant d'entreprendre des essais thérapeutiques, nous avons vérifié la faisabilité de l'expérimentation et confirmé les données de la littérature concernant le délai entre greffe tumorale et nombre de cellules F98 injectées avec 6 animaux. Cette étape a permis de confirmer le développement d'une tumeur après injection (dans 5 cas sur 6), de caractériser histologiquement les tumeurs, et d'évaluer la croissance tumorale pour choisir le meilleur moment du traitement photochimique.

Les analyses anatomopathologiques ont confirmé la prolifération tumorale maligne, constituée de cellules fusiformes ou micro-kystiques, avec des noyaux globuleux et hyperchromatiques. L'index mitotique de ces tissus est élevé et les atypies nucléaires nombreuses. Sont également observables des foyers de nécrose "palissadique" ou à l'emporte pièce" (cf. *Figure 74-D*), ainsi qu'une prolifération le long des espaces de Virchows-Robin (espaces péri-vasculaires, cf. *Figure 74-C*), mais pas de prolifération endothélio-capillaire ("touffes gloméruloïdes", classiquement observées dans les glioblastomes). Bien que le succès des greffes tumorales soit un élément positif, la présence de nécrose avant traitement, et l'absence de néo-vascularisation peuvent poser problème pour mesurer l'impact du traitement, en termes d'inhibition de vascularisation et de nécrose induite. Ces deux caractères pouvant être liés à un développement tumoral trop rapide, nous avons essayé de diminuer la quantité de cellules tumorales greffées (10^3), de manière à ce que le développement tumoral soit plus progressif. Nous avons également diminué le volume injecté (2 ou 5 μL) de manière à limiter les risques de fuite de la suspension de cellules tumorales en dehors de la zone souhaitée.

Diminuer le volume injecté à 5 μL n'a pas modifié la durée de survie des animaux (20,3 jours $\pm 2,2$ jours, cf. *Tableau 11*), ni le schéma de développement tumoral (manchons péri-vasculaires). Diminuer le volume injecté à 2 μL entraîne en revanche une forte variabilité dans la survie des animaux, sans doute à cause d'une erreur relative importante sur le volume injecté, en dépit de l'utilisation d'une seringue Hamilton de 10 μL .

Diminuer le nombre de cellules injectées permet un développement tumoral plus lent (survie de 42 jours), mais n'a pas eu d'influence nette sur le développement tumoral.

Une des questions que posait ce protocole était le moment d'administration du thalidomide ou du Glivec[®]. En effet, le photosensibilisant est administré par voie intraveineuse, et il n'est pas souhaitable d'inhiber la vascularisation tumorale avant l'étape photochimique, de manière à ce que la résorption du photosensibilisant ne soit pas perturbée. La vascularisation tumorale étant dans notre modèle faible pour un glioblastome, nous avons décidé que les traitements anti-angiogènes ne débuteraient qu'après le traitement photochimique. D'autre part, nous avons souhaité vérifier que le photosensibilisant parvenait bien au site tumoral. Pour cela, nous avons sacrifié 3 rats 13 jours après la greffe tumorale et 12 heures après l'injection intra-péritonéale de SIM01, prélevé le cerveau et observé après coupe transversale le site de la greffe tumorale macroscopiquement en lumière visible et en lumière UV. Nous avons observé sur les 3 animaux une fluorescence faible mais nettement délimitée à la zone tumorale (cf. *Figure 74-B*). En dépit de la faible néo-vascularisation et d'une barrière hémato-encéphalique préservée

(cf. Figure 74-A) par rapport au cas du modèle précédemment utilisé dans le laboratoire⁶, le photosensibilisant parvient bien dans le tissu cérébral et s'accumule dans la tumeur.

Pour tester l'efficacité de la photochimiothérapie avec le SIM01 associée ou non à un traitement avec du thalidomide, nous avons donc utilisé les conditions opératoires suivantes:

- Greffe de 10^4 cellules F98 dans un volume de 5 μ L.
- Injection intra-péritonéale de SIM01 à 2, 4 ou 10 mg/kg 11 jours après la greffe.
- Irradiation 12 heures après l'injection de photosensibilisant à 652 nm avec une fluence de 100 ou 150 J/cm²
- Pour les rats traités à la fois par photochimiothérapie et par inhibiteur de vascularisation, le thalidomide en solution dans le DMSO est administré par voie orale, à une dose de 16 mg/kg/jour¹⁶⁵, tous les jours à partir du réveil de l'animal après photochimiothérapie et jusqu'à la mort ou au sacrifice de l'animal.

Greffe tumorale	Traitement	Nombre d'animaux	Survie (jours)	Commentaires
10^4 cellules F98 dans 10 μ L		6	19,5 \pm 0,7	4 animaux sacrifiés à J ₁₀ et J ₁₃ pour analyses histologiques, et 2 animaux morts à J ₁₉ et J ₂₀ . Présence d'une tumeur dans 5 cas sur 6.
10^4 cellules F98 dans 5 μ L		4	20,3 \pm 2,2	Présence d'une tumeur dans 4 cas sur 4
10^4 cellules F98 dans 2 μ L		4	35,7 \pm 14	Présence d'une tumeur dans 2 cas sur 4
10^3 cellules F98 dans 5 μ L		2	42	Présence d'une tumeur dans 2 cas sur 2
10^4 cellules F98 dans 5 μ L	SIM01 2 mg/kg + 100 J/cm ²	1	18	Présence d'une tumeur mais pas d'effet thérapeutique
10^4 cellules F98 dans 5 μ L	SIM01 10 mg/kg	3	Sacrifice J ₁₃	Fluorescence tumorale observable dans 3 cas sur 3
10^4 cellules F98 dans 5 μ L	SIM01 4 mg/kg + 100 J/cm ²	4	21 \pm 2,6	Présence d'une tumeur dans 4 cas sur 4. 1 animal mort après la PDT.
10^4 cellules F98 dans 5 μ L	SIM01 10 mg/kg + 150 J/cm ²	6	28,3 \pm 2,5	3 animaux morts après PDT et 3 animaux présentant des déficits nerveux transitoires
10^4 cellules F98 dans 5 μ L	SIM01 4 mg/kg + 150 J/cm ² + Thalidomide	2	32 \pm 2,8	Œdème cutané marqué après traitement PDT. Nécrose de 50% de la masse tumorale pour l'animal mort à J ₃₄ .

Tableau 11 : Conditions expérimentales et survie des rats ayant subi la greffe d'un glioblastome

Les traitements photochimiques ont induit chez 3 animaux traités un œdème cutané en périphérie de la zone traitée, probablement dû à une concentration non négligeable de photosensibilisant dans la peau, et une diffraction lumineuse au moment de l'irradiation. Des déficits nerveux (troubles locomoteurs ou de proprioception) ont également été observés chez les animaux après le traitement. Nous avons attribué ces troubles à un œdème cérébral et nous

les avons traités en conséquence (Dexaméthasone 0,4 mg/kg SC et Furosémide 2mg/kg SC). Les symptômes nerveux ont progressivement régressé. 3 animaux sont morts dans les 24 heures suivant l'irradiation. Histologiquement, les animaux dont l'encéphale a été analysé sont porteurs d'une tumeur, présentant des plages de nécrose plus ou moins grandes (cf. Figure 74-E).

Au vu des résultats obtenus, nous avons conclu que la photochimiothérapie sur ce modèle de tumeur induisait bien une nécrose tumorale, mais que l'ampleur de cette nécrose était responsable d'effets toxiques importants. Nous avons donc choisi, en tenant compte de la disponibilité de nouveaux photosensibilisants de ne pas poursuivre cette expérimentation.

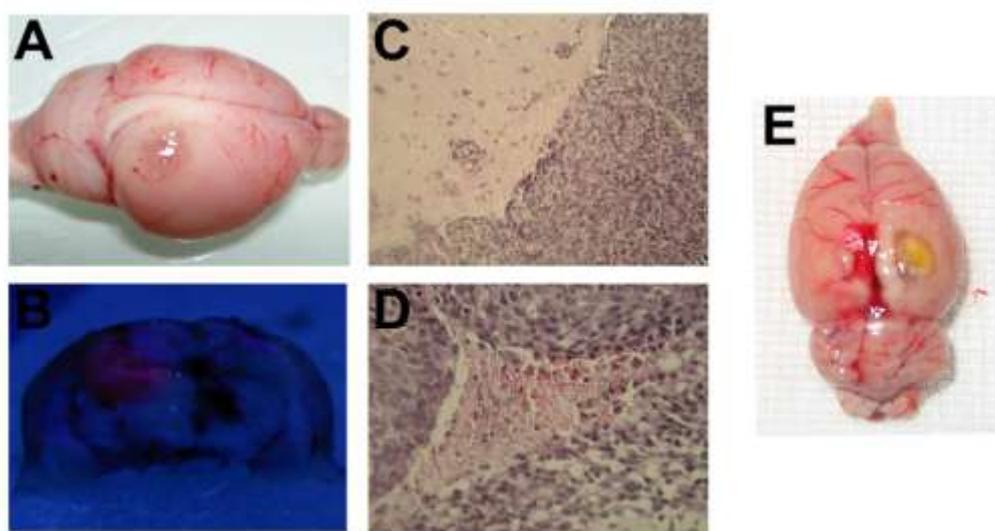


Figure 74 : Gliomes F98.

DISCUSSION

VI. Discussion

Au cours du travail présenté ici, nous avons d'abord entrepris d'étudier l'efficacité d'un nouveau photosensibilisant, SIM01, sur un modèle de tumeur gliale, en associant à la photochimiothérapie des traitements adjuvants ciblant la néovascularisation tumorale. Ce projet a évolué au fil des résultats obtenus et des nouvelles collaborations établies par le laboratoire. En particulier, la possibilité d'avoir un double effet thérapeutique, photochimique et inhibiteur de protéine kinase, avec une nouvelle classe de composés, les indirubines, a ouvert de nouvelles perspectives. Nous avons évalué 193 nouveaux composés pour la photochimiothérapie, provenant soit de nouvelles synthèses, soit d'extraction à partir d'organismes marins. Le Laboratoire de Photobiologie des Cancers possède une expertise dans le domaine de l'évaluation des photosensibilisants, puisque 5 des 6 composés actuellement sur le marché (contenus parfois dans différentes spécialités pharmaceutiques, cf. *Annexe 1*) ont été testés dans le laboratoire, de même que beaucoup des composés en cours d'évaluation clinique. Le Pr Patrice est d'ailleurs à l'origine de la création de l'entreprise Photobiosystem, dont un des objectifs était de commercialiser le SIM01 (PCT N° WO 02/10173/A1). Seule une entreprise pharmaceutique soutenue par des fonds privés possède les moyens financiers nécessaires au développement et à la mise sur le marché d'un médicament (cf. *Annexe 2*), permettant ainsi aux malades de bénéficier d'un traitement innovant. C'est la raison pour laquelle le laboratoire s'intéresse très précocement à la brevetabilité des nouveaux photosensibilisants, et met en œuvre des études dont le but est de sélectionner rapidement les composés qui sont susceptibles de procurer un bénéfice thérapeutique par rapport aux traitements existants. Cette démarche est complémentaire de l'exploration des modes d'action de la photochimiothérapie et de la recherche de nouvelles structures photoréactives, menées en amont en étroite collaboration avec des chimistes spécialisés.

Il n'est pas possible de prévoir la photoréactivité d'une substance, en particulier dans des conditions « biologiques » (présence de protéines, d'ions, d'enzymes...). L'identification de nouvelles molécules requiert donc la mise en œuvre d'une série de tests expérimentaux, qui nécessitent un savoir faire que possède le Laboratoire de Photobiologie des Cancers. Toutefois, face à la quantité de nouvelles substances à tester dans le cadre du travail présenté ici, il s'est avéré nécessaire de mettre en place de nouveaux tests rapides et de rationaliser leur utilisation pour permettre une sélection rapide des composés les plus intéressants sans avoir recours systématiquement aux tests sur cellules, coûteux et nécessitant plusieurs jours de travail, ni aux tests in vivo. Nous allons dans un premier temps présenter la stratégie de criblage mise en place, avant d'en détailler les différentes étapes.

Algorithme de criblage

La première étape (cf. *Figure 75*) consiste à déterminer le spectre d'absorption de la substance à tester pour déterminer la ou les longueurs d'onde utilisables pour son irradiation. Dans le cas de mélanges (extraits d'algues), il sera nécessaire de tester séparément les différents pics d'absorption, car ils peuvent correspondre à des molécules différentes. Cette étape permet

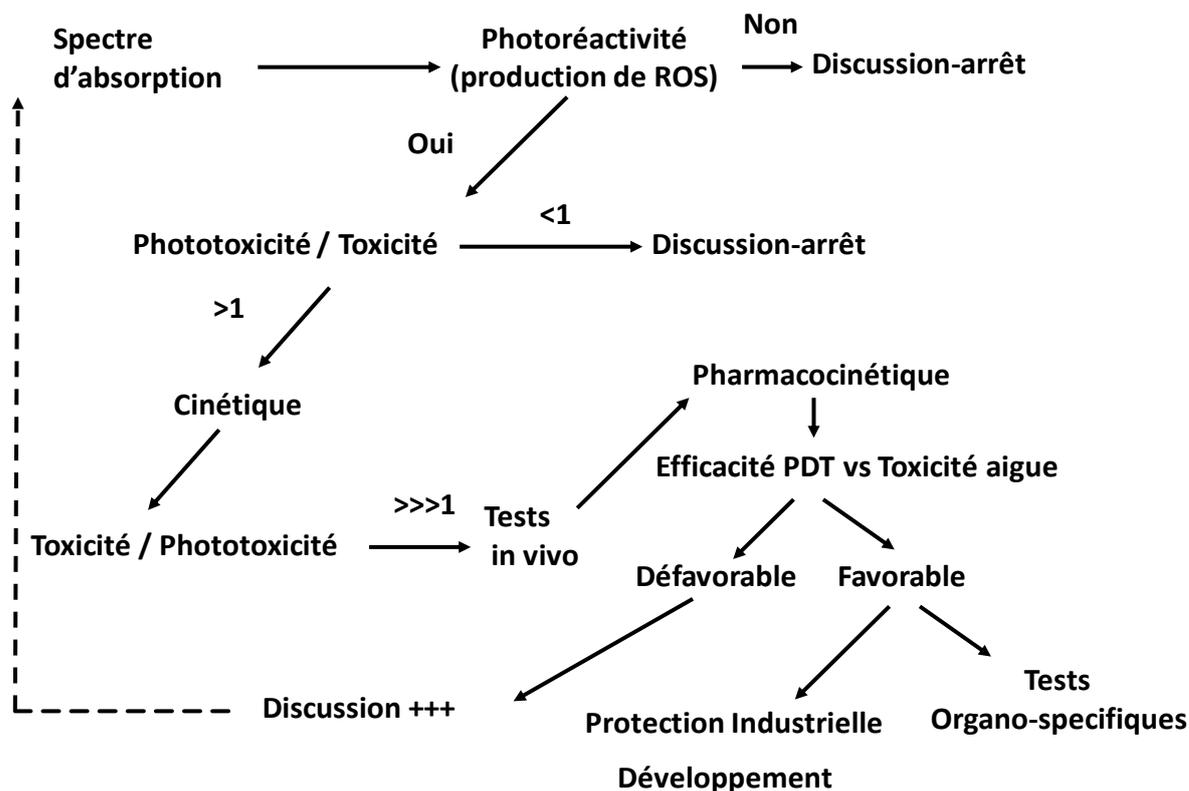


Figure 75 : Algorithme de criblage

également une première sélection. En effet, il n'est intéressant de tester les composés qui n'absorbent pas dans des longueurs d'onde directement exploitables en photochimiothérapie que si leur structure chimique est suffisamment originale pour justifier la synthèse puis l'étude de dérivés ayant un pic d'absorption dans le rouge (cf. effet bathochrome), ou si leurs inventeurs envisagent des applications compatibles avec des longueurs d'onde d'irradiation courtes (excitation bi-photonique à 2λ , cf. *II.B.2.d*), PDT ex vivo).

Dans un second temps, il est possible d'évaluer la stabilité du composé en traçant le spectre d'absorption avant et après irradiation, ou avec et sans FCS. L'objectif n'est pas ici de réaliser une étude complète du comportement chimique du produit testé, mais plutôt d'étudier les variations spectrales observées dans les conditions qui seront celles des tests ultérieurs. En effet, la présence de sérum peut faire précipiter le produit, entraîner une agrégation, ou l'hydrolyse

d'une de ses liaisons. Certaines de ces modifications sont visibles à l'œil nu, mais d'autres (comme l'apparition de la forme agrégée des phthalocyanines) ne sont visibles que sur un spectre d'absorption. Ces premières données sont importantes : il n'est pas envisageable de tester sur des cultures cellulaires ou d'injecter à des animaux un produit qui précipite en présence de sérum. Il est également inutile de tester des composés très instables en présence de sérum, car les modifications chimiques visant à protéger des liaisons ou diminuer leur capacité d'agrégation sont également susceptibles de modifier de manière imprévisible leur photoréactivité¹⁵⁹. Mieux vaut tester directement des dérivés dont on peut envisager l'utilisation *in vivo*.

De la même manière, un photobleaching important est un inconvénient pour un photosensibilisant, et il est inutile dans les tests ultérieurs d'essayer d'augmenter les doses de lumière si le produit n'absorbe plus après les premières secondes d'irradiation.

La réalisation d'un spectre de fluorescence n'est pas une étape indispensable, mais elle permet de déterminer si la fluorescence du produit testé est exploitable pour suivre sa distribution, dans des cellules ou des organes.

L'étape suivante consiste à évaluer la photoréactivité des nouvelles structures. Il s'agit bien sûr d'une condition *sine qua non* au développement d'un nouveau photosensibilisant. Il existe de nombreux tests, mais le laboratoire a choisi de développer une technique originale (cf. *IV.A.3.a*), ayant l'avantage d'être à la fois simple, rapide, et de permettre l'évaluation d'un composé dans des conditions pertinentes en biologie (température, pH, présence de sérum). Comme nous l'avons vu précédemment, les photosensibilisants utilisés en photochimiothérapie doivent produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS ou Reactive Oxygen Species) lorsqu'ils sont soumis à une irradiation lumineuse appropriée. Ces espèces réactives sont multiples (radical superoxyde $O_2\bullet$, radical perhydroxyle $HO_2\bullet$, peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , radical hydroxyle $HO\bullet$...), mais l'espèce identifiée comme la plus importante en photochimiothérapie est l'oxygène singulet (1O_2)⁶⁸. Il est possible d'étudier le rendement quantique en 1O_2 des photosensibilisants²⁵, mais sa détection directe pose plusieurs problèmes :

- La phosphorescence émise par sa désexcitation se situe dans l'infrarouge (1270 nm).
- Sa durée de vie est très faible, d'où la nécessité d'utiliser des solvants organiques purs peu pertinents pour des applications cliniques (Diméthyl-furane, cyclohexane, méthanol deutéré...) pour faciliter sa détection. Dans des solutions aqueuses sa durée de vie estimée est comprise entre 0.02 μsec ⁹³ et 3 μsec ⁹².

Pour contourner ces problèmes et tester la photoréactivité des produits dans des conditions plus proches des conditions d'utilisation souhaitées, plusieurs méthodes ont été développées, toutes

fondées sur le même principe : une cible chimique est mise au contact du photosensibilisant à tester ; il suffit de doser après irradiation le produit de l'oxydation de cette cible pour évaluer la quantité de ROS générés. Parmi les cibles utilisées nous pouvons citer : le luminol¹⁶⁶⁻¹⁶⁸, le DMSO¹⁶⁹, le désoxyribose¹⁷⁰, le DMFO₂¹⁷¹, et la DCF, très largement utilisée pour détecter la production d'espèces oxydantes¹⁷²⁻¹⁷⁹, et qui a été utilisée dans notre laboratoire¹⁸⁰. Notons que les composants des tissus traités par photochimiothérapie subissent une oxydation et qu'il est également possible de doser ces produits oxydés¹⁸¹ ; ce type de dosage nécessitant des manipulations *in vivo*, il ne nous intéressera pas ici.

La méthode fondée sur l'utilisation de la DCFH déjà mise au point par le laboratoire, très bien adaptée pour doser des chlorines extraites de tissus, n'était pas complètement satisfaisante pour tester une large gamme de nouveaux photosensibilisants. En effet, le test s'effectue à pH alcalin (12), ce qui peut modifier la photoréactivité de manière imprévisible, surtout si l'on teste des composés extraits qui n'ont pas encore été caractérisés et dont on ne connaît pas le pKa. Il faut également tenir compte de l'influence des protéines et autres composés biologiques susceptibles de faire varier la photoréactivité. C'est le cas lorsque le photosensibilisant est extrait d'organes, mais pas si il est testé *in vitro* avant toute injection à un animal. Enfin, une photo-oxydation directe de la DCFH a été décrite^{182,183} et observée dans le laboratoire pour des longueurs d'onde inférieures à 600 nm (données non publiées). Cette réaction est très inattendue, puisque qu'elle se produit également lors d'une irradiation en dehors du spectre d'absorption de la DCFH¹⁸³ ; bien que l'initiation de cette photoréaction reste inexplicée, on peut faire l'hypothèse d'une auto-amplification puisque le photoproduit absorbe les longueurs d'onde à l'origine de ce phénomène¹⁸². Comme nous l'avons décrit précédemment, un photosensibilisant doit absorber des longueurs d'onde dans le domaine du rouge et de l'infrarouge, qui pénètrent plus profondément les tissus. Il est possible de tester de tels photosensibilisants sans être gêné par la photo-oxydation de la DCFH. Pourtant le laboratoire doit pouvoir tester des photosensibilisants quelle que soit la longueur d'onde d'irradiation : bien qu'il soit plus favorable de mettre en évidence directement des composés absorbant les longueurs d'onde utilisées en photochimiothérapie, mettre en évidence une nouvelle structure photoréactive peut ouvrir la voie au développement de toute une famille de nouveaux photosensibilisants.

En plus de sa très grande sensibilité, la DCFH présente l'avantage d'être très peu spécifique dans sa détection des ROS. Ceci est en effet souhaitable, car, bien que l'oxygène singulet soit la principale espèce décrite en photochimiothérapie, le radical hydroyle HO•, le radical superoxyde O₂• ou le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ sont également de puissants oxydants capables d'induire une mortalité cellulaire et ces espèces doivent donc être prises en compte pour évaluer le

potentiel thérapeutique des photosensibilisants. En revanche, la sensibilité de la DCFH est différente vis-à-vis de ces différents oxydants, et elle est malheureusement différente de la sensibilité des substrats biologiques (1^1O_2 par exemple, très actif sur les cibles biologiques, n'oxyde que faiblement la DCFH).

En résumé, l'objectif est d'adapter ou de mettre au point un test de photoréactivité ayant les caractéristiques suivantes :

- Rapidité et simplicité de mise en œuvre
- Grande sensibilité à tous les ROS toxiques
- Conditions de réalisation tenant compte des futures conditions d'utilisation : pH et température physiologiques, prise en compte des interactions avec les constituants du sérum
- Possibilité de tester toutes les longueurs d'onde
- Possibilité de tester des molécules de structures très différentes ou non déterminées.

Pour satisfaire aux critères énoncés ci-dessus, nous avons décidé de modifier les conditions opératoires de la méthode publiée par le laboratoire¹⁸⁰ de la manière suivante :

- Fixation de la température (30°C) de réaction au moyen du dispositif dédié du spectrofluorimètre Varian.
- Fixation du pH à 7,2 au moyen d'un tampon phosphate plus concentré (250 mmol/L), de manière à compenser l'alcalinisation de la solution liée à l'utilisation de soude pour transformer la DCF-DA en DCFH, ainsi que les variations de pH éventuelles, liées au caractère acido-basique des produits testés.
- Mise en contact du photosensibilisant avec du sérum (10% FCS) avant l'irradiation, pour que le test rende au mieux compte de la photoréactivité du PS dans des conditions « biologiques ».
- Ajout de la DCFH après l'irradiation du photosensibilisant afin d'éviter sa photo-oxydation directe.
- Réalisation d'un suivi de l'évolution de la fluorescence de la DCF oxydée (pendant 66 min), au lieu d'une mesure unique en fin d'irradiation, pour augmenter la sensibilité de la méthode.

L'établissement de ces conditions opératoires a nécessité quelques séries d'expériences préparatoires que nous ne détaillerons pas car elles ont déjà été décrites¹⁸⁴, et ne présentent pas d'intérêt particulier. Nous allons en revanche commenter les deux derniers points : ajouter le réactif sensé révéler la présence de 1^1O_2 quelques secondes après la réaction photochimique et suivre pendant 1 heure l'évolution de la fluorescence induite peut paraître surprenant lorsqu'on

sait que l' $^1\text{O}_2$ a une durée de vie de quelques microsecondes. L'oxydation directe de la DCFH par l' $^1\text{O}_2$ est matière à débat, mais nous pouvons affirmer qu'elle n'est, au mieux, que faible. L' $^1\text{O}_2$ est en revanche un excellent oxydant des substrats biologiques (cf. *I.D.2.b(1)*), et ces substrats sont présents dans notre milieu réactionnel puisque nous y avons ajouté du sérum. Les radicaux peroxydes, alkoxydes, hydroxydes et superoxydes ainsi formés sont eux très bien détectés par la DCFH. Cette cible chimique est en large excès, mais nous avons observé que la fluorescence de la DCF oxydée augmente fortement et régulièrement pendant 66 minutes après son addition dans le milieu réactionnel. Au-delà de cette période, l'évolution du signal de fluorescence n'est pas différente de celle observée dans une cuve « témoin » non irradiée. Nous avons vérifié que cette fluorescence, due à l'activité des ROS secondaires formés à partir de la production initiale d' $^1\text{O}_2$, était proportionnelle à l'intensité de la réaction photochimique, augmentant avec l'énergie délivrée ou la concentration en photosensibilisant (tant que l'absorbance de la solution ne perturbe pas l'irradiation du PS ou la détection de la DCF).

Il convient de commenter le rôle ambigu du FCS dans cette réaction : il contient non seulement les substrats biologiques subissant l'action oxydante de l' $^1\text{O}_2$, mais contient également des substances capables de piéger les radicaux formés (albumine, vitamine C, vitamine E, NAD(P)H, glutathion...). Tous ces antioxydants biologiques participent au « pouvoir antioxydant » du sérum, et la DCFH a d'ailleurs été utilisée dans le but d'évaluer ce potentiel antioxydant¹⁷⁷. Dans ce cadre, nous avons vérifié empiriquement que le FCS, facilement disponible, n'inhibe pas le développement des réactions d'oxydo-réductions suivant l'irradiation du photosensibilisant. Nous ne rentrerons pas dans le détail de ce qui différencie ce sérum d'autres types de sérum : cela constitue en soit un autre projet de recherche, qui est mené en parallèle dans le laboratoire. Etant donné la diversité des composants du FCS, et la complexité de leur action, il était indispensable d'utiliser le même lot pour toutes les manipulations.

La dernière remarque concerne l'impact potentiel de la lumière d'excitation du spectrofluorimètre : sachant qu'une photoréaction a été décrite avec la DCFH, il faut s'assurer que le processus de mesure de la fluorescence ne modifie pas le signal mesuré. Nous avons donc vérifié que les flashes (0,1 sec) d'excitation à 488 nm ($\pm 2,5$ nm) générés par le spectrofluorimètre n'avaient pas le même effet que les irradiations plus puissantes réalisées au laser ou avec des lampes filtrées¹⁸³ : allonger la durée des flashes, réaliser une mesure toutes les 10 secondes, toutes les 2 minutes ou toutes les 10 minutes ne modifie pas la fluorescence détectée (données non présentées).

Le test utilisant la DCFH s'est montré parfaitement efficace pour quantifier simplement *in vitro* la photoréactivité d'un composé. Nous avons tout de même mis au point un autre test, utilisant du luminol, au cas où une série de composés n'aurait pas pu être testée avec de la DCF, dans le cas notamment de propriétés de fluorescence trop proches de celle de la DCF. Le test au luminol présente l'avantage de ne pas requérir obligatoirement de FCS : il est donc possible d'évaluer l'impact du sérum sur la photoréactivité. Il a en revanche l'inconvénient de devoir être réalisé à un pH très alcalin (12,4), peu pertinent en biologie.

Ces tests ont l'avantage, par rapport à la détermination physique du rendement de production en oxygène singulet, d'être simples, réalisés dans des conditions adaptées à des applications en biologie, et d'être sensibles à toutes les espèces oxydantes susceptibles d'engendrer des dommages cellulaires. Il est donc possible d'identifier les composés qui doivent être testés sur cultures cellulaires, et l'obtention d'un score permet même de choisir les composés à tester en priorité. Malgré tout, il s'agit de mesures indirectes, sensibles à tous les facteurs qui peuvent modifier la fluorescence de la cible oxydée, et dont la sensibilité vis-à-vis des différents ROS n'est bien sûr pas parfaitement superposable à celle des cellules cancéreuses. De même, un composé incapable de pénétrer dans une cellule, que ce soit par simple diffusion, par captage ou pinocytose, par exemple du fait d'une agrégation, n'induirait aucune phototoxicité, aussi bon producteur de ROS soit-il. Les tests de photoréactivité représentent donc une étape préalable et complémentaire aux tests de phototoxicité cellulaire.

La photoréactivité peut être très différente en fonction du solvant utilisé²⁵, et un composé qui ne serait photoréactif que dans un solvant incompatible avec une utilisation clinique, tel le benzène, n'aurait aucun avenir en tant que médicament. De ce fait, toutes les structures non photoréactives en présence de sérum sont éliminées. Le laboratoire possède un assortiment de lasers, dont deux lasers accordables qui permettent d'irradier les solutions à une longueur d'onde donnée (au nanomètre prêt pour la plage de longueurs d'onde utilisables en PDT allant de 620 à 1100 nm), avec une puissance facilement réglable et mesurable. Cela permet, pour les tests de production de ROS et pour les tests ultérieurs sur cellules ou *in vivo*, de comparer les longueurs d'onde et les régimes d'irradiation en se plaçant dans des conditions équivalentes à celles qui seront utilisées en clinique, contrairement aux travaux réalisés avec des lampes dont la lumière est filtrée, dans lesquels plusieurs heures d'irradiation sont parfois nécessaires, ce qui induit des artefacts dus aux variations de température, à l'oxygénation...

Les structures photoréactives sont ensuite testées sur des cellules en culture. Comme nous l'avons vu (cf. *I.B*), un photosensibilisant doit pouvoir pénétrer les cellules (ou au moins leurs

membranes), ne doit pas être toxique à l'obscurité, et induire une forte phototoxicité après irradiation à une longueur d'onde adaptée. Un premier test est réalisé dans des conditions standards en termes de doses (0 – 10 µg/mL si le PS est disponible en quantité suffisante) et de temps d'incubation (2 heures). Si la phototoxicité induite est forte par rapport à la toxicité non spécifique en absence de lumière, il est nécessaire de déterminer le meilleur moment pour effectuer l'irradiation. Dans le cas où le composé est suffisamment fluorescent, il est possible de visualiser son incorporation en observant au microscope l'évolution de sa fluorescence dans des cellules en culture et donc de déterminer le délai optimal entre ajout du PS et irradiation pour les tests de phototoxicité. Si la fluorescence du composé n'est pas exploitable, le test de phototoxicité est répété avec différents délais entre ajout du photosensibilisant et irradiation pour déterminer la DL50 optimale. L'observation de la fluorescence intracellulaire des photosensibilisants en fonction du temps permet d'évaluer sa cinétique de captation. Elle permet également de connaître la localisation du PS dans la cellule et son évolution. Dans tous les cas, plusieurs tests de phototoxicité sont réalisés en faisant varier les temps d'incubation et éventuellement les solvants, les longueurs d'onde et les régimes d'irradiation. Comparer les résultats des tests de phototoxicité et la localisation cellulaire correspondante à un temps donné peut permettre d'optimiser chimiquement un composé pour favoriser une localisation particulière. Si une fluorescence intra-nucléaire est détectée, ce qui est rare, on s'intéressera particulièrement à la génotoxicité, grâce à des tests adaptés à la PDT, comme le test dit "des comètes"¹⁰¹. Les composés toxiques devront être modifiés chimiquement pour diminuer leur affinité pour leur cible cellulaire. Les composés photoréactifs mais incapables de diffuser ou d'être captés par les cellules devront également être modifiés, le plus souvent pour augmenter leur liposolubilité. Seuls les composés purs, non toxiques et très phototoxiques sont testés chez l'animal.

Pour être un photosensibilisant efficace, un composé doit pouvoir être résorbé après administration, ne pas subir de biotransformations intenses, notamment hépatiques (cf. "effet de premier passage"), ne pas induire de toxicité générale et pouvoir pénétrer et être retenu préférentiellement par les tissus tumoraux. Les modèles tumoraux utilisés par le laboratoire (HT29, A549, F98...), ont été choisis parce qu'ils étaient particulièrement résistants, ce qui permet de ne sélectionner que les photosensibilisants les plus performants, et parce qu'ils étaient utilisables aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Ainsi, si un photosensibilisant n'induit pas la destruction d'une tumeur greffée chez la souris alors qu'il était fortement phototoxique vis-à-vis des mêmes cellules en culture, cela signifie que le problème est lié aux conditions expérimentales chez

l'animal (résorption et biodisponibilité, biotransformations, concentration intra-tumorale insuffisante au moment de l'irradiation...). Les tests de pharmacocinétiques *in vivo*, effectués au moyen du spectrofluorimètre à fibre ou par extraction et CLHP, sont complémentaires et permettent à la fois de détecter des caractères indésirables, tels que la formation de métabolites, une élimination lente, une photosensibilisation cutanée durable, et d'orienter le choix de l'indication thérapeutique la plus adaptée. Il ne serait par exemple pas envisageable d'utiliser pour le traitement des gliomes un photosensibilisant incapable de franchir la barrière hémato-méningée.

La première étape des tests *in vivo* consiste donc à vérifier que le composé testé n'est pas toxique pour les animaux. Nous réalisons donc une étude de la toxicité aiguë après injection (IP ou IV) du PS, puis un suivi de sa résorption et de son élimination, si possible grâce au spectrofluorimètre à fibre. La suite de l'étude de pharmacocinétique fait intervenir des souris "nude" auxquelles ont été greffées des tumeurs sous-cutanées. Ces tumeurs sont dites non spécifiques, car elles ne représentent aucun cancer humain particulier. Ces mesures de fluorescence ne sont pas quantitatives, mais permettent de suivre l'évolution de la concentration en PS, et d'observer les éventuelles modifications spectrales liées à l'apparition de métabolites. Le calcul des rapports de concentrations permet de déterminer la sélectivité du photosensibilisant (le cas idéal serait de n'observer une fluorescence que dans le tissu tumoral), et les meilleurs délais entre injection et irradiation, qui seront utilisés pour les tests d'efficacité thérapeutique.

Pour avoir une idée plus précise de la répartition du PS dans les différents organes de la souris, et pouvoir ainsi commencer à réfléchir aux indications qui pourraient bénéficier d'une PDT avec le produit testé, il est aussi nécessaire de suivre l'évolution de la concentration du PS dans d'autres organes. Notons que pour les produits non fluorescents, ou pour effectuer un dosage précis du photosensibilisant et de ses métabolites éventuels dans les différents organes, il est possible d'effectuer une analyse par CLHP, après avoir mis au point une méthode d'extraction et de séparation adaptée^{157,185}.

Les tests d'efficacité thérapeutique sur des tumeurs sous-cutanées chez la souris "nude" ont pour but de prouver que le composé testé peut pénétrer le tissu tumoral et le détruire après une irradiation appropriée. Ce modèle permet, par suivi de la croissance tumorale après traitement que l'on compare à celle de souris non traitées, d'identifier les composés ayant la meilleure activité anti-tumorale et de déterminer les meilleurs paramètres de traitement. Ce modèle de tumeurs sous-cutanées chez la souris "nude" a été préalablement appliquée à l'interprétation des données de radiothérapie et a été décrite par Dutreix *et coll.*¹⁸⁶. L'objectif n'est pas de guérir les

animaux, mais d'identifier en seulement 2 à 3 semaines les PS et les paramètres thérapeutiques ayant le meilleur impact sur la croissance tumorale.

Les composés ayant passé avec succès toutes les étapes précédentes sont de bons candidats à un développement industriel. A cette étape, il faut choisir un partenaire industriel en mesure de mettre le médicament sur le marché, et déterminer avec lui la meilleure stratégie pour le dépôt de brevet s'il n'est pas intervenu avant, et la suite des manipulations, adaptées à l'indication thérapeutique la plus pertinente.

En fonction de l'indication choisie, le laboratoire développe ensuite des modèles organo-spécifiques, en cherchant à modéliser au mieux chez l'animal le cancer que l'on souhaite traiter chez l'homme, en termes de localisation et de morphologie tumorale, de résistance, d'immunogénicité...

Les méthodes utilisées sont le fruit d'une longue réflexion et ont donc pour but une sélection efficace et rapide des photosensibilisants. Nous allons maintenant analyser les résultats que nous avons obtenus en fonction des considérations ci-dessus.

SIM01 et gliomes

Le Laboratoire de Photobiologie des Cancers a été l'un des premiers au monde à souligner l'intérêt de la photochimiothérapie pour le traitement des tumeurs cérébrales¹⁸⁷. L'équipe a développé à partir des travaux de P.J. Müller *et coll.*

un applicateur intra-cérébral utilisable chez l'homme (cf. *Figure 76*), permettant l'irradiation lumineuse du lit tumoral après résection. Le Pr T. Patrice s'est orienté vers l'utilisation de l'acide δ -aminolévulinique (cf. *I.B.I.c*(4)), une pro-drogue entraînant la synthèse de protoporphyrine IX de manière beaucoup plus intense dans les cellules cancéreuses. Cette approche, théoriquement séduisante, n'a pas abouti, du fait de l'hétérogénéité de concentration en photosensibilisant obtenue¹⁸⁸. Durant la même période, d'autres équipes se sont attachées à étudier l'efficacité thérapeutique



Figure 76: Dispositif d'irradiation intra-cérébrale mis au point par le Laboratoire de photobiologie des cancers.

des photosensibilisants de première génération. Les travaux de A.H. Kaye (Melbourne, Australie) sur le traitement des gliomes par la photochimiothérapie ont été publiés et ont confirmé ceux de P.J. Müller¹⁸⁹ (Toronto, Canada) ou de S. Kaneko (Sapporo, Japon) quant aux bénéfices importants que les patients peuvent attendre de cette nouvelle approche thérapeutique : S.S. Stylli et A.H. Kaye rapportent 25% de survie à 85 mois chez des patients atteints de glioblastomes alors que la médiane de survie rapportée avec d'autres thérapeutiques est inférieure à 15 mois^{126,128}. Les photosensibilisants utilisés étant à la fois retenus préférentiellement par le tissu tumoral et fluorescents, il est possible de réaliser un diagnostic topographique peropératoire par fluorescence pour permettre des résections chirurgicales plus complètes en révélant les îlots néoplasiques dans le tissu sain¹⁹⁰.

Le Pr Patrice a choisi à la lumière des résultats publiés par H. Kostron¹⁹¹, de développer, en collaboration avec le Pr G. Simonneaux et l'UMR CNRS n°6509, un analogue de la m-THPC présentant une pharmacocinétique plus brève et donc des effets secondaires et des temps d'hospitalisation moindres^{155,192} ainsi qu'une meilleure capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique. Ce travail a abouti à la synthèse de SIM01 dont le laboratoire a fait l'évaluation *in vitro*, *in vivo*, et dont la capacité à franchir la barrière hémato-encéphalique a été démontrée⁶. Par ailleurs ce composé est dépourvu de mutagénicité sous flux lumineux¹⁰². Les premiers essais du SIM01 au laboratoire ont été réalisés sur des cellules C6 *in vitro* ou greffées dans le tissu

cérébral chez le rat⁶. Nous avons par la suite voulu réaliser l'évaluation de la molécule SIM01 sur le modèle F98. Ce modèle orthotopique de gliome chez le rat Fisher est connu pour sa résistance aux traitements conventionnels (chimiothérapie, radiothérapie), sa très faible immunogénicité (contrairement à d'autres modèles chez le rat notamment) et est considéré comme un des meilleurs modèles de gliome ; les premiers essais d'immunothérapie adoptive et de thérapie par capture des neutrons de bore sur ce modèle ont été infructueux^{160,161}.

Parallèlement, la recherche sur l'anti-angiogénèse tumorale est une voie prometteuse¹⁹³⁻¹⁹⁵ en plein essor, et 18 composés ciblant les cellules endothéliales ou les facteurs pro-angiogéniques étaient en cours d'évaluation clinique au moment où nous élaborions ce protocole. L'utilisation d'inhibiteurs de protéine kinases, en particulier ceux ciblant le VEGFR, est très prometteuse. D'un autre côté, la photochimiothérapie possède à la fois un effet anti-angiogène direct et une activité anti-cancéreuse propre. L'intérêt de l'association de ces deux stratégies dans la démarche thérapeutique anti-cancéreuse est triple:

- D'une part, l'action des anti-VEGFR prévient la formation des nouveaux vaisseaux, mais une action directe complémentaire sur les vaisseaux tumoraux déjà formés, que la PDT peut avoir¹⁹⁶, apparaît souhaitable pour un contrôle plus efficace de la croissance tumorale¹⁹⁷.
- D'autre part l'objectif des traitements anti-angiogéniques est de stopper le développement tumoral en privant la tumeur de la vascularisation indispensable pour dépasser un volume de quelques millimètres cubes¹⁹⁸ ; toutefois l'association avec un traitement ciblant directement les cellules cancéreuses est indispensable pour espérer une élimination du processus tumoral¹⁹⁹.
- La photochimiothérapie induit principalement une mort cellulaire immédiate par nécrose, ce qui stimule la production de facteurs pro-angiogènes et peut conduire dans certains modèles à une revascularisation du site traité²⁰⁰; ce phénomène peut favoriser une reprise tumorale et il apparaît donc souhaitable de l'endiguer, au moyen d'anti-angiogènes.

Notons enfin que, du fait de leur mode d'action, les anti-VEGFR sont indiqués dans les processus tumoraux débutants, de même que la photochimiothérapie qui est particulièrement indiquée pour les tumeurs non encore métastasées et de faible volume. Une stratégie associant les deux traitements est donc parfaitement cohérente. Cette stratégie n'avait encore jamais été appliquée au traitement des gliomes, mais s'était montrée efficace sur d'autres modèles tumoraux²⁰¹⁻²⁰³. L'objectif est de démontrer un effet au moins additif sinon synergique entre ces médicaments et la photochimiothérapie. Nous avons choisi le STI571 (ou Imatinib, ou Glivec[®]), ainsi que le thalidomide (ou alpha-phthalimidoglutarimide), tous deux en cours d'évaluation clinique pour le

traitement des gliomes récurrents^{193,204,205}. Le STI571 peut agir directement sur les cellules tumorales, ou inhiber leur vascularisation par action sur le VEGF²⁰⁶. Le thalidomide agit directement sur la vascularisation^{194,207} notamment à travers son action sur le VEGF.

La phase préliminaire de notre travail a consisté à vérifier *in vitro* que le thalidomide ou le Glivec[®] ne perturbait pas la pénétration du SIM01, ni sa phototoxicité sur les cellules utilisées pour la greffe tumorale. Une fois ce point validé, nous avons voulu confirmer les données de la littérature concernant la croissance de la tumeur F98. La greffe tumorale réussit dans presque 100% des cas (cf. *Tableau 11, p 129*), et une injection de 10⁴ cellules entraîne la mort de l'animal en environ 20 jours en l'absence de traitement, comme la littérature permettait de le prévoir^{208,209}. En revanche, l'analyse histologique de la tumeur a révélé que ce modèle n'était pas aussi bien adapté que prévu à l'étude envisagée : la faiblesse de la vascularisation (peu de néo-vascularisation et pas de prolifération endothélio-capillaire), associée à une croissance inattendue en périphérie des vaisseaux, entraînant une invasion de la leptoméninge, constitue un gros inconvénient. Cet aspect n'était pas décrit dans la bibliographie^{160,161,208-212}, et ne l'a été que dans un article publié après le choix du modèle²¹³. Nous avons pu confirmer par fluorescence qu'en dépit de cette faible vascularisation, très nettement inférieure à celle observée avec le modèle C6 précédemment utilisé dans le laboratoire, le SIM01 parvenait dans le tissu tumoral avec une certaine sélectivité. En revanche, les traitements photochimiques se sont avérés beaucoup plus toxiques que prévus. Cette toxicité est probablement à mettre en relation avec l'efficacité même de la photochimiothérapie. En effet, les analyses histologiques ont révélé une prolifération tumorale en périphérie des vaisseaux à distance du nodule tumoral principal, avec parfois une invasion de la leptoméninge en regard de l'hémisphère cérébral opposé. Lorsque l'intensité du traitement est forte, il est probable que la nécrose induite soit beaucoup trop large, avec un effet délétère sur tous les vaisseaux sanguins normaux autour desquels les cellules tumorales se sont développées. L'irradiation lumineuse étant réalisée au niveau du site de greffe tumorale, il est également probable que l'activation lumineuse du photosensibilisant est incomplète dans les zones très distantes (leptoméninge de l'hémisphère opposé), ce qui limite l'efficacité thérapeutique dans le cas des traitements moins intenses.

Récemment, une équipe a réussi à démontrer l'intérêt d'une association entre PDT et traitement anti-angiogénique sur un modèle de glioblastome chez la souris²¹⁴. Cette équipe ne fait pas état de problèmes liés à un œdème cérébral, mais indique qu'elle n'a mis en évidence aucune nécrose tumorale. Ceci est assez surprenant pour un traitement par PDT où les deux phénomènes coexistent en général et dans le cas particulier du traitement des gliomes humains, mais peut être

lié à l'utilisation de doses relativement faibles (2 mg/kg de Photofrin, alors que la barrière hémato-méningée limite la diffusion sa diffusion et irradié avec une fluence de 80 J/cm² pour l'irradiation). Si la mort cellulaire induite est exclusivement de l'apoptose, il ne devrait pas y avoir d'inflammation ni de stimulation secondaire de la néo-angiogénèse, mais cette étude fait tout de même état d'une amélioration significative de l'inhibition de la croissance tumorale et de la durée de vie des animaux grâce au traitement anti-angiogène associé à la PDT.

Des obstacles dans le développement industriel du SIM01 et l'arrivée de nouveaux photosensibilisants nous ont amené à choisir de ne pas mettre en place un modèle de gliome plus adapté à l'évaluation de la stratégie thérapeutique impliquant le SIM01 et des inhibiteurs de la vascularisation tumorale, mais plutôt d'essayer d'identifier dans un premier temps de nouveaux photosensibilisants, possédant éventuellement cette double action vis-à-vis des cellules tumorales, que nous testerons dans un second temps sur un nouveau modèle de gliome, dont la vascularisation et la capacité à former des nouveaux vaisseaux seront plus proches de celles des gliomes humains. Cette démarche nous a conduits à tester les dérivés d'indirubines.

Cyanines et phthalocyanines

La photoréactivité des cyanines a tout d'abord été exploitée pour la constitution de plaques photographiques ; ces composés sont utilisés aujourd'hui pour réaliser la surface photosensible des CD-R et DVD- R ("Compact Disc" et "Digital Versatile Disc" inscriptibles). Leur utilisation en photochimiothérapie est plus récente que celle des phthalocyanines⁵¹, et a été proposée pour la destruction de cellules leucémiques²¹⁵, de virus enveloppés²¹⁶, ou le traitement de cancers cutanés²¹⁷. L'originalité de ces composés réside notamment dans le fait qu'ils sont pour la plupart chargés positivement lorsqu'ils sont ionisés, contrairement aux autres photosensibilisants formant des ions négatifs. Cette particularité explique leur localisation originale, à l'intérieur des mitochondries²¹⁸. Jusqu'à présent, de nombreuses structures ont été décrites (imida-, indo-, krypto-, oxa-, rhodo-, et thiacyanines), mais aucune n'est aussi performante que les porphyrines en photochimiothérapie. Parmi les cyanines que nous avons testées, les meilleures photoréactivités ont été observées avec des longueurs d'onde courtes (3BS/PE2543 irradié à 428 nm, KF 711 à 426 nm, MOD 302-2 à 561 nm), et les composés absorbant la lumière rouge ont eux une production de ROS décevante (1,08 pour le 2RS/PE2449, 0,9 pour le MOD 395-2...). La collaboration entre l'Université de Fribourg et notre laboratoire a tout de même permis de parvenir à la synthèse de cyanines originales, photoréactives et absorbant la lumière rouge, le MOD 216 et le MOD 222. Ces 2 composés sont des dérivés du KF 711 ; les modifications chimiques effectuées ont permis de décaler vers le rouge le pic d'absorption tout en conservant la photoréactivité. De plus, l'augmentation de l'encombrement stérique a permis de supprimer la

forte toxicité observée avec le KF 711 ; il sera sans doute intéressant dans l'avenir de déterminer sur quelle cible cellulaire se fixe le KF 711 pour exercer cette toxicité : cela pourrait conduire à terme à la découverte de nouvelles substances actives, mais cela sort du cadre de la photochimiothérapie. Le MOD 222 a donné de bons résultats de phototoxicité, avec une DL50 de 2µg/mL après irradiation à 656 nm, sans toxicité associée. Malgré tout cette structure est relativement instable en présence de protéines, ce qui se traduit par une diminution de plus de 50% de l'intensité des pics d'absorption en présence de FCS, et nécessitera des améliorations chimiques avant de pouvoir entrer en phase de test *in vivo*. La formation d'un plateau à 755 nm en présence de FCS sur le spectre d'absorption du MOD 222 a été identifiée par le Dr D. Moigno comme la formation d'agrégats J, une organisation de type cristalline des cyanines, aux propriétés originales exploitées pour la photographie, l'optique non linéaire ou les nanotechnologies. Les tests que nous avons effectués n'ont pas permis de mettre en évidence un intérêt de ces agrégats en photochimiothérapie. En ce qui concerne les structures très photoréactives mais absorbant des longueurs d'onde courtes, telles le 3BS/PE2543, les études futures viseront à établir si cette photoréactivité peut être exploitée avec une excitation bi-photonique, dont la longueur d'onde serait plus adaptée aux traitements *in vivo*.

L'utilisation des phthalocyanines comme photosensibilisants a été décrite depuis une vingtaine d'années^{38,219}. En dépit de premières études décevantes, principalement du fait d'une mauvaise solubilité, des phthalocyanines amphiphiles ont donné des résultats prometteurs²²⁰. Ces composés ont l'avantage d'être plus stables que beaucoup de porphyrines naturelles, et d'absorber des longueurs d'onde plus longues (650-750 nm). Les phthalocyanines métallées semblent particulièrement indiquées pour les applications en photochimiothérapie, notamment les tétrasulfonates de phthalocyanine de zinc²²¹, qui ont fait l'objet d'études sur des tumeurs spontanées dans le domaine vétérinaire²²². C'est à la lumière de ces résultats que le Dr D. Moigno a décidé de tester différentes phthalocyanines initialement destinées à être utilisées comme colorants, mais dont la sensibilité à la lumière ne permettait pas leur utilisation. Les premiers composés testés ont montré une instabilité en présence de sérum se traduisant par des modifications spectrales soit immédiates, comme par exemple une perte de 40% de l'intensité du pic d'absorption pour le BAE 8507, probablement dues à des phénomènes d'agrégation ou de complexation, soit après 24 heures, comme un décalage de 54 nm du pic d'absorption pour le BAE 8506, évoquant une hydrolyse de la structure. De telles modifications posent problème, puisqu'elles sont susceptibles de conduire, après injection de ces produits, à une diminution de leur biodisponibilité, à une formation d'embolies (cf. injection intra-veineuse), à la formation de

produits non photoréactifs mais potentiellement toxiques. Notons que les produits stables en présence de sérum peuvent quand même subir *in vivo* des biotransformations hépatiques. Au vu des premiers résultats obtenus, Le Dr D. Moigno a décidé de synthétiser de nouvelles structures en essayant de parvenir à une meilleure stabilité en présence de protéines, une plus grande lipophilie et une plus forte absorption dans le rouge. Conformément à la volonté du Dr D. Moigno, nous n'avons pas présenté ici la structure chimique des composés non encore brevetés. Nous pouvons malgré tout indiquer que les phthalocyanines métallées se sont avérées les plus performantes. Différents métaux ont été intégrés, comme le magnésium, le zinc, l'aluminium, mais nos résultats ont confirmé que les phthalocyanines de zinc donnait les meilleurs résultats en terme de phototoxicité. La comparaison entre les résultats des tests de photoréactivité et de phototoxicité cellulaire, certains composés tels les BAE 8506, BAE 8543, BAE 8570, BAE 8579, BAE 9010, BAE 9011 et BAE 9012 ayant de bons scores de production de ROS mais des résultats décevants en termes de phototoxicité, ont amené les chimistes à privilégier les structures lipophiles. Ces résultats sont en accord avec de précédentes études qui ont montré que le degré d'efficacité des phthalocyanines en tant que photosensibilisants était lié à leur degré de lipophilie²²⁰.

Les phthalocyanines que nous avons testées *in vivo* ont tout d'abord fait l'objet d'une étude de toxicité aiguë après administration intra-péritonéale chez la souris. Nous ne présentons pas les résultats ici, car nous n'avons observé que peu ou pas de toxicité aiguë, ce qui est souvent le cas avec les photosensibilisants, du fait de leur mode d'action. Nous avons testé des doses allant jusqu'à 160 mg/kg, soit 8 à 80 fois les doses thérapeutiques envisagées. Au delà de ces doses se posent des problèmes de solubilité et de surconsommation des drogues. Les BAE 8551, 9048 et 9830 n'ont pas induit d'effet toxique. Deux souris sur cinq sont mortes 48 heures après une injection de 160 mg/kg de BAE 8557 ; ces 2 animaux ont présenté un œdème 24 heures après l'injection, et un calcul rénal a pu être observé chez l'une des souris. Aucun effet toxique n'a été observé à cette dose pour les autres animaux ni pour les doses plus faibles pendant les 15 jours d'observation suivant l'injection, ni à l'examen nécropsique. En revanche, les animaux traités avec du BAE 8551 et 8557 ont tous présenté une coloration verte de l'ensemble du corps d'autant plus intense que la dose testée était forte. Cette coloration, apparaissant dans les heures suivant l'injection et perdurant pendant les 15 jours d'observation était particulièrement marquée au niveau du scrotum et des ganglions lymphatiques. Cela indique que la résorption du produit est bonne et rapide, mais que l'élimination est lente et que ces composés sont susceptibles d'induire une photosensibilisation cutanée durable. Associée aux effets thérapeutiques modérés sur les tumeurs greffées aux plus fortes doses testées, cette coloration cutanée sonne le glas du

développement des BAE 8551 et 8557. Le BAE 9048, et son successeur le BAE 9830 ont par contre donné de très bons résultats thérapeutiques sur les tumeurs greffées, en induisant un retard de croissance tumorale y compris avec les plus faibles doses testées (2 mg/kg). De plus un effet photodynamique a pu être observé seulement 30 minutes après l'injection de photosensibilisant. Nous ne sommes pas en mesure de savoir à ce stade si cet effet anti-tumoral est plutôt lié à une localisation tumorale du photosensibilisant ou une localisation vasculaire sans doute importante pour les délais les plus courts.

Le bilan de l'étude concernant les phthalocyanines est très bon : la collaboration entre l'Université de Fribourg et le Laboratoire de Photobiologie des Cancers a permis par étapes successives de sélectionner et d'améliorer les structures chimiques, pour finalement parvenir à de bons candidats à un développement clinique. Il est désormais nécessaire de faire des études cinétiques poussées pour déterminer précisément la répartition et l'évolution de la concentration du BAE 9830 dans les différents organes, mettre en évidence les métabolites éventuels, et à la lumière de ces résultats choisir la meilleure indication thérapeutique. Il s'agira ensuite d'évaluer sur un modèle animal spécifique si la photochimiothérapie avec le BAE 9830 peut procurer un avantage thérapeutique par rapport au traitement de référence pour l'indication choisie.

Radachlorine

En dépit du fait que la chlorine e6 (cf. *I.B.I.c*)(1)(a)) est un photosensibilisant étudié depuis 20 ans²²³, peu d'essais cliniques ont été entrepris jusqu'ici avec ce composé²²⁴⁻²²⁸, et la nécessité de modifier sa structure chimique pour améliorer sa sélectivité et sa liposolubilité est apparue rapidement^{229,230}. La Radachlorine est un mélange de sels de sodium de 3 composés proches, la chlorine e6 (80%), la purpurine 5 (15%) et la purpurine 18 (5%). Ces purpurines sont très photoréactives, mais trop liposolubles pour être administrées seules par voie intra-veineuse sans recours à une forme galénique adaptée. L'idée est ici de mettre à profit la capacité de la chlorine e6 à former des complexes avec les purpurines. Les premières publications concernant la Radachlorine faisaient état d'une pharmacocinétique plus rapide que celle de la chlorine e6 et d'une moindre photosensibilisation cutanée^{231,232}, l'activité photochimique étant, d'après les inventeurs, plus portée par les purpurines que par la chlorine e6. Ces différences nous paraissant étonnantes compte tenu des compositions très proches de ces deux spécialités, nous avons voulu comparer la Radachlorine à la chlorine e6 in vitro puis in vivo. La plupart des caractéristiques observées in vitro étaient semblables dans les deux cas. La forme des spectres d'absorption des 2 composés est très proche, les 3 pics d'absorption principaux se situant aux mêmes longueurs d'onde, à 5 nm près. Des études précédentes ont décrit en détail l'influence des variations de pH^{233,234} et de la présence de FCS²³⁵ sur les spectres d'absorption. La présence de FCS induit des

décalages similaires sur les spectres des deux composés. La stabilité sous flux lumineux est faible dans les deux cas. Nous avons noté l'augmentation d'intensité d'un faible pic d'absorption à 703 nm après irradiation, qui auparavant était à peine détectable, pour la Radachlorine. Les propriétés de fluorescence des deux composés sont extrêmement proches, l'ajout de sérum induisant le même décalage de la fluorescence. Ce point se révèle particulièrement pratique pour le suivi *in vivo* de ces composés. Sur des cellules en culture, ni la Radachlorine ni la chlorine e6 n'ont montré de toxicité. En revanche, la phototoxicité de ces 2 photosensibilisants est excellente. Les expériences menées *in vitro* ne permettaient pas d'espérer de grandes différences *in vivo*. La Radachlorine a été fournie au laboratoire sous forme de solution injectable, et nous n'avons pas eu l'opportunité de tester seules les purpurines 5 et 18. Les résultats obtenus avec les constituants du mélange pris séparément n'auraient probablement pas été plus pertinents que ceux obtenus avec le mélange, tant il est probable que les interactions entre les différents constituants sont essentielles. Cela a été particulièrement décrit pour l'HPD/Photofrin[®] (cf. *I.B.1.a*)), premier photosensibilisant utilisé en clinique, dont les propriétés en photochimiothérapie sont précisément liées à la présence de différents composés chimiquement proches. Notons par ailleurs que des techniques d'analyses sophistiquées (spectroscopie de masse, résonance magnétique nucléaire) ont également permis d'identifier dans les solutions de chlorine e6 pas moins de 11 composés parents²³⁶, formés au cours des processus de synthèse ou de dégradation. Cette relative impureté chimique pose problème lors des démarches de demande de mise sur le marché d'une spécialité pharmaceutique contenant ces substances, car il est nécessaire de démontrer l'innocuité de tous ces composés et de leurs métabolites.

Les données cinétiques obtenues avec la chlorine e6 sur les souris "Swiss" sont cohérentes avec celles obtenues dans d'autres laboratoires^{237,238}. En revanche, l'évolution de l'intensité de fluorescence que nous avons observée au niveau de la tumeur chez les souris "nude" n'était pas différente de celle observée au niveau de la peau, ce qui suggère que la chlorine e6 ne s'accumule pas dans les tumeurs A549. Le pic de concentration est atteint immédiatement après l'injection, ce qui suggère que la chlorine e6, reste essentiellement dans le compartiment vasculaire. Ceci est cohérent avec les précédents travaux qui ont montré que la chlorine e6 se lie fortement aux protéines plasmatiques²³⁴ et devient plus hydrophobe lorsque le pH diminue²³³ mais est hydrophile à pH neutre. La fluorescence de la Radachlorine *in vivo* a atteint un maximum entre 1 et 3 heures après l'injection suivant les organes, et était à peine détectable 24 heures après l'injection. La Radachlorine semble moins rapidement éliminée des tumeurs A549 que des tissus sains, puisque la fluorescence observée dans la tumeur croît entre 30 minutes et 2 heures après l'injection, et à partir de deux heures après l'injection cette fluorescence reste supérieure à celle

observée dans la peau ou le tissu musculaire. Il semble donc que le mélange de purpurines et de chlorure e6, même si celle-ci est majoritaire, a des propriétés différentes de celles de la chlorure e6 seule. Les meilleurs rapports $\frac{\text{radachlorine}}{\text{chlorure e6}}$ et $\frac{\text{radachlorine}}{\text{purpurines}}$, ne sont que de $1,95 \pm 0,29$ et $1,45 \pm 0,14$ respectivement, mais sont obtenus seulement 7 heures après l'injection de Radachlorine.

Aux doses de photosensibilisant utilisées, aucun effet toxique n'a été détecté chez les animaux inclus dans l'expérimentation. Le délai entre injection et irradiation a une forte influence sur l'effet photochimique observé dans le cas des deux photosensibilisants. Des délais compris entre 5 à 7 heures, correspondants aux moments où la sélectivité d'accumulation de la Radachlorine est la meilleure, semblent optimaux, puisque qu'une réduction d'au moins 75% du volume tumoral est observée. Des délais plus courts (1 ou 3 heures) permettent d'obtenir également un effet photochimique, mais associé à une paralysie durable du membre traité, à mettre en relation avec une sélectivité insuffisante du traitement dans ces conditions.

Des délais de 6, 7 ou 8 heures entre injection de chlorure e6 et irradiation n'ont pas permis d'observer d'effet thérapeutique significatif, en dépit d'un rapport $\frac{\text{radachlorine}}{\text{chlorure e6}}$ de 2,56 mesuré 8 heures après l'injection. En revanche, une irradiation intervenant 3 heures après l'injection de 20 mg/kg de chlorure e6 permet d'obtenir une réduction complète du volume tumoral, mais cet effet s'accompagne d'une paralysie du membre traité chez tous les animaux, et pour une des souris traitées, d'un état de choc (prostration, hypothermie, déshydratation). Comme pour l'étude pharmacocinétique, cette chute rapide de l'effet de la chlorure e6 est sans doute à mettre en relation avec la forte liaison de cette molécule aux protéines plasmatiques, et de son hydrophilie à pH neutre. De ce fait, le photosensibilisant reste essentiellement dans le compartiment vasculaire²³⁸, ce qui explique une chute rapide de l'effet photochimique lorsque le délai entre injection et irradiation augmente, et une faible spécificité des dommages induits. Dans le cas des deux drogues, les paralysies observées avec les délais les plus courts sont probablement dues à une nécrose s'étendant jusqu'aux fibres nerveuses ; les paralysies transitoires sont quant à elles probablement dues à une compression nerveuse liée à l'inflammation induite.

Le travail que nous avons réalisé démontre donc l'intérêt de l'association de la chlorure e6 avec des dérivés plus lipophiles, pour permettre un meilleur effet thérapeutique et une meilleure sélectivité tumorale. Les études ultérieures devront se focaliser sur la détermination des paramètres optimaux sur des modèles organo-spécifiques adaptés aux futures indications. L'augmentation des doses laser ne devrait pas avoir de gros effets, du fait du "photobleaching"

rapide de ces composés (cf. *V.A.I.b*)(2)(c)). Le délai entre l'injection du photosensibilisant et l'irradiation nous paraît être le paramètre le plus important à déterminer pour chaque indication de manière à parvenir à la destruction tumorale la plus ciblée. Peu d'études en photochimiothérapie ont été réalisées avec le modèle A549 de cancer du poumon^{239,240}, en dépit de résultats prometteurs obtenus par H. Kato dans un essai clinique de phase II réalisé avec un dérivé de la chlorine e6²²⁵. Si la sélectivité d'accumulation et l'efficacité de la Radachlorine dans les tumeurs du poumon est confirmée dans des études ultérieures sur des modèles orthotopiques de cancer chez l'animal puis chez l'homme, la photochimiothérapie utilisant cette molécule pourrait devenir une solution thérapeutique intéressante. En effet, les cancers du poumon sont la première cause de mortalité par cancer aux Etats-Unis¹³⁰, et 40% d'entre eux sont trop développés au moment du diagnostic pour qu'une résection chirurgicale complète soit envisageable²⁴¹.

En parallèle, un travail de recherche visant à modifier chimiquement la molécule, et ajouter des substituants de manière à augmenter sa lipophilie et sa stabilité sous flux lumineux pourrait donner naissance à d'excellents photosensibilisants.

Indirubines

Le Laboratoire Cycle Cellulaire, de la station biologique CNRS de Roscoff (France), en collaboration avec l'Institut d'Hématologie de Tianjin (Chine) et le Département de Pharmacie de l'Université d'Athènes (Grèce) a élaboré une série de molécules dérivées d'indirubines, après avoir identifié que cette classe de composés modifiait le cycle cellulaire en agissant sur des récepteurs tyrosine kinase. Plusieurs modifications chimiques de ces dérivés ont été envisagées, dans le but d'augmenter leur profil de sélectivité, leur effet inhibiteur et leur solubilité. En particulier, les modifications ont été effectuées sur les positions 3', 5' et 6' des cycles indoles. Plus récemment, des modifications ont été réalisées en position 7, qui ont donné naissance à des composés inactifs sur les kinases, mais capables d'induire une mort cellulaire indépendante des caspases^{242,243}. Parmi les composés synthétisés, l'indirubine 3'-oxime, et les 5BIO, 6BIO, AB187, AB194 ont montré une activité intéressante sur les kinases CDK5 et GSK-3, comme le prévoyait les modélisations qui prédisaient une affinité de ces composés pour la poche de fixation de l'ATP.

La kinase GSK-3 étant impliquée dans la mort cellulaire programmée et la tumorigénèse²⁴⁴, l'activité inhibitrice exprimée par l'indirubine 3'-oxime et les MLS2063, MLS2050, MLS2052 pourrait être exploitée dans une stratégie anticancéreuse ciblant différents processus du développement tumoral. Les inhibiteurs de GSK-3 sont également développés pour le traitement du diabète ou comme anti-inflammatoires. Dans la maladie d'Alzheimer, l'agrégation de la

protéine Tau (protéine d'association aux microtubules) est directement reliée à l'hyperphosphorylation de deux enzymes, CDK5 et GSK-3. GSK-3 est 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 lithium²⁴⁵. L'association d'activités anti-CDK5 et anti-GSK-3 pourrait donc 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 absorbant également fortement la lumière visible, il a paru intéressant d'étudier la photoréactivité potentielle de ces dérivés dans le but d'identifier ceux qui auraient à la fois un potentiel anticancéreux par l'intermédiaire de l'action sur les kinases, et seraient dépourvus d'effets secondaires indésirables induits par la lumière. On peut par ailleurs envisager une utilisation des indirubines fortement photoréactives en photochimiothérapie. Enfin, le dernier objectif de notre travail a été d'identifier parmi les différents dérivés d'indirubines ceux qui inhibaient déjà significativement en absence de lumière la croissance de cellules tumorales et dont l'efficacité pouvait être encore améliorée par une irradiation appropriée. Ces composés pourraient ouvrir la voie à une nouvelle démarche en photochimiothérapie, utilisant des effets anticancéreux complémentaires d'une seule molécule, stable (par opposition aux macromolécules de synthèse associant 2 composés). Nous avons également recherché, comme avec les autres composés, une relation entre la structure moléculaire et la photoréactivité des molécules de cette série de composés relativement homogènes. Toutes les d'indirubine testées absorbent la lumière entre 420 et 600 nm, et leur maximum d'absorption se situe entre 481 et 535 nm. Ces valeurs sont en accord avec ce qui a été décrit précédemment²⁴⁶ 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 la bis-indigotine, et les MC131, MLS2060, MLS2064, MLS2050, MC136 et AB194. Concernant l'apparition de nouveaux pics d'absorption, le MC118, contrairement au MC131, ne montre pas de nouveau pic après l'addition de FCS, et 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 l'analogue du MC136 avec un brome en position 6 n'est pas disponible. Le manque de relation 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 bromées²⁴⁶. La fluorescence est faible mais détectable pour 12 composés et non détectable pour les 17 autres. Des changements de fluorescence ont été notés après addition de FCS : une fluorescence devient détectable pour 5 des 17 indirubines non- fluorescentes sans FCS. Après

l'addition de FCS, l'intensité de la fluorescence augmente pour 12 composés et diminue pour 4 autres, suggérant encore que l'affinité des indirubines pour les substances présentes dans le sérum est assez forte pour influencer leur physicochimie. Les indirubines fluorescentes en présence de FCS produisent plus de ROS que les autres ; il n'a en revanche pas été possible d'établir une relation entre structure et photoréactivité. Par comparaison avec les autres composés utilisés en routine comme photosensibilisants en photochimiothérapie, les indirubines sont de relativement faibles producteurs de ROS in vitro s'échelonnant de 219 (MC131) 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 avec le test au luminol. Cependant, étant donné l'exploitation potentielle des effets cytotoxiques et photocytotoxiques en association, il paraît intéressant d'étudier davantage la phototoxicité de ces indirubines, et d'envisager de nouvelles synthèses dans ce but. 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 avec une incubation de 2 heures et une estimation de la viabilité cellulaire 24 heures après le traitement. En dépit de ces conditions non optimales pour la détection des effets induits par les effets sur les protéine-kinases une inhibition de croissance a été mise en évidence pour sept composés ayant tous un brome en position 7, cohérente avec les résultats obtenus dans d'autres conditions^{242,243}. Trois composés photoréactifs ont été détectés parmi les indirubines inhibant la croissance cellulaire, substitués en 7 par un brome et un parmi les composés non-inhibiteurs (MC117 substitué par un brome en 6). Tous les composés phototoxiques excepté un seul (7BIO) sont des producteurs de ROS et sont fluorescents, leur fluorescence est augmentée en présence de FCS pour 6 composés sur 7 (à l'exception du MLS 2040). Néanmoins, il fut impossible d'identifier un seul critère de structure prédisant la phototoxicité de la molécule. Par ailleurs, beaucoup d'autres paramètres comme la solubilité, la biodisponibilité du médicament, sa capacité à rentrer dans les cellules, sa stabilité, ses interactions avec les cibles de protéines variées, sa 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 n'y a pas pour autant de corrélation entre la phototoxicité et l'activité anti-kinase. Cela signifie que les variations de phototoxicité ne sont pas dues principalement à la localisation du médicament sur des cibles spécifiques mais à des différences de photoréactivité. Inversement, les analyses anti-kinases n'ont pas été perturbées par la photoréactivité, ce qui aurait généré une corrélation positive entre le test de phototoxicité et les inhibitions de croissance, ce qui n'est pas le cas ici. La fluorescence des indirubines était

malheureusement trop faible pour que l'on puisse analyser la distribution de ces composés à l'intérieur des cellules.

En ce qui concerne l'utilisation des indirubines en tant qu'anticancéreux dont le mode d'action passe exclusivement par l'inhibition des kinases, ce qui sous-entend une administration chronique, il est souhaitable de développer en priorité celles qui sont dépourvues de toute photoréactivité, telles que MLS2044, MLS2064, MLS2063. Cela évite de courir le risque d'un retrait du marché pour photosensibilisation cutanée.

Extraits de microalgues

La vie est née au fond des océans et au cours de la lente évolution qui a donné naissance aux plantes terrestres sont apparues les microalgues. Des centaines de milliers d'espèces de microalgues sont réparties à la surface du globe que ce soit en milieu marin, en eaux douces ou saumâtres. Elles participent à 90% de la production primaire aquatique et à 50% de la production primaire mondiale. Elles ont colonisé tous les milieux, des glaces polaires aux zones désertiques et aux sources d'eaux chaudes. Elles se sont adaptées aux environnements extrêmes, vivant dans des marais salants, dans des milieux acides, voire dans des conditions d'éclairement très faibles. Par leur présence à la surface des océans recouvrant 70% de la planète, elles jouent un rôle majeur dans le climat mondial en transformant le CO₂ en matière organique grâce à la photosynthèse. Cette diversité laisse espérer une richesse proportionnelle en molécules originales encore inexploitées.

Effectuer des extractions successives à partir de produits naturels est une démarche classique pour identifier de nouveaux principes actifs. Dans le cas de la photochimie, l'idée du Pr Patrice a été de chercher dans des microalgues marines de nouvelles molécules photosensibles. Cette démarche est sous-tendue par deux constats :

D'une part les micro-algues présentent une incroyable diversité et la probabilité d'y trouver des composés chimiques originaux est grande.

D'autre part, l'eau joue le rôle de filtre lumineux vis-à-vis de ces micro-algues, ce qui signifie que les pigments dont le rôle est de capter la lumière doivent avoir une haute efficacité. Par ailleurs, il existe au sein des organismes vivants de nombreuses molécules colorées dont la fonction n'est pas en relation avec leur capacité d'absorber la lumière visible. Si une de ces molécules était photoréactive et qu'elle était exposée à la lumière solaire, elle générerait des espèces oxydantes, attaquant les molécules proches, ce qui engendrerait une pression de sélection négative vis-à-vis des organismes possédant de telles molécules photoréactives. En revanche, on peut tout à fait imaginer que ce type de composé existe à l'abri de la lumière. L'eau

de mer absorbe une forte partie de la lumière solaire : en moyenne, seulement 40% de l'énergie lumineuse traverse le premier mètre, et il ne reste que 1,5% de l'énergie lumineuse à 40 mètres de profondeur. Les radiations infrarouges sont les premières filtrées ; les radiations rouges sont presque complètement absorbées entre 1 et 10 mètres (en fonction de la turbidité de l'eau). Si des pigments photoréactifs sont découverts, ils absorberont donc probablement la lumière dans la plage de longueur d'onde la plus utile pour la photochimiothérapie. Ce travail est l'objet du projet Photomer, qui a été financé successivement par l'Institut National du Cancer (2005), la région Pays de la Loire (2006), et l'Agence Nationale de la Recherche (2008), et associe le Laboratoire de Photobiologie des Cancers avec le Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies des Algues (Ifremer) et le Laboratoire de Biotechnologies et Chimie Bio-organique (CNRS).

Le Laboratoire de physiologie et biotechnologies des algues sélectionne en fonction de son expertise et de la bibliographie les espèces d'algues à étudier. Du fait de l'extrême diversité des micro-algues marines, la première étape consiste à tester quelques représentants des nombreuses classes au sein des différents embranchements, Chlorophytes (algues vertes), Rhodophytes (algues rouges), Ocrophytes (algues brunes), Dynophytes (Dinoflagellés). Les espèces testées sont choisies pour leur originalité (en terme de physiologie, de biotope...) et sont de préférence des espèces qui ont été peu étudiées. Du fait de l'expertise d'Ifremer dans le domaine de la culture d'algue, des espèces difficiles à entretenir peuvent être étudiées, et il est également possible de faire varier les conditions de culture (température, pH, cycles d'éclairement), de manière à modifier le métabolisme de ces espèces (certaines pouvant aller jusqu'à changer de couleur en fonction des conditions de culture). Les cultures sont effectuées dans des photobioréacteurs spécialement conçus pour la production de biomasse de micro-algues. Ces réacteurs peuvent contenir un volume de quelques millilitres à 100 litres, ce qui permettra, lors des prochaines étapes du projet, de fournir une biomasse suffisante pour permettre l'extraction des composés photoréactifs, même s'ils sont présents en faible quantité. La culture d'une espèce dure environ un mois. Les cultures ainsi obtenues sont concentrées (par centrifugation, floculation, précipitation) puis stockées avant expédition au Laboratoire de Biotechnologies et Chimie Bio-organique de La Rochelle pour extraction des pigments.

L'objectif de la phase d'extraction est d'isoler toutes les molécules capables d'absorber la lumière visible, en assurant la meilleure conservation possible jusqu'aux tests de photoréactivité. A ce stade les extraits ne doivent pas être nécessairement purs : les extraits identifiés comme photoréactifs seront séparés en différentes fractions parmi lesquelles nous cherchons à identifier la fraction active. En procédant par étape, il est possible de finalement identifier la molécule active au sein d'un extrait. De plus l'utilisation de sources de lumière monochromatiques permet

de tester séparément au sein d'un extrait les différents pics d'absorption. Les microalgues sont tout d'abord lysées par ultrasons à froid. Pour solubiliser les pigments polaires, tels que les phycobiliprotéines, l'extraction est simplement réalisée avec de l'eau. Pour les pigments plus apolaires comme les caroténoïdes et les chlorophylles, les extractions sont réalisées en solvants organiques ; le méthanol et l'éthanol permettent d'extraire les pigments les moins hydrophobes et le dichlorométhane ainsi que le chloroforme les molécules les plus hydrophobes. Les purifications plus poussées font intervenir des techniques de CLHP utilisant une phase mobile composée de plusieurs solvants organiques et dont la polarité varie au cours du temps. En sortie de chromatographie, un spectrophotomètre couplé à un collecteur permet de récupérer les différentes fractions d'intérêt. Celles-ci sont ensuite stockées à l'abri de la lumière, au froid et sous atmosphère inerte. Cette étape n'est pas spécifique à la photochimiothérapie mais doit produire des extraits utilisables pour notre laboratoire : ceux-ci doivent être suffisamment concentrés pour absorber la lumière durant les tests de photoréactivité, ce qui n'est pas toujours le cas en sortie de CLHP ; concentrer les échantillons nécessite des étapes d'évaporation susceptibles de dégrader les molécules dont on ignore encore à ce stade la nature et la stabilité. Pour les tests de phototoxicité cellulaire, quelques milligrammes d'extrait sont nécessaires, ce qui représente une quantité énorme sachant que les méthodes de purification ne sont pas à ce stade optimisées et que les pigments d'intérêt sont présents en faible proportion dans la biomasse initiale. De plus, des problèmes de solubilité peuvent survenir : en effet, les photosensibilisants sont en général d'autant plus efficaces et sélectifs qu'ils sont lipophiles⁸⁸, alors que les milieux de culture cellulaire sont eux aqueux et qu'il n'est pas envisageable de concevoir des formes galéniques complexes pour des centaines d'extraits. Heureusement, la plupart des extraits peuvent être repris dans de l'éthanol, du polyéthylène glycol ou du DMSO, solvants qui peuvent ensuite être dilués dans l'eau. Certains extraits n'ont toutefois pas encore pu être testés (formation d'un précipité, solvants incompatibles avec du sérum, même dilué...) et nécessiteront le développement de méthodes spécifiques pour évaluer leur intérêt en PDT.

Les extraits sont enfin envoyés au laboratoire de photobiologie des cancers pour débiter l'identification des photosensibilisants proprement dite. Sachant que plusieurs molécules extraites de micro-algues ont déjà été décrites et parfois brevetées pour une utilisation en PDT (chlorines, bactériochlorines, phéophorbides...), notre objectif est non seulement d'identifier les fractions photoréactives, mais de classer ces extraits en fonction de leur intérêt et de les comparer aux photosensibilisants connus. En effet, la caractérisation d'une structure chimique est une étape relativement longue et coûteuse, et elle ne doit être entreprise que si l'on a le maximum de chance d'identifier un nouveau photosensibilisant, meilleur que ceux déjà décrits. Pour cela,

les tests de photoréactivité que nous avons mis au point se sont avérés particulièrement utiles, car ils ont permis de tester plusieurs extraits, irradiés aux différentes longueurs d'onde correspondant aux pics d'absorption de manière à tester tous les composants, en une seule journée. Comme nous ne connaissions pas la concentration des solutions testées, nous avons choisi de comparer les extraits en ajustant leur concentration de manière à ce que l'absorbance à la longueur d'onde testée soit identique pour tous les extraits. De cette manière nous avons pu comparer les extraits entre eux et à des sensibilisants connus et performants, extraits d'algues (chlorine e6, phéophorbide), ou de synthèse (m-THPC). Il était inespéré de trouver autant de molécules photoréactives. Le laboratoire a donc entrepris deux démarches en parallèle pour confirmer l'originalité et l'activité des extraits. D'une part, des chromatographies bidimensionnelles sur couche mince ont permis de vérifier que les constituants des extraits ne migraient pas de manière identique à celle des photosensibilisants connus (résultats obtenus par d'autres étudiants, non présentés ici). D'autre part, des tests de phototoxicité cellulaire ont été entrepris (cf. V.C.5), pour confirmer la phototoxicité des produits testés. Le suivi de la fluorescence intracellulaire n'était pas utilisable ici, car nous ne pouvions pas avoir la certitude que la fluorescence détectée était due aux composants les plus photoréactifs. Nous avons donc réalisé des tests de phototoxicité avec différents temps d'incubation pour évaluer au mieux le potentiel de ces composés phototoxiques, la DL50 pouvant être divisée par quatre en fonction du temps d'incubation, et la rapidité de pénétration dans les cellules. Les différences observées entre les meilleurs temps d'incubation des produits testés et ceux des produits de référence suggèrent là encore que nous avons affaire à des sensibilisants originaux. De plus, en dépit de certaines similitudes dans les spectres d'absorption (pics communs et semblables entre 400 et 420 nm et entre 668 et 675 nm), les extraits photoréactifs ont également des caractéristiques différentes, ce qui suggère qu'ils sont différents les uns des autres. Les résultats obtenus sont très prometteurs, puisque sur 11 extraits testés, impurs, contenant très probablement des pigments non photoréactifs, cinq ont montré dans au moins une condition expérimentale une phototoxicité supérieure aux photosensibilisants de référence purs, sans qu'une toxicité en absence de lumière soit détectée pour quatre d'entre eux. L'abondance d'extraits hautement photoréactifs absorbant des longueurs d'onde directement utilisables en photochimiothérapie a conduit les différents partenaires du projet (CHU de Nantes, Ifremer, CNRS) à envisager une valorisation rapide des résultats obtenus. Toutefois, des retombées à plus long terme sont également envisageables, car plusieurs extraits ont montré une excellente photoréactivité après irradiation avec des longueurs d'onde comprises entre 400 et 600 nm. Une fois que ces extraits auront été purifiés et s'ils sont originaux, il sera possible d'envisager une exploitation en photochimiothérapie après modifications chimiques pour décaler

leur spectre d'absorption, ou grâce à des excitations bi-photoniques. L'originalité de ces résultats réside également bien sûr dans l'origine marine de ces substances, car la plupart des photosensibilisants déjà décrits sont soit d'origine animale, soit d'origine synthétique, soit issus de bactéries ou plantes terrestres. Ces dernières dérivant toutes d'une seule algue verte, alors que la biodiversité des algues est considérable, nous espérons pouvoir mettre en évidence de très nombreuses nouvelles structures photoréactives.

L'incidence des cancers et la mortalité associée n'ont cessé d'augmenter depuis 1975. En France, 152500 personnes sont décédées des suites d'un cancer en 2003¹³³, ce qui représente plus d'un décès sur 4 (27,1%) pour l'ensemble de la population. Le cancer est la première cause de mortalité entre 40 et 75 ans. Actuellement, le traitement des cancers repose sur la chirurgie, l'hormonothérapie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Cependant ces deux derniers traitements sont souvent mal supportés par le malade et dans de nombreux cas l'efficacité reste modérée et temporaire²⁴⁷, même si pour certains cancers (cancers du sein ou myélomes par exemple), l'amélioration est remarquable. Les progrès réalisés, pour les traitements et surtout le dépistage, ont permis une légère diminution du taux de mortalité standardisé des patients atteints d'un cancer¹³³ (de 400 / 100 000 en 1985-1987 à 350 / 100 000 en 2000-2002). Malgré tout, la mise en place de traitements efficaces contre le cancer reste un défi majeur, que la France souhaite relever, notamment à travers la création de l'Institut National du Cancer et la mise en place des Cancéropôles, dont le but est de favoriser les collaborations entre équipes de recherche et l'émergence de nouveaux traitements. Parmi eux, la photochimiothérapie représente un espoir pour le traitement des cancers n'ayant pas encore formé de métastase et accessibles à une illumination directe ou par l'intermédiaire d'une fibre optique (endoscopie). Elle peut être utilisée dans des cas où les autres thérapies sont inefficaces, car le mécanisme d'action est différent de celui de la chimiothérapie, de la radiothérapie ou de l'immunothérapie, ou inutilisables (contre indication opératoire). Le traitement s'effectue sous anesthésie locale ou générale mais est de courte durée (inférieure à 1 heure) et n'entraîne pas d'effraction sanguine. Les patients ne doivent pas être soumis à une hospitalisation prolongée, les seules précautions à prendre sont d'éviter une exposition lumineuse trop intense du patient (et de sa perfusion) pendant l'injection et durant les quelques jours suivant le traitement. Les matériels sont peu coûteux, du moins comparés aux installations de radiothérapie. Les photosensibilisants ne sont pas cancérigènes, ni même toxiques, à la différence de nombreuses substances utilisées en chimiothérapie anticancéreuse. Comme nous l'avons expliqué précédemment, la PDT possède quatre avantages par rapport aux traitements anticancéreux conventionnels:

- Une destruction sélective du tissu tumoral.
- Un caractère peu invasif.
- La possibilité d'une utilisation à des fins de diagnostic, notamment per-opératoire.
- Un rapport coût/efficacité favorable par rapport aux autres traitements.

La photochimiothérapie est utilisée en cancérologie depuis les années 70 et a été introduite dans les années 80 en France par le Pr T. Patrice et son équipe, mais elle n'a pas connu l'essor que l'on pouvait espérer du fait des avantages que nous venons d'énumérer. Deux raisons principales

peuvent expliquer ce retard³. D'une part, les essais cliniques entrepris n'ont été autorisés que pour des cancers récidivants après d'autres traitements, qui représentent de mauvaises indications pour la photochimiothérapie, adaptée aux lésions cancéreuses récentes, d'autant plus que les tissus remaniés (nécrose, fibrose, hémorragies...) perturbent à la fois la diffusion du photosensibilisant et celle de la lumière. D'autre part, les brevets correspondant aux 6 photosensibilisants actuellement sur le marché sont anciens (de 1987 pour le Photofrin[®] à 1992 pour la Visudyne[®]) et les sociétés développant ces produits n'ont pas d'intérêt à dépenser de fortes sommes (cf. *Annexe 2*) pour mettre en place des essais cliniques et développer de nouvelles indications alors qu'elles vont perdre prochainement l'exclusivité de vente de leur produit. Il apparaît donc nécessaire de développer de nouveaux photosensibilisants¹⁴², plus efficaces, plus adaptés à des indications encore incurables et qui stimuleront les investissements dans cette discipline, permettant à la fois de familiariser les cliniciens avec cette nouvelle technique et de mieux en démontrer son efficacité. Du fait du faible coût de la PDT et de la possibilité de réaliser des traitements en dehors de structures spécialisées, un nouvel essor bénéficierait également aux pays en voie de développement^{152,248} (cf. également travaux du Pr K. Svanberg).

Plusieurs équipes ont récemment testé des séries de composés en photochimiothérapie²⁴⁹⁻²⁵³, mais aucune n'a criblé à notre connaissance autant de composés que notre laboratoire en seulement 3 ans. La principale raison est que toutes les structures ont directement été testées sur cellules. Bien que cette étape soit indispensable à la démonstration du potentiel d'un composé en photochimiothérapie, une présélection sur la photoréactivité en milieu biologique permet à la fois d'énormément accélérer le processus de criblage, de ne pas mobiliser inutilement des ressources pour synthétiser des composés non photoréactifs en quantité suffisante pour permettre les tests cellulaires, et de faciliter l'interprétation des résultats obtenus.

L'expertise du Laboratoire de Photobiologie des Cancers en ce qui concerne l'identification de nouveaux photosensibilisants, associée à celle du Laboratoire de Physiologie et Biotechnologies des Algues (Ifremer, Nantes) concernant les micro-algues et leur culture ont été récompensées par un financement de l'Agence Nationale de la Recherche accordé au projet Photomer, dans le but de parvenir à la création d'une entreprise qui valoriserait ces compétences et les fruits de cette recherche originale. En ne tenant compte que des indications actuelles de la photochimiothérapie, le marché mondial est estimé entre 1,3 et 3,6 milliards d'euros (cf. *Annexe 3*), ce qui signifie qu'une telle entreprise pourrait bénéficier de gros investissements et participer de manière significative au développement de la région Pays de la Loire. Seulement quatorze entreprises sont actuellement impliquées dans la recherche et le développement de molécules pour la photochimiothérapie, parmi lesquelles huit sont européennes. Les plus connues sont:

Biolitec AG (Allemagne), Miravant Medical Technologies (USA), NEGMA Laboratories (France), QLT Inc. (Canada), DUSA Pharmaceutical Inc. (USA), Photocure (Norvège), Light Sciences Corporation (USA), Photochemical Co (Japon). Quelques entreprises n'interviennent qu'au niveau du développement commercial des photosensibilisants et seraient potentiellement intéressées par les résultats d'un groupe comme Photomer ; il s'agit d'Axcan Pharma Inc. (Canada), Pfizer (USA), Novartis (Suisse), Galderma (France).

Bien que cela sorte du cadre du présent travail, nous pouvons signaler que l'identification de structures originales très photoréactives peut avoir des retombées en dehors de la photochimiothérapie, car celles-ci peuvent être utilisées pour la stérilisation de bassins d'aquaculture, en médecine vétérinaire, dans la composition de défoliants, dans la conception de photopiles...

CONCLUSION

L'objectif de ce travail était de permettre le développement de nouveaux photosensibilisants. La photoréactivité des dérivés d'indirubines n'avait encore jamais été décrite, et aucun noyau photoréactif n'avait encore montré la possibilité d'interagir avec la régulation du cycle cellulaire. La possibilité qu'ont les indirubines de prendre la place de l'ATP au niveau des kinases et de les inhiber ouvre la voie à une nouvelle stratégie en photochimiothérapie. Des discussions sont en cours pour synthétiser de nouvelles indirubines, spécialement pour cette application. Deux brevets ont été déposés par l'Université de Fribourg, qui cherche désormais un partenaire industriel pour parvenir à terme à la mise sur le marché des meilleures phthalocyanines que nous avons étudiées. Le Dr A. Reshetnikov va présenter à l'EMA une demande de mise sur le marché incluant les deux publications que nous avons soumises concernant l'évaluation préclinique de la Radachlorine décrite ici. Enfin le projet Photomer bénéficie désormais d'un financement "Emergence Bio" attribué par l'ANR, pour lui permettre d'aboutir à la création d'une entreprise qui développera les nouveaux photosensibilisants identifiés. Ce projet fait également partie du pôle d'excellence "Biothérapies", ce qui permet d'envisager des retombées régionales et nationales.

Nous avons donc bon espoir que certains des produits testés et présentés ici puissent un jour permettre le traitement de patients cancéreux. La mise sur le marché d'un médicament est malgré tout un processus difficile ; il faudra donc que ces drogues franchissent encore les étapes dites précliniques réglementaires et les différentes phases d'essais cliniques, ce qui nécessitera quelques années et plusieurs millions d'euros d'investissement pour les transformer en médicaments. Heureusement, du fait de leur mode d'action et de leur innocuité en absence de lumière, les photosensibilisants parviennent plus facilement aux stades d'évaluation clinique que les autres classes de médicaments.

ANNEXES

Annexe 1 : Les différents photosensibilisants et leur stade de développement industriel.

Composés / Noms déposés	Longueur d'onde d'irradiation	Phase de développement
Dérivés de l'HPD (<i>Photofrin</i> [®] / Porfimer sodium, <i>Photofrin II</i> [®] , <i>Photobarr</i> [®] , <i>Photosan-3</i> [®])	630 nm	AMM : rechutes de cancers bronchiques et œsophagiens, France (1996), USA (1995). Essais cliniques III : cholangiocarcinomes II, mésothéliomes, hépatocarcinomes, cancers pancréatiques, cancers bronchiques et œsophagiens, cancers de la vessie
acide 5-aminolévulinique (ALA, PD P 506 A, <i>Levulan</i> [®])	630 nm	AMM : kératoses actiniques, USA (1999) Essais cliniques III : Athérosclérose II: carcinomes baso-cellulaires, Cancers ORL, leucoplasie, érythroplasie, psoriasis, maladie de Bowen
ALA methyl-ester (<i>Metvix</i> [®] , <i>Hexvix</i> [®] , <i>Benzvix</i> [®])	632 nm	AMM : carcinome baso-cellulaire, Suède (2001), kératose actiniques, Europe (2002) Essais cliniques III : photodiagnostic cancers de la vessie I/II : cancers digestifs
Benzoporphyrine dérivée monoacide A (BPD-MA) ou Verteoporfin (<i>Visudyne</i> [®])	690 nm	AMM : DMLA, USA (1999), France (2000) Essais cliniques III: Carcinomes baso-cellulaires, syndrome de Gorlin, immunosuppresseur II: cancers cutanés (mélanomes inclus) I/II : Histoplasmoses oculaires, agent-anti HIV, affections gynécologiques
Methoxsalen (<i>UVADEX</i> [®] , OxSORALEN)	UV-A	AMM : <i>Lymphomes cutanés</i> , USA (1999), France (2006) Essais cliniques II: lymphomes
Méta-tétra hydroxyphényle chlorine (m-THPC, <i>Foscan</i> [®])	652 nm	AMM : <i>cancers ORL</i> , EMEA (2001) III: cancers laryngés, tête, cou, avec chirurgie et radiothérapie pour cancers avancés II: cancers du sein, gastriques, du pancréas
Hypericine	595 nm	Essais cliniques : III: Lymphome T cutané (Statut d'"orphan drug" accordé par la FDA en 2008) I/II: agent antiviral hépatite C, HIV/SIDA, gliomes malins I: psoriasis, cancers de la peau, verrues (formulation topique)
Tin éthyl- étiopurpurine (SnET ₂ , Rostaporfin, <i>Photrex</i> [®] , <i>Purlytin</i> [®])	660 nm	Essais cliniques III: DMLA II/III: cancer du sein métastaté cutané, carcinome baso-cellulaire, I/II: cancers cutanés ; sarcome de Kaposi

Diéthylène glycol benzoporphyrine (Lemuteporfin [®])	690 nm	Essais cliniques I/II : Hyperplasie bénigne de la prostate
Chlorine e6 et dérivés (purs ou mélangés) (Mono-L-aspartyl chlorure e6, LS11, Talaporfin [®] , Photolon [®] , Radachlorin [®] , Photolife [®] , Radagel [®])	664 nm	Essais cliniques II : cancers pulmonaires, cancers et métastases cutanées, métastases hépatiques (cancers colo-rectaux), récurrences de cancers rectaux, cancers ORL, cancers du poumon, récurrences cancers de la prostate, cancers du pancréas
Phthalocyanines siliconées (Pc4, Pc10, Pc12, Pc18, Photosense [®])	670 nm	Essais cliniques : I : Cancers du sein, cancers ORL, cancers cutanés, lymphomes
1,3-diène C,D,diéthylène glycol ester benzoporphyrine (QLT0074)	690 nm	Essais cliniques I/II : Hyperplasie bénigne de la prostate
Lutetium-tétraporphyrine (Lutrin [®] , Antrin [®] , Optrin [®])	732 nm	Essais cliniques II: cancer du sein, prostate, athérosclérose, DMLA I : cancers de la prostate, cancers du col de l'utérus
Zn-phthalocyanine	670 nm	Essais cliniques : I: athérosclérose, maladies dermatologiques (formulation topique), maladies oculaires
WST09 (Tookad [®])	760 nm	Essais cliniques : II : prostate
Pd-bacteriochlorophylle (WST11)	755 nm	Essais cliniques : II : prostate
2-(1-héxyloxyéthyl)-2-dévinylpyropheophorbide-a (HPPH, LS216, Photochlor [®])	665 nm	Essais cliniques : II: Cancers du poumon et de l'œsophage I: Cancers ORL, cancers cutanés (mélanomes exclus)

3,7-bis (N,N-dibutylamino)phenothiazin-5-ium bromide (PPA904)		Essais cliniques ulcères chroniques des membres inférieurs
Indium chloride méthyl-pyrophosphoribide, MV6401 (+ MV9411, MV0633)	664 nm	Essais cliniques : II: psoriasis Pré-clinique : Athérosclérose, sténose.
Al-phthalocyanine disulphonatée	685 nm	Préclinique
ATX-S10	672 nm	Préclinique: DMLA
Si-naphthalocyanine	776 nm	Préclinique
Bactériopurpurines	800-820 nm	Préclinique
Hypocrellines	630-700 nm	Préclinique
SQN-400	740 nm	Préclinique
PH-10	520-580 nm	Préclinique: Psoriasis
ER-470		Préclinique
TH 9402 (4,5-dibromorhodamine methyl-ester, Theralux [®])	515 nm	Pré-clinique : Purge de moëlle
5,10,15-tris(4-methylpyridinium)-20-phenyl-[21H,23H]-porphine trichloride (Sylsens B)		Recherche : Stérilisation

Annexe 2 : Durée et coût moyen des différentes étapes de développement d'un médicament (d'après T. Patrice *et coll.*, J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2006, **25**, 467-485).

Étape		Durée (mois)	Coût (k€)
Synthèse de lots aux normes - purification		6	1000
Formulation galénique		6	150
Tests précliniques réglementaires		6	1500
Etudes cliniques	Phase I	16	300
	Phase II	24	600
	Phase III	18	2000
TOTAL		62	5550

Annexe 3 : Marché mondial potentiel de la photochimiothérapie en fonction de l'incidence des indications (d'après T. Patrice *et coll.*, *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2006, **25**, 467-485).

Les calculs ont été faits en évaluant le coût moyen d'une photochimiothérapie anticancéreuse à 1500€ et d'un traitement ophtalmologique à 1200€.

Indications (localisation cancéreuse)	Nombre annuel de cancers	Pourcentage de cas traités par PDT (en %)	Estimation basse du marché (en k€, 1 traitement par patient)	Estimation haute du marché (en k€, 3 traitements par patient)
Glioblastomes	15 000	50	11 250	33 750
Cavité orale	65 376	15	14 710	44 129
Naso-pharynx	5 034	15	1 133	3 400
Pharynx (autres)	31 374	15	7 059	21 177
Larynx	44 321	15	9 972	29 917
Oesophage	54 422	10	8 163	24 490
Poumons	485 759	10	72 864	218 591
Colon/rectum	488 894	5	36 667	110 001
Estomac	222 850	10	33 428	100 283
Vessie	168 707	5	12 653	37 959
Prostate	387 256	10	58 088	174 265
Peau			30 435	91 303
Foie	87 595	10	13 139	39 418
Leucémies	84 268	5	6 320	18 960

Indications	Nombre de cas annuels	Pourcentage de cas traités par PDT (en %)	Nombre minimum de traitements par patients	Estimation basse du marché (k€)	Nombre maximum de traitements par patients	Estimation haute du marché (k€)
Oesophage de Barrett	200 000	100	2	600 000	6	1 800 000
DMLA	640 000	30	2	460 800	4	921 600

Marché total (k€)	1 376 681	3 669 241
--------------------------	------------------	------------------

BIBLIOGRAPHIE

1. R. Bonnett, Photodynamic therapy in historical perspective, *Rev. Contemp. Pharmacother.*, 1999, **10**, 1-17.
2. J. A. Carruth, Clinical applications of photodynamic therapy, *Int J Clin Pract*, 1998, **52**, 39-42.
3. T. Patrice, D. Olivier and L. Bourre, PDT in clinics: indications, results, and markets, *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2006, **25**, 467-485.
4. C. J. Gomer, Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy, *Photochem Photobiol*, 1991, **54**, 1093-1107.
5. L. Morlet, V. Vonarx, M. T. Foulter, A. Gouyette, C. Stewart, P. Lenz and T. Patrice, In vitro and in vivo spectrofluorometry of a water-soluble meta-(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) derivative, *J Photochem Photobiol B*, 1997, **39**, 249-257.
6. D. Olivier, L. Bourre, E. El-Sabbagh, D. Loussouarn, G. Simonneaux, F. Valette and T. Patrice, Photodynamic effects of SIM01, a new sensitizer, on experimental brain tumors in rats, *Surg Neurol*, 2007, **68**, 255-263.
7. J. Moan and Q. Peng, An outline of the hundred-year history of PDT, *Anticancer Res*, 2003, **23**, 3591-3600.
8. F. Meyer-Betz, Investigations on the biological (photodynamic) action of haematoporphyrin and other derivatives of the blood and bile pigments, *Arch. Klin. Med.*, 1913, **112**, 476-503.
9. O. Raab, On the effect of fluorescent substances on infusoria, *Z. Biol.*, 1900, **39**, 524-546.
10. H. von Tappeiner and A. Jesionek, Therapeutic experiments with fluorescent substances, *Munch. Med. Wochenschr*, 1903, **47**, 2042-2044.
11. H. Von Tappeiner and A. Jodlbauer, On the effect of photodynamic (fluorescent) substances on protozoa and enzymes, *Arch. Klin. Med.*, 1904, **80**, 427-487.
12. W. Hausmann, The sensitizing action of haematoporphyrin, *Biochem. Z.*, 1911, **30**, 276-316.
13. A. Policard, Studies of experimental tumours under Wood's light., 1924, **91**, 1423-1428.
14. H. Auler and G. Banzer, Investigations on the role of porphyrins in tumour-bearing humans and animals, *Z. Krebsforsch*, 1942, **53**, 65-68.
15. H. B. Gregorie, Jr., E. O. Horger, J. L. Ward, J. F. Green, T. Richards, H. C. Robertson, Jr. and T. B. Stevenson, Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms, *Ann Surg*, 1968, **167**, 820-828.
16. F. Figge, G. S. Weiland and L. O. J. Manganiello, Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1948, **68**, 640-641.
17. R. L. Lipson, E. J. Baldes and M. J. Gray, Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer, *Cancer*, 1967, **20**, 2255-2257.
18. T. J. Dougherty, Activated dyes as antitumor agents, *J Natl Cancer Inst*, 1974, **52**, 1333-1336.
19. I. Diamond, S. G. Granelli, A. F. McDonagh, S. Nielsen, C. B. Wilson and R. Jaenicke, Photodynamic therapy of malignant tumours, *Lancet*, 1972, **2**, 1175-1177.
20. J. F. Kelly, M. E. Snell and M. C. Berenbaum, Photodynamic destruction of human bladder carcinoma, *Br J Cancer*, 1975, **31**, 237-244.
21. C. D. Davies, A. Western, T. Lindmo and J. Moan, Changes in antigen expression on human FME melanoma cells after exposure to photoactivated hematoporphyrin derivative, *Cancer Res*, 1986, **46**, 6068-6072.
22. B. D. Goldstein and L. C. Harber, Erythropoietic protoporphyria: lipid peroxidation and red cell membrane damage associated with photohemolysis, *J Clin Invest*, 1972, **51**, 892-902.
23. G. Jori, Tumour photosensitizers: approaches to enhance the selectivity and efficiency of photodynamic therapy, *J Photochem Photobiol B*, 1996, **36**, 87-93.
24. M. G. Dilkes, M. L. DeJode, Q. Gardiner, G. S. Kenyon and P. McKelvie, Treatment of head and neck cancer with photodynamic therapy: results after one year, *J Laryngol Otol*, 1995, **109**, 1072-1076.
25. R. W. Redmond and J. N. Gamlin, A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules, *Photochem Photobiol*, 1999, **70**, 391-475.
26. Y. Hayata, H. Kato, C. Konaka, J. Ono and N. Takizawa, Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the treatment of lung cancer, *Chest*, 1982, **81**, 269-277.
27. C. J. Byrne, L. V. Marshallsay and A. D. Ward, The composition of Photofrin II, *J Photochem Photobiol B*, 1990, **6**, 13-27.

28. N. A. Buskard and B. C. Wilson, Introduction to the symposium on photodynamic therapy, *Semin Oncol*, 1994, **21**, 1-3.
29. I. Rosenthal, Phthalocyanines as photodynamic sensitizers, *Photochem Photobiol*, 1991, **53**, 859-870.
30. K. W. Woodburn, Q. Fan, D. R. Miles, D. Kessel, Y. Luo and S. W. Young, Localization and efficacy analysis of the phototherapeutic lutetium texaphyrin (PCI-0123) in the murine EMT6 sarcoma model, *Photochem Photobiol*, 1997, **65**, 410-415.
31. J. D. Spikes, Chlorins as photosensitizers in biology and medicine, *J Photochem Photobiol B*, 1990, **6**, 259-274.
32. B. Roeder and H. Wabnitz, Time-resolved fluorescence spectroscopy of hematoporphyrin, mesoporphyrin, pheophorbide a and chlorin e6 in ethanol and aqueous solution, *J Photochem Photobiol B*, 1987, **1**, 103-113.
33. S. Kimura and Y. Takahashi, Preventive effects of L-ascorbic acid and calcium pantothenate against photosensitive actions induced by pheophorbide alpha and hematoporphyrin, *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, 1981, **27**, 521-527.
34. H. I. Pass, Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical use, *J Natl Cancer Inst*, 1993, **85**, 443-456.
35. D. Kessel, In vitro photosensitization with a benzoporphyrin derivative, *Photochem Photobiol*, 1989, **49**, 579-582.
36. A. M. Richter, B. Kelly, J. Chow, D. J. Liu, G. H. Towers, D. Dolphin and J. G. Levy, Preliminary studies on a more effective phototoxic agent than hematoporphyrin, *J Natl Cancer Inst*, 1987, **79**, 1327-1332.
37. R. Bonnett, R. D. White, U. J. Winfield and M. C. Berenbaum, Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers, *Biochem J*, 1989, **261**, 277-280.
38. J. E. van Lier and J. D. Spikes, The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines, *Ciba Found Symp*, 1989, **146**, 17-26; discussion 26-32.
39. G. Kostenich, A. Orenstein, L. Roitman, Z. Malik and B. Ehrenberg, In vivo photodynamic therapy with the new near-IR absorbing water soluble photosensitizer lutetium texaphyrin and a high intensity pulsed light delivery system, *J Photochem Photobiol B*, 1997, **39**, 36-42.
40. S. W. Young, K. W. Woodburn, M. Wright, T. D. Mody, Q. Fan, J. L. Sessler, W. C. Dow and R. A. Miller, Lutetium texaphyrin (PCI-0123): a near-infrared, water-soluble photosensitizer, *Photochem Photobiol*, 1996, **63**, 892-897.
41. Q. Peng, T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, K. E. Giercksky and J. M. Nesland, 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges, *Cancer*, 1997, **79**, 2282-2308.
42. A. Furiga, D. Olivier, M. Baud'huin, L. Bourre, A. Bugaj and T. Patrice, The influence of storage conditions on delta amino levulinic acid induced toxicity and phototoxicity in vitro, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2006, **3**, 35-45.
43. L. Bourre, S. Thibaut, A. Briffaud, Y. Lajat and T. Patrice, Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid thermosetting gel formulation for use in photodynamic therapy of lesions of the gastrointestinal tract, *Pharmacol Res*, 2002, **45**, 159-165.
44. S. Eleouet, N. Rousset, J. Carre, L. Bourre, V. Vonarx, Y. Lajat, G. M. Beijersbergen van Henegouwen and T. Patrice, In vitro fluorescence, toxicity and phototoxicity induced by delta-aminolevulinic acid (ALA) or ALA-esters, *Photochem Photobiol*, 2000, **71**, 447-454.
45. J. Carre, S. Eleouet, N. Rousset, V. Vonarx, D. Heyman, Y. Lajat and T. Patrice, Protoporphyrin IX fluorescence kinetics in C6 glioblastoma cells after delta-aminolevulinic acid incubation: effect of a protoporphyrinogen oxidase inhibitor, *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 1999, **45**, 433-444.
46. V. Vonarx, S. Eleouet, J. Carre, P. Ioss, A. Gouyette, A. M. Leray, C. Merle, Y. Lajat and T. Patrice, Potential efficacy of a delta 5-aminolevulinic acid bioadhesive gel formulation for the photodynamic treatment of lesions of the gastrointestinal tract in mice, *J Pharm Pharmacol*, 1997, **49**, 652-656.
47. Q. Peng, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug and J. M. Nesland, 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research, *Photochem Photobiol*, 1997, **65**, 235-251.

48. A. W. Scotto, L. F. Chang and D. S. Beattie, The characterization and submitochondrial localization of delta-aminolevulinic acid synthase and an associated amidase in rat liver mitochondria using an improved assay for both enzymes, *J Biol Chem*, 1983, **258**, 81-90.
49. B. Grandchamp, N. Phung and Y. Nordmann, The mitochondrial localization of coproporphyrinogen III oxidase, *Biochem J*, 1978, **176**, 97-102.
50. G. C. Ferreira, T. L. Andrew, S. W. Karr and H. A. Dailey, Organization of the terminal two enzymes of the heme biosynthetic pathway. Orientation of protoporphyrinogen oxidase and evidence for a membrane complex, *J Biol Chem*, 1988, **263**, 3835-3839.
51. Z. Diwu and J. W. Lown, Phototherapeutic potential of alternative photosensitizers to porphyrins, *Pharmacol Ther*, 1994, **63**, 1-35.
52. J. B. Hudson, I. Lopez-Bazzocchi and G. H. Towers, Antiviral activities of hypericin, *Antiviral Res*, 1991, **15**, 101-112.
53. J. B. Hudson and G. H. Towers, Therapeutic potential of plant photosensitizers, *Pharmacol Ther*, 1991, **49**, 181-222.
54. D. C. Neckers, Rose Bengal, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 1989, **47**, 1-29.
55. K. Gollnick, T. Franken, M. F. R. Fouda, H. R. Paur and S. Held, Merbromin (mercurochrome) and other xanthene dyes: Quantum yields of triplet sensitizer generation and singlet oxygen formation in alcoholic solutions, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 1992, **12**, 57-81.
56. J. G. Banks, R. G. Board, J. Carter and A. D. Dodge, The cytotoxic and photodynamic inactivation of micro-organisms by Rose Bengal, *J Appl Bacteriol*, 1985, **58**, 391-400.
57. C. R. Lambert and I. E. Kochevar, Electron transfer quenching of the rose bengal triplet state, *Photochem Photobiol*, 1997, **66**, 15-25.
58. F. Dall'Acqua, D. Vedaldi, A. Guiotto, P. Rodighiero, F. Carlassare, F. Baccichetti and F. Bordin, Methylangelicins: new potential agents for the photochemotherapy of psoriasis. Structure-activity study on the dark and photochemical interactions with DNA, *J Med Chem*, 1981, **24**, 806-811.
59. W. A. Bruls, H. van Weelden and J. C. van der Leun, Transmission of UV-radiation through human epidermal layers as a factor influencing the minimal erythema dose, *Photochem Photobiol*, 1984, **39**, 63-67.
60. A. de Laat, J. C. van der Leun and F. R. de Gruijl, Carcinogenesis induced by UVA (365-nm) radiation: the dose-time dependence of tumor formation in hairless mice, *Carcinogenesis*, 1997, **18**, 1013-1020.
61. S. S. Campbell and P. J. Murphy, Extraocular circadian phototransduction in humans, *Science*, 1998, **279**, 396-399.
62. C. A. Czeisler, T. L. Shanahan, E. B. Klerman, H. Martens, D. J. Brotman, J. S. Emens, T. Klein and J. F. Rizzo, 3rd, Suppression of melatonin secretion in some blind patients by exposure to bright light, *N Engl J Med*, 1995, **332**, 6-11.
63. G. T. Wondrak, M. K. Jacobson and E. L. Jacobson, Endogenous UVA-photosensitizers: mediators of skin photodamage and novel targets for skin photoprotection, *Photochem Photobiol Sci*, 2006, **5**, 215-237.
64. J. Baier, T. Maisch, M. Maier, M. Landthaler and W. Baumler, Direct detection of singlet oxygen generated by UVA irradiation in human cells and skin, *J Invest Dermatol*, 2007, **127**, 1498-1506.
65. N. Haralampus-Grynawski, C. Ransom, T. Ye, M. Rozanowska, M. Wrona, T. Sarna and J. D. Simon, Photogeneration and quenching of reactive oxygen species by urocanic acid, *J Am Chem Soc*, 2002, **124**, 3461-3468.
66. C. S. Foote, in *Free Radicals in Biology*, ed. W. A. Pryor, Academic Press, New York, 1976.
67. K. Gollnick, Type II photooxygenation reactions in solution, *Adv Photochem*, 1968, **6**, 1-122.
68. K. R. Weishaupt, C. J. Gomer and T. J. Dougherty, Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor, *Cancer Res*, 1976, **36**, 2326-2329.
69. M. Ochsner, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, *J Photochem Photobiol B*, 1997, **39**, 1-18.
70. G. B. Bulkley, Reactive oxygen metabolites and reperfusion injury: aberrant triggering of reticuloendothelial function, *Lancet*, 1994, **344**, 934-936.

71. M. Barberi-Heyob, C. Frocho, L. Bezdetnaya-Bolotina, D. Brault, D. Dumas, F. Guillemain, P. Krausz, P. Maillard, B. Maunit, J. L. Merlin, S. Mordon, J. F. Muller, T. Patrice, G. Simonneaux and C. Tanielian, La thérapie photodynamique, *l'Actualité Chimique*, 2007, **308-309**, 26-34.
72. J. H. Woodhams, A. J. MacRobert and S. G. Bown, The role of oxygen monitoring during photodynamic therapy and its potential for treatment dosimetry, *Photochem Photobiol Sci*, 2007, **6**, 1246-1256.
73. C. Tanielian, R. Mechin, R. Seghrouchni and C. Schweitzer, Mechanistic and kinetic aspects of photosensitization in the presence of oxygen, *Photochem Photobiol*, 2000, **71**, 12-19.
74. J. F. Kerr, A. H. Wyllie and A. R. Currie, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br J Cancer*, 1972, **26**, 239-257.
75. A. H. Wyllie, The biology of cell death in tumours, *Anticancer Res*, 1985, **5**, 131-136.
76. D. L. Vaux and S. J. Korsmeyer, Cell death in development, *Cell*, 1999, **96**, 245-254.
77. M. D. Masson, Cellular aspects of photodynamic therapy for cancer, *Rev Contemp Pharmacother*, 1999, **10**, 25-37.
78. Y. Luo and D. Kessel, Initiation of apoptosis versus necrosis by photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine, *Photochem Photobiol*, 1997, **66**, 479-483.
79. D. Kessel, Y. Luo, Y. Deng and C. K. Chang, The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy, *Photochem Photobiol*, 1997, **65**, 422-426.
80. J. Dahle, H. B. Steen and J. Moan, The mode of cell death induced by photodynamic treatment depends on cell density, *Photochem Photobiol*, 1999, **70**, 363-367.
81. N. L. Oleinick and H. H. Evans, The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms, *Radiat Res*, 1998, **150**, S146-156.
82. J. Moan, K. Berg, H. Anholt and K. Madslie, Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells, *Int J Cancer*, 1994, **58**, 865-870.
83. S. R. Wood, J. A. Holroyd and S. B. Brown, The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light, *Photochem Photobiol*, 1997, **65**, 397-402.
84. D. Kessel, K. Woodburn, B. W. Henderson and C. K. Chang, Sites of photodamage in vivo and in vitro by a cationic porphyrin, *Photochem Photobiol*, 1995, **62**, 875-881.
85. D. Kessel, K. Woodburn, C. J. Gomer, N. Jagerovic and K. M. Smith, Photosensitization with derivatives of chlorin p6, *J Photochem Photobiol B*, 1995, **28**, 13-18.
86. D. Kessel and Y. Luo, Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis, *J Photochem Photobiol B*, 1998, **42**, 89-95.
87. J. Moan, Porphyrin photosensitization and phototherapy, *Photochem Photobiol*, 1986, **43**, 681-690.
88. T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbek, J. Moan and Q. Peng, Photodynamic therapy, *J Natl Cancer Inst*, 1998, **90**, 889-905.
89. F. M. Griffin, G. Ashland and R. L. Capizzi, Kinetics of phototoxicity of Fischer's medium for L5178Y leukemic cells, *Cancer Res*, 1981, **41**, 2241-2248.
90. A. M. Edwards, E. Silva, B. Jofre, M. I. Becker and A. E. De Ioannes, Visible light effects on tumoral cells in a culture medium enriched with tryptophan and riboflavin, *J Photochem Photobiol B*, 1994, **24**, 179-186.
91. D. Olivier, S. Douillard and T. Patrice, PDT of culture media containing serum induces a bystander-like toxicity in vitro, *Photochem Photobiol Sci*, 2008, soumis août.
92. S. Hatz, L. Poulsen and P. R. Ogilby, Time-resolved Singlet Oxygen Phosphorescence Measurements from Photosensitized Experiments in Single Cells: Effects of Oxygen Diffusion and Oxygen Concentration, *Photochem Photobiol*, 2008, **23**, 23.
93. J. Moan and K. Berg, The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen, *Photochem Photobiol*, 1991, **53**, 549-553.
94. D. T. Sawyer and J. S. Valentine, How super is superoxide?, *Acc Chem Res*, 1981, **14**, 393-400.
95. B. H. Bielski and D. E. Cabelli, Highlights of current research involving superoxide and perhydroxyl radicals in aqueous solutions, *Int J Radiat Biol*, 1991, **59**, 291-319.
96. W. A. Pryor, Oxy-radicals and related species: their formation, lifetimes, and reactions, *Annu Rev Physiol*, 1986, **48**, 657-667.

97. J. Moan, E. O. Pettersen and T. Christensen, The mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin, *Br J Cancer*, 1979, **39**, 398-407.
98. A. Villanueva, M. Canete, C. Trigueros, L. Rodriguez-Borlado and A. Juarranz, Photodynamic induction of DNA-protein cross-linking in solution by several sensitizers and visible light, *Biopolymers*, 1993, **33**, 239-244.
99. J. F. Evensen and J. Moan, Photodynamic action and chromosomal damage: a comparison of haematoporphyrin derivative (HpD) and light with X-irradiation, *Br J Cancer*, 1982, **45**, 456-465.
100. J. P. Boegheim, T. M. Dubbelman, L. H. Mullenders and J. Van Steveninck, Photodynamic effects of haematoporphyrin derivative on DNA repair in murine L929 fibroblasts, *Biochem J*, 1987, **244**, 711-715.
101. N. Rousset, E. Keminon, S. Eleouet, T. Le Neel, J. L. Auget, V. Vonarx, J. Carre, Y. Lajat and T. Patrice, Use of alkaline Comet assay to assess DNA repair after m-THPC-PDT, *J Photochem Photobiol B*, 2000, **56**, 118-131.
102. O. David, L. Bourre, Y. Krika, M. Durand and T. Patrice, DNA damages after SIM01 photodynamic treatment, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005, **2**, 25-33.
103. D. Grebenova, P. Halada, J. Stulik, V. Havlicek and Z. Hrkal, Protein changes in HL60 leukemia cells associated with 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Early effects on endoplasmic reticulum chaperones, *Photochem Photobiol*, 2000, **72**, 16-22.
104. J. C. Stockert, A. Juarranz, A. Villanueva and M. Canete, Photodynamic damage to HeLa cell microtubules induced by thiazine dyes, *Cancer Chemother Pharmacol*, 1996, **39**, 167-169.
105. J. W. Winkelman, D. Arad and S. Kimel, Stereochemical factors in the transport and binding of photosensitizers in biological systems and in photodynamic therapy, *J Photochem Photobiol B*, 1993, **18**, 181-189.
106. J. Delattre, J. L. Beaudoux and D. Bonnefond-Rousselot, *Radicaux libres et stress oxydant: Aspects biologiques et pathologiques*, TEC & DOC, Paris, 2005.
107. P. G. Joshi, K. Joshi, S. Mishra and N. B. Joshi, Ca²⁺ influx induced by photodynamic action in human cerebral glioma (U-87 MG) cells: possible involvement of a calcium channel, *Photochem Photobiol*, 1994, **60**, 244-248.
108. P. Westerman, T. Glanzmann, S. Andrejevic, D. R. Braichotte, M. Forrer, G. A. Wagnieres, P. Monnier, H. van den Bergh, J. P. Mach and S. Folli, Long circulating half-life and high tumor selectivity of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenylchlorin conjugated to polyethylene glycol in nude mice grafted with a human colon carcinoma, *Int J Cancer*, 1998, **76**, 842-850.
109. A. Obwegeser, R. Jakober and H. Kostron, Uptake and kinetics of ¹⁴C-labelled meta-tetrahydroxyphenylchlorin and 5-aminolaevulinic acid in the C6 rat glioma model, *Br J Cancer*, 1998, **78**, 733-738.
110. J. W. Snyder, W. R. Greco, D. A. Bellnier, L. Vaughan and B. W. Henderson, Photodynamic therapy: a means to enhanced drug delivery to tumors, *Cancer Res*, 2003, **63**, 8126-8131.
111. P. Vaupel, F. Kallinowski and P. Okunieff, Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review, *Cancer Res*, 1989, **49**, 6449-6465.
112. L. E. Gerweck and K. Seetharaman, Cellular pH gradient in tumor versus normal tissue: potential exploitation for the treatment of cancer, *Cancer Res*, 1996, **56**, 1194-1198.
113. J. S. Nelson, L. H. Liaw, A. Orenstein, W. G. Roberts and M. W. Berns, Mechanism of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin, and phthalocyanine, *J Natl Cancer Inst*, 1988, **80**, 1599-1605.
114. M. Korbelik, G. Krosl, P. L. Olive and D. J. Chaplin, Distribution of Photofrin between tumour cells and tumour associated macrophages, *Br J Cancer*, 1991, **64**, 508-512.
115. I. Freitas, Lipid accumulation: the common feature to photosensitizer-retaining normal and malignant tissues, *J Photochem Photobiol B*, 1990, **7**, 359-361.
116. A. Barel, G. Jori, A. Perin, P. Romandini, A. Pagnan and S. Biffanti, Role of high-, low- and very low-density lipoproteins in the transport and tumor-delivery of hematoporphyrin in vivo, *Cancer Lett*, 1986, **32**, 145-150.
117. B. A. Allison, P. H. Pritchard and J. G. Levy, Evidence for low-density lipoprotein receptor-mediated uptake of benzoporphyrin derivative, *Br J Cancer*, 1994, **69**, 833-839.
118. A. M. Batlle, Porphyrins, porphyrias, cancer and photodynamic therapy--a model for carcinogenesis, *J Photochem Photobiol B*, 1993, **20**, 5-22.

119. G. Oenbrink, P. Jurgenlimke and D. Gabel, Accumulation of porphyrins in cells: influence of hydrophobicity aggregation and protein binding, *Photochem Photobiol*, 1988, **48**, 451-456.
120. N. Solban, I. Rizvi and T. Hasan, Targeted photodynamic therapy, *Lasers Surg Med*, 2006, **38**, 522-531.
121. M. S. Eljamel, in *11th World Congress of International Photodynamic Association*, ed. IPA, Shangai, China, 2007.
122. S. Kaneko, K. Tokuda, T. Yoshimoto, T. Yamauchi, S. Fujimoto, T. Yoshizumi, T. Shirasaka, M. Nishimura and T. Kashiwaba, in *11th World Congress of International Photodynamic Association*, ed. IPA, Shangai, China, 2007.
123. M. P. Copper, I. B. Tan, H. Oppelaar, M. C. Ruevekamp and F. A. Stewart, Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck, *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, **129**, 709-711.
124. P. J. Lou, L. Jones and C. Hopper, Clinical outcomes of photodynamic therapy for head-and-neck cancer, *Technol Cancer Res Treat*, 2003, **2**, 311-317.
125. S. S. Stylli and A. H. Kaye, Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies, *J Clin Neurosci*, 2006, **13**, 709-717.
126. R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer and R. O. Mirimanoff, Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N Engl J Med*, 2005, **352**, 987-996.
127. S. S. Stylli, A. H. Kaye, L. MacGregor, M. Howes and P. Rajendra, Photodynamic therapy of high grade glioma - long term survival, *J Clin Neurosci*, 2005, **12**, 389-398.
128. S. S. Stylli, M. Howes, L. MacGregor, P. Rajendra and A. H. Kaye, Photodynamic therapy of brain tumours: evaluation of porphyrin uptake versus clinical outcome, *J Clin Neurosci*, 2004, **11**, 584-596.
129. H. Kostron, C. Plangger, E. Fritsch and H. Maier, Photodynamic treatment of malignant brain tumors, *Wien Klin Wochenschr*, 1990, **102**, 531-535.
130. A. Jemal, R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray and M. J. Thun, Cancer statistics, 2008, *CA Cancer J Clin*, 2008, **58**, 71-96.
131. B. T. Petersen, R. Chuttani, J. Croffie, J. DiSario, J. Liu, D. Mishkin, R. Shah, L. Somogyi, W. Tierney and L. M. Wong Kee Song, Photodynamic therapy for gastrointestinal disease, *Gastrointest Endosc*, 2006, **63**, 927-932.
132. M. E. Ortner, K. Caca, F. Berr, J. Liebetrueth, U. Mansmann, D. Huster, W. Voderholzer, G. Schachschal, J. Mossner and H. Lochs, Successful photodynamic therapy for nonresectable cholangiocarcinoma: a randomized prospective study, *Gastroenterology*, 2003, **125**, 1355-1363.
133. S. Rican, E. Jouglu, D. Kerzerho, G. Gourdon and G. Salem, La mortalité par cancer en France métropolitaine. Tendances récentes (2000-2003), *Oncologie*, 2006, **8**, 911-926.
134. T. Patrice, D. Olivier, Y. Krika and L. Bourre, PDT for Barrett's esophagus: Status and unsolved problems, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005, **2**, 45-49.
135. B. F. Overholt, M. Panjehpour and D. L. Halberg, Photodynamic therapy for Barrett's esophagus with dysplasia and/or early stage carcinoma: long-term results, *Gastrointest Endosc*, 2003, **58**, 183-188.
136. R. Ackroyd, N. J. Brown, M. F. Davis, T. J. Stephenson, C. J. Stoddard and M. W. Reed, Aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy: safe and effective ablation of dysplasia in Barrett's esophagus, *Dis Esophagus*, 2000, **13**, 18-22.
137. L. Gossner, M. Stolte, R. Sroka, K. Rick, A. May, E. G. Hahn and C. Ell, Photodynamic ablation of high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's esophagus by means of 5-aminolevulinic acid, *Gastroenterology*, 1998, **114**, 448-455.
138. J. Heckenkamp, S. Mellander, P. Fogelstrand, S. Breuer, J. Brunkwall and E. Mattsson, Photodynamic therapy reduces intimal hyperplasia in prosthetic vascular bypass grafts in a pig model, *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2007, **34**, 333-339.
139. M. Magaraggia, L. Marigo, A. Pagnan, G. Jori and A. Visona, Porphyrin-photosensitized processes: their applications in the prevention of arterial restenosis, *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem*, 2007, **5**, 278-288.
140. ESP, in *12th Congress of European Society for Photobiology*, ed. J. Espinoza, RSC publishing, Bath, England, 2007.

141. S. Verma, U. Sallum, H. Atahr, G. Watt and T. Hasan, in *12th Congress of European Society for Photobiology*, ed. ESP, RCS publishing, Bath, England, 2007.
142. S. B. Brown, C. O'Grady, K. Mellish, J. Griffiths, H. Moseley, M. Rizwan, L. E. Rhodes and S. M. Morley, in *12th Congress of European Society for Photobiology*, ed. ESP, RCS publishing, Bath, England, 2007.
143. R. W. Boyle, T. Paget and C. A. Bristow, in *12th Congress of European Society for Photobiology*, ed. ESP, RCS publishing, Bath, England, 2007.
144. Y. Chabrier-Rosello, T. H. Foster, N. Perez-Nazario, S. Mitra and C. G. Haidaris, Sensitivity of *Candida albicans* germ tubes and biofilms to photofrin-mediated phototoxicity, *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, **49**, 4288-4295.
145. J. P. Perez, *Optique géométrique et ondulatoire*, Masson, Paris, 1994.
146. D. A. Harris and C. L. Bashford, *Spectrophotometry & spectrofluorimetry : a practical approach*, IRL Press, Oxford, 1987.
147. A. Orszag and G. Hepner, *Les lasers et leurs applications*, Masson, Paris, 1980.
148. T. J. Beck, M. Burkanas, S. Bagdonas, Z. Krivickiene, W. Beyer, R. Sroka, R. Baumgartner and R. Rotomskis, Two-photon photodynamic therapy of C6 cells by means of 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX, *J Photochem Photobiol B*, 2007, **87**, 174-182.
149. W. G. Fisher, W. P. Partridge, Jr., C. Dees and E. A. Wachter, Simultaneous two-photon activation of type-I photodynamic therapy agents, *Photochem Photobiol*, 1997, **66**, 141-155.
150. S. Lu, J. Y. Chen, Y. Zhang, J. Ma, P. N. Wang and Q. Peng, Fluorescence detection of protoporphyrin IX in living cells: a comparative study on single- and two-photon excitation, *J Biomed Opt*, 2008, **13**, 024014.
151. K. S. Samkoe, A. A. Clancy, A. Karotki, B. C. Wilson and D. T. Cramb, Complete blood vessel occlusion in the chick chorioallantoic membrane using two-photon excitation photodynamic therapy: implications for treatment of wet age-related macular degeneration, *J Biomed Opt*, 2007, **12**, 034025.
152. T. Patrice, Photodynamic Therapy in developing countries, *Rev. Contemp. Pharmacother.*, 1999, **10**, 75-78.
153. H. J. Nyst, R. L. van Veen, I. B. Tan, R. Peters, S. Spaniol, D. J. Robinson, F. A. Stewart, P. C. Levendag and H. J. Sterenborg, Performance of a dedicated light delivery and dosimetry device for photodynamic therapy of nasopharyngeal carcinoma: phantom and volunteer experiments, *Lasers Surg Med*, 2007, **39**, 647-653.
154. B. C. Wilson and M. S. Patterson, The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy, *Phys Med Biol*, 2008, **53**, R61-109.
155. L. Bourre, G. Simonneaux, Y. Ferrand, S. Thibaut, Y. Lajat and T. Patrice, Synthesis, and in vitro and in vivo evaluation of a diphenylchlorin sensitizer for photodynamic therapy, *J Photochem Photobiol B*, 2003, **69**, 179-192.
156. L. Bourre, S. Thibaut, M. Fimiani, Y. Ferrand, G. Simonneaux and T. Patrice, In vivo photosensitizing efficiency of a diphenylchlorin sensitizer: interest of a DMPC liposome formulation, *Pharmacol Res*, 2003, **47**, 253-261.
157. S. Thibaut, L. Bourre, A. Bendarraz, S. Juillard, G. Simonneaux, Y. Lajat and T. Patrice, Tissue detection of diphenylchlorin sensitizer (SIM01) by fluorescence and high-performance liquid chromatography, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, **1**, 181-190.
158. D. Olivier, T. Patrice, M. A. Poincelot, C. Lefevre, J. Moureau, S. Douillard, L. Skaltsounis, K. Bettayeb and L. Meijer, in *11th World Congress of International Photodynamic Association*, ed. IPA, Shanghai, China, 2007.
159. D. Olivier, M. A. Poincelot, S. Douillard, C. Lefevre, J. Moureau, Y. Ferandin, K. Bettayeb, Z. Xiao, P. Magiatis, L. Skaltsounis, L. Meijer and T. Patrice, Photoreactivity of indirubin derivatives, *Photochem Photobiol Sci*, 2008, **7**, 328-336.
160. R. F. Barth, Rat brain tumor models in experimental neuro-oncology: the 9L, C6, T9, F98, RG2 (D74), RT-2 and CNS-1 gliomas, *J Neurooncol*, 1998, **36**, 91-102.
161. J. C. Tonn, Model systems in neurooncology, *Acta Neurochir Suppl*, 2002, **83**, 79-83.
162. T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J Immunol Methods*, 1983, **65**, 55-63.

163. J. A. Koziol, D. A. Maxwell, M. Fukushima, M. E. Colmerauer and Y. H. Pilch, A distribution-free test for tumor-growth curve analyses with application to an animal tumor immunotherapy experiment, *Biometrics*, 1981, **37**, 383-390.
164. S. Sharma, A. Dube, B. Bose and P. K. Gupta, Pharmacokinetics and phototoxicity of purpurin-18 in human colon carcinoma cells using liposomes as delivery vehicles, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, **57**, 500-506.
165. M. J. Son, J. S. Kim, M. H. Kim, H. S. Song, J. T. Kim, H. Kim, T. Shin, H. J. Jeon, D. S. Lee, S. Y. Park, Y. J. Kim, J. H. Kim and D. H. Nam, Combination treatment with temozolomide and thalidomide inhibits tumor growth and angiogenesis in an orthotopic glioma model, *Int J Oncol*, 2006, **28**, 53-59.
166. I. B. Matheson and J. Lee, The non-chemiluminescent reaction of luminol with singlet oxygen, *Photochem Photobiol*, 1976, **24**, 605-607.
167. H. Sakai, K. Aizawa, H. Kato, A. Pradines, A. Casteignau, D. Berg and G. Favre, in *P.D.T. of tumors and other diseases*, eds. J. G and P. C., Padova, 1985, pp. 59-62.
168. H. Sakai, A. Oppelaar, P. Baas, S. van Zandwijk, N. van Zandwijk and F. Stewart, in *5th International Photodynamic Association Biennial Meeting*, Society of Photo-Optical Instrumentation Engineers (SPIE) Conference, 1995, pp. 264-267.
169. C. F. Babbs and M. G. Steiner, Detection and quantitation of hydroxyl radical using dimethyl sulfoxide as molecular probe, *Methods Enzymol*, 1990, **186**, 137-147.
170. J. M. Gutteridge and B. Halliwell, The deoxyribose assay: an assay both for 'free' hydroxyl radical and for site-specific hydroxyl radical production, *Biochem J*, 1988, **253**, 932-933.
171. M. Kreitner, G. Alth, H. Koren, S. Loew and R. Ebermann, A quantitative determination of singlet oxygen with horseradish peroxidase, *Anal Biochem*, 1993, **213**, 63-67.
172. A. S. Keston and R. Brandt, The Fluorometric Analysis of Ultramicro Quantities of Hydrogen Peroxide, *Anal Biochem*, 1965, **11**, 1-5.
173. R. Cathcart, E. Schwiers and B. N. Ames, Detection of picomole levels of hydroperoxides using a fluorescent dichlorofluorescein assay, *Anal Biochem*, 1983, **134**, 111-116.
174. C. P. LeBel, H. Ischiropoulos and S. C. Bondy, Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress, *Chem Res Toxicol*, 1992, **5**, 227-231.
175. H. Zhu, G. L. Bannenberg, P. Moldeus and H. G. Shertzer, Oxidation pathways for the intracellular probe 2',7'-dichlorofluorescein, *Arch Toxicol*, 1994, **68**, 582-587.
176. J. Frank, H. K. Biesalski, S. Dominici and A. Pompella, The visualization of oxidant stress in tissues and isolated cells, *Histol Histopathol*, 2000, **15**, 173-184.
177. M. Valkonen and T. Kuusi, Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum, *J Lipid Res*, 1997, **38**, 823-833.
178. N. Sarvazyan, Visualization of doxorubicin-induced oxidative stress in isolated cardiac myocytes, *Am J Physiol*, 1996, **271**, H2079-2085.
179. L. M. Swift and N. Sarvazyan, Localization of dichlorofluorescein in cardiac myocytes: implications for assessment of oxidative stress, *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, **278**, H982-990.
180. L. Bourre, S. Thibaut, A. Briffaud, N. Rousset, S. Eleouet, Y. Lajat and T. Patrice, Indirect detection of photosensitizer ex vivo, *J Photochem Photobiol B*, 2002, **67**, 23-31.
181. C. Perret, M. T. Foulter, V. Vonarx-Coinsman, O. Quancard, A. Combre and T. Patrice, Malondialdehyde dosimetry in laser-irradiated tissues sensitized by hematoporphyrin derivative, *J Pharmacol Exp Ther*, 1994, **269**, 787-791.
182. P. Bilski, A. G. Belanger and C. F. Chignell, Photosensitized oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein: singlet oxygen does not contribute to the formation of fluorescent oxidation product 2',7'-dichlorofluorescein, *Free Radic Biol Med*, 2002, **33**, 938-946.
183. M. Afzal, S. Matsugo, M. Sasai, B. Xu, K. Aoyama and T. Takeuchi, Method to overcome photoreaction, a serious drawback to the use of dichlorofluorescein in evaluation of reactive oxygen species, *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, **304**, 619-624.
184. D. Olivier, Evaluation du nouveau photosensibilisant SIM01 en cancérologie, 2005, Master de Sciences Biologiques et Médicales, 31.

185. L. Morlet, V. Vonarx-Coinsmann, P. Lenz, M. T. Foulter, L. X. de Brito, C. Stewart and T. Patrice, Correlation between meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) biodistribution and photodynamic effects in mice, *J Photochem Photobiol B*, 1995, **28**, 25-32.
186. J. Dutreix, M. Tubiana and A. Dutreix, An approach to the interpretation of clinical data on the tumour control probability-dose relationship, *Radiother Oncol*, 1988, **11**, 239-248.
187. Y. Lajat and T. Patrice, Photochemotherapy applied stereotactically to brain tumors, *Surg Neurol*, 1987, **27**, 403-404.
188. S. Eleouet, N. Rousset, J. Carre, V. Vonarx, C. Vilatte, C. Louet, Y. Lajat and T. Patrice, Heterogeneity of delta-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in human glioma cells and leukemic lymphocytes, *Neurol Res*, 2000, **22**, 361-368.
189. P. J. Muller and B. C. Wilson, Photodynamic therapy for malignant newly diagnosed supratentorial gliomas, *J Clin Laser Med Surg*, 1996, **14**, 263-270.
190. A. Zimmermann, M. Ritsch-Marte and H. Kostron, mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumors, *Photochem Photobiol*, 2001, **74**, 611-616.
191. H. Kostron, A. Obwegeser and R. Jakober, Photodynamic therapy in neurosurgery: a review, *J Photochem Photobiol B*, 1996, **36**, 157-168.
192. Y. Ferrand, L. Bourre, G. Simonneaux, S. Thibaut, F. Odobel, Y. Lajat and T. Patrice, Hydrophorphyrins as tumour photosensitizers: synthesis and photophysical studies of 2,3-dihydro-5,15-di(3,5-dihydroxyphenyl) porphyrin, *Bioorg Med Chem Lett*, 2003, **13**, 833-835.
193. H. A. Fine, P. Y. Wen, E. A. Maher, E. Viscosi, T. Batchelor, N. Lakhani, W. D. Figg, B. W. Purow and C. B. Borkowf, Phase II trial of thalidomide and carmustine for patients with recurrent high-grade gliomas, *J Clin Oncol*, 2003, **21**, 2299-2304.
194. S. C. Short, D. Traish, A. Dowe, F. Hines, M. Gore and M. Brada, Thalidomide as an anti-angiogenic agent in relapsed gliomas, *J Neurooncol*, 2001, **51**, 41-45.
195. H. M. Kvasnicka, J. Thiele, P. Staib, A. Schmitt-Graeff, M. Griesshammer, J. Klose, K. Engels and S. Kriener, Reversal of bone marrow angiogenesis in chronic myeloid leukemia following imatinib mesylate (STI571) therapy, *Blood*, 2004, **103**, 3549-3551.
196. K. Ichikawa, Y. Takeuchi, S. Yonezawa, T. Hikita, K. Kurohane, Y. Namba and N. Oku, Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) using Visudyne causes effective suppression of tumor growth, *Cancer Lett*, 2004, **205**, 39-48.
197. A. Abdollahi, K. E. Lipson, A. Sckell, H. Zieher, F. Klenke, D. Poerschke, A. Roth, X. Han, M. Krix, M. Bischof, P. Hahnfeldt, H. J. Grone, J. Debus, L. Hlatky and P. E. Huber, Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects, *Cancer Res*, 2003, **63**, 8890-8898.
198. L. M. Ellis, Antiangiogenic therapy: more promise and, yet again, more questions, *J Clin Oncol*, 2003, **21**, 3897-3899.
199. D. Zips, F. Hessel, M. Krause, Y. Schiefer, C. Hoinkis, H. D. Thames, M. Haberey and M. Baumann, Impact of adjuvant inhibition of vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinases on tumor growth delay and local tumor control after fractionated irradiation in human squamous cell carcinomas in nude mice, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, **61**, 908-914.
200. F. Jiang, Z. G. Zhang, M. Katakowski, A. M. Robin, M. Faber, F. Zhang and M. Chopp, Angiogenesis induced by photodynamic therapy in normal rat brains, *Photochem Photobiol*, 2004, **79**, 494-498.
201. M. G. del Carmen, I. Rizvi, Y. Chang, A. C. Moor, E. Oliva, M. Sherwood, B. Pogue and T. Hasan, Synergism of epidermal growth factor receptor-targeted immunotherapy with photodynamic treatment of ovarian cancer in vivo, *J Natl Cancer Inst*, 2005, **97**, 1516-1524.
202. C. J. Dimitroff, W. Klohs, A. Sharma, P. Pera, D. Driscoll, J. Veith, R. Steinkampf, M. Schroeder, S. Klutchko, A. Sumlin, B. Henderson, T. J. Dougherty and R. J. Bernacki, Anti-angiogenic activity of selected receptor tyrosine kinase inhibitors, PD166285 and PD173074: implications for combination treatment with photodynamic therapy, *Invest New Drugs*, 1999, **17**, 121-135.
203. Q. Zhou, M. Olivo, K. Y. Lye, S. Moore, A. Sharma and B. Chowbay, Enhancing the therapeutic responsiveness of photodynamic therapy with the antiangiogenic agents SU5416 and SU6668 in murine nasopharyngeal carcinoma models, *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005, **56**, 569-577.

204. A. Morabito, M. Fanelli, G. Carillio, D. Gattuso, R. Sarmiento and G. Gasparini, Thalidomide prolongs disease stabilization after conventional therapy in patients with recurrent glioblastoma, *Oncol Rep*, 2004, **11**, 93-95.
205. D. A. Reardon, M. J. Egorin, J. A. Quinn, J. N. Rich, S. Gururangan, J. J. Vredenburgh, A. Desjardins, S. Sathornsumetee, J. M. Provenzale, J. E. Herndon, 2nd, J. M. Dowell, M. A. Badruddoja, R. E. McLendon, T. F. Lagattuta, K. P. Kicielinski, G. Dresemann, J. H. Sampson, A. H. Friedman, A. J. Salvado and H. S. Friedman, Phase II study of imatinib mesylate plus hydroxyurea in adults with recurrent glioblastoma multiforme, *J Clin Oncol*, 2005, **23**, 9359-9368.
206. L. Legros, C. Bourcier, A. Jacquel, F. X. Mahon, J. P. Cassuto, P. Auberger and G. Pages, Imatinib mesylate (STI571) decreases the vascular endothelial growth factor plasma concentration in patients with chronic myeloid leukemia, *Blood*, 2004, **104**, 495-501.
207. G. M. Marx, N. Pavlakis, S. McCowatt, F. M. Boyle, J. A. Levi, D. R. Bell, R. Cook, M. Biggs, N. Little and H. R. Wheeler, Phase II study of thalidomide in the treatment of recurrent glioblastoma multiforme, *J Neurooncol*, 2001, **54**, 31-38.
208. J. F. Adam, H. Elleaume, A. Joubert, M. C. Biston, A. M. Charvet, J. Balosso, J. F. Le Bas and F. Esteve, Synchrotron radiation therapy of malignant brain glioma loaded with an iodinated contrast agent: first trial on rats bearing F98 gliomas, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2003, **57**, 1413-1426.
209. J. F. Adam, M. C. Biston, A. Joubert, A. M. Charvet, J. F. Le Bas, F. Esteve and H. Elleaume, Enhanced delivery of iodine for synchrotron stereotactic radiotherapy by means of intracarotid injection and blood-brain barrier disruption: quantitative iodine biodistribution studies and associated dosimetry, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2005, **61**, 1173-1182.
210. R. I. Ernestus, G. Rohn, K. A. Hossmann and W. Paschen, Polyamine metabolism in experimental brain tumors of rat, *J Neurochem*, 1993, **60**, 417-422.
211. M. L. Gyngell, M. Hoehn-Berlage, O. Kloiber, T. Michaelis, R. I. Ernestus, D. Horstmann and J. Frahm, Localized proton NMR spectroscopy of experimental gliomas in rat brain in vivo, *NMR Biomed*, 1992, **5**, 335-340.
212. L. Ko, A. Koestner and W. Wechsler, Morphological characterization of nitrosourea-induced glioma cell lines and clones, *Acta Neuropathol*, 1980, **51**, 23-31.
213. N. Spaeth, M. T. Wyss, J. Pahnke, G. Biollaz, A. Lutz, K. Goepfert, G. Westera, V. Treyer, B. Weber and A. Buck, Uptake of 18F-fluorocholine, 18F-fluoro-ethyl-L-tyrosine and 18F-fluoro-2-deoxyglucose in F98 gliomas in the rat, *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2006, **33**, 673-682.
214. F. Jiang, X. Zhang, S. N. Kalkanis, Z. Zhang, H. Yang, M. Katakowski, X. Hong, X. Zheng, Z. Zhu and M. Chopp, Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing U87 glioblastoma, *Photochem Photobiol*, 2008, **84**, 128-137.
215. K. S. Gulliya, J. W. Fay, R. M. Dowben, S. Berkholder and J. L. Matthews, Elimination of leukemic cells by laser photodynamic therapy, *Cancer Chemother Pharmacol*, 1988, **22**, 211-214.
216. J. M. O'Brien, D. K. Gaffney, T. P. Wang and F. Sieber, Merocyanine 540-sensitized photoinactivation of enveloped viruses in blood products: site and mechanism of phototoxicity, *Blood*, 1992, **80**, 277-285.
217. C. Abels, S. Karrer, W. Baumler, A. E. Goetz, M. Landthaler and R. M. Szeimies, Indocyanine green and laser light for the treatment of AIDS-associated cutaneous Kaposi's sarcoma, *Br J Cancer*, 1998, **77**, 1021-1024.
218. A. R. Oseroff, D. Ohuoha, G. Ara, D. McAuliffe, J. Foley and L. Cincotta, Intramitochondrial dyes allow selective in vitro photolysis of carcinoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, **83**, 9729-9733.
219. E. Ben-Hur and I. Rosenthal, The phthalocyanines: a new class of mammalian cells photosensitizers with a potential for cancer phototherapy, *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 1985, **47**, 145-147.
220. C. M. Allen, R. Langlois, W. M. Sharman, C. La Madeleine and J. E. Van Lier, Photodynamic properties of amphiphilic derivatives of aluminum tetrasulfophthalocyanine, *Photochem Photobiol*, 2002, **76**, 208-216.

221. V. H. Fingar, T. J. Wieman, P. S. Karavolos, K. W. Doak, R. Ouellet and J. E. van Lier, The effects of photodynamic therapy using differently substituted zinc phthalocyanines on vessel constriction, vessel leakage and tumor response, *Photochem Photobiol*, 1993, **58**, 251-258.
222. A. Borgatti-Jeffreys, S. B. Hooser, M. A. Miller and M. D. Lucroy, Phase I clinical trial of the use of zinc phthalocyanine tetrasulfonate as a photosensitizer for photodynamic therapy in dogs, *Am J Vet Res*, 2007, **68**, 399-404.
223. P. Qian, J. F. Evensen, C. Rimington and J. Moan, A comparison of different photosensitizing dyes with respect to uptake C3H-tumors and tissues of mice, *Cancer Lett*, 1987, **36**, 1-10.
224. A. L. Chan, M. Juarez, R. Allen, W. Volz and T. Albertson, Pharmacokinetics and clinical effects of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) photodynamic therapy in adult patients with primary or secondary cancer of the skin and mucosal surfaces, *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2005, **21**, 72-78.
225. H. Kato, K. Furukawa, M. Sato, T. Okunaka, Y. Kusunoki, M. Kawahara, M. Fukuoka, T. Miyazawa, T. Yana, K. Matsui, T. Shiraishi and H. Horinouchi, Phase II clinical study of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 and diode laser for early superficial squamous cell carcinoma of the lung, *Lung Cancer*, 2003, **42**, 103-111.
226. S. V. Sheleg, E. A. Zhavrid, T. V. Khodina, G. A. Kochubeev, Y. P. Istomin, V. N. Chalov and I. N. Zhuravkin, Photodynamic therapy with chlorin e(6) for skin metastases of melanoma, *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, 2004, **20**, 21-26.
227. S. W. Taber, V. H. Fingar, C. T. Coats and T. J. Wieman, Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a Phase I clinical study, *Clin Cancer Res*, 1998, **4**, 2741-2746.
228. T. W. Wong, K. Aizawa, I. Sheyhedin, C. Wushur and H. Kato, Pilot study of topical delivery of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): implication of topical NPe6-photodynamic therapy, *J Pharmacol Sci*, 2003, **93**, 136-142.
229. K. Aizawa, T. Okunaka, T. Ohtani, H. Kawabe, Y. Yasunaka, S. O'Hata, N. Ohtomo, K. Nishimiya, C. Konaka and H. Kato, Localization of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in mouse tissues, *Photochem Photobiol*, 1987, **46**, 789-793.
230. R. K. Pandey, D. A. Bellnier, K. M. Smith and T. J. Dougherty, Chlorin and porphyrin derivatives as potential photosensitizers in photodynamic therapy, *Photochem Photobiol*, 1991, **53**, 65-72.
231. V. A. Privalov, A. V. Lappa, O. V. Seliverstov, A. B. Faizrakhmanov, N. N. Yarovoy, E. V. Kochneva, M. V. Evnevich, A. S. Anikina, A. V. Reshetnicov, I. D. Zalevsky and Y. V. Kemov, in *Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XI*, ed. T. J. Dougherty, SPIE, 2002, pp. 178-189.
232. Russ Pat. 2183956, 2001. US Pat. 6,969,765, 2005.
233. B. Cunderlikova, L. Gangeskar and J. Moan, Acid-base properties of chlorin e6: relation to cellular uptake, *J Photochem Photobiol B*, 1999, **53**, 81-90.
234. H. Mojzisova, S. Bonneau, C. Vever-Bizet and D. Brault, The pH-dependent distribution of the photosensitizer chlorin e6 among plasma proteins and membranes: a physico-chemical approach, *Biochim Biophys Acta*, 2007, **1768**, 366-374.
235. F. Vargas, Y. Díaz, V. Yartsev, A. Marciano and A. Lappa, Photophysical properties of novel PDT photosensitizer Radachlorin in different media, *CIEN*, 2004, **12**, 70-77.
236. H. A. Isakau, T. V. Trukhacheva and P. T. Petrov, Isolation and identification of impurities in chlorin e6, *J Pharm Biomed Anal*, 2007, **45**, 20-29.
237. K. Iwai, Y. Ichihara, S. Kimura, H. Rai, Y. Akatsuka and K. Suzuki, Therapeutic effect of Chlorin e6Na as a new photosensitizing agent in Photodynamic Therapy of mouse tumor, *J Clin Nutr*, 1989, **6**, 117-125.
238. G. A. Kostenich, I. N. Zhuravkin and E. A. Zhavrid, Experimental grounds for using chlorin e6 in the photodynamic therapy of malignant tumors, *J Photochem Photobiol B*, 1994, **22**, 211-217.
239. W. Matthews, W. Rizzoni, J. Mitchell, A. Russo and H. Pass, In vitro photodynamic therapy of human lung cancer, *J Surg Res*, 1989, **47**, 276-281.
240. J. Saczko, J. Kulbacka, A. Chwilkowska, M. Lugowski and T. Banas, Levels of lipid peroxidation in A549 cells after PDT in vitro, *Rocz Akad Med Bialymst*, 2004, **49 Suppl 1**, 82-84.
241. L. Toschi, F. Cappuzzo and P. A. Janne, Evolution and future perspectives in the treatment of locally advanced non-small cell lung cancer, *Ann Oncol*, 2007, **18 Suppl 9**, ix150-155.

242. Y. Ferandin, K. Bettayeb, M. Kritsanida, O. Lozach, P. Polychronopoulos, P. Magiatis, A. L. Skaltsounis and L. Meijer, 3'-Substituted 7-halogenoindirubins, a new class of cell death inducing agents, *J Med Chem*, 2006, **49**, 4638-4649.
243. J. Ribas, K. Bettayeb, Y. Ferandin, M. Knockaert, X. Garrofe-Ochoa, F. Totzke, C. Schachtele, J. Mester, P. Polychronopoulos, P. Magiatis, A. L. Skaltsounis, J. Boix and L. Meijer, 7-Bromoindirubin-3'-oxime induces caspase-independent cell death, *Oncogene*, 2006, **25**, 6304-6318.
244. H. Eldar-Finkelman, Glycogen synthase kinase 3: an emerging therapeutic target, *Trends Mol Med*, 2002, **8**, 126-132.
245. L. Meijer, A. L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, C. Crovace, C. Tarricone, A. Musacchio, S. M. Roe, L. Pearl and P. Greengard, GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins, *Chem Biol*, 2003, **10**, 1255-1266.
246. R. M. Christie, in *Indirubin, the red shade if ubdigi*, ed. N. G. Laurent Meijer, Leandros A. Skaltsounis, Gerhard Eisenbrand, Life in Progress, Roscoff, 2006, pp. 103-108.
247. G. Morgan, R. Ward and M. Barton, The contribution of cytotoxic chemotherapy to 5-year survival in adult malignancies, *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, 2004, **16**, 549-560.
248. T. Patrice, D. Olivier and S. Douillard, in *11th World Congress of International Photodynamic Association*, ed. IPA, Shangai, China, 2007.
249. A. B. Uzdensky, O. Y. Dergacheva, A. A. Zhavoronkova, A. V. Reshetnikov and G. V. Ponomarev, Photodynamic effect of novel chlorin e6 derivatives on a single nerve cell, *Life Sci*, 2004, **74**, 2185-2197.
250. S. Banfi, E. Caruso, L. Buccafurni, R. Murano, E. Monti, M. Gariboldi, E. Papa and P. Gramatica, Comparison between 5,10,15,20-tetraaryl- and 5,15-diarylporphyrins as photosensitizers: synthesis, photodynamic activity, and quantitative structure-activity relationship modeling, *J Med Chem*, 2006, **49**, 3293-3304.
251. Y. J. Ko, K. J. Yun, M. S. Kang, J. Park, K. T. Lee, S. B. Park and J. H. Shin, Synthesis and in vitro photodynamic activities of water-soluble fluorinated tetrapyridylporphyrins as tumor photosensitizers, *Bioorg Med Chem Lett*, 2007, **17**, 2789-2794.
252. J. Yao, W. Zhang, C. Sheng, Z. Miao, F. Yang, J. Yu, L. Zhang, Y. Song, T. Zhou and Y. Zhou, Design, synthesis, and in vitro photodynamic activities of benzochloroporphyrin derivatives as tumor photosensitizers, *Bioorg Med Chem Lett*, 2008, **18**, 293-297.
253. G. Li, A. Slansky, M. P. Dobhal, L. N. Goswami, A. Graham, Y. Chen, P. Kanter, R. A. Alberico, J. Sperryak, J. Morgan, R. Mazurchuk, A. Oseroff, Z. Grossman and R. K. Pandey, Chlorophyll-a analogues conjugated with aminobenzyl-DTPA as potential bifunctional agents for magnetic resonance imaging and photodynamic therapy, *Bioconjug Chem*, 2005, **16**, 32-42.

Nom - Prénom : **OLIVIER David**

Titre de la thèse : **Identification de nouveaux composés pour la photochimiothérapie des cancers**

Résumé de la thèse :

La photochimiothérapie (PDT), est un traitement des cancers associant un photosensibilisant non toxique et la lumière d'un laser activant le médicament dans le tissu tumoral. La majorité des photosensibilisants dérive d'un noyau tétrapyrrole. Identifier de nouvelles structures photoréactives peut permettre de diminuer les temps d'hospitalisation et la photosensibilisation cutanée, d'augmenter l'efficacité des traitements existants, et de traiter des cancers encore incurables (glioblastomes). Cela stimule également les investissements de l'industrie pharmaceutique, seule capable de défendre de nouvelles indications, d'organiser des essais cliniques et de mettre sur le marché de nouveaux médicaments. Dans ce travail nous avons identifié et étudié de nouveaux photosensibilisants, depuis leur présélection à partir de critères physico-chimiques jusqu'à la démonstration de leur efficacité thérapeutique sur des tumeurs greffées chez l'animal. Les nouvelles structures photoréactives proviennent de synthèses ou sont extraites de microalgues marines. Nous avons démontré la possibilité d'avoir avec des composés innovants une double action sur les cellules cancéreuses passant à la fois par une inhibition de croissance et une destruction directe, et nous avons enfin essayé de démontrer l'intérêt pour le traitement des cancers du cerveau (gliomes) d'une diphenylchlorine (SIM01), proche du photosensibilisant le plus efficace actuellement commercialisé, mais avec moins d'effets secondaires (distribution et élimination plus rapide). 193 composés ont été testés in vitro, 6 in vivo, et 4 font l'objet d'un dépôt de brevet et seront bientôt testés sur des modèles de cancers orthotopiques.

Financements : Ce travail a bénéficié de plusieurs collaborations et de l'appui de l'Institut National du Cancer, du Cancéropôle Grand Ouest, de la Région Pays de la Loire, de l'Inserm, de la Fondation de l'Avenir, et de l'Association pour la Recherche contre le Cancer. Le projet concernant l'identification de photosensibilisants à partir de microalgues est désormais financé par l'Agence Nationale de la Recherche, pour aboutir à la création d'une entreprise développant ces nouveaux médicaments.

Publications : Ce travail a débouché sur 3 communications en congrès (Italie, Chine, Angleterre), 3 publications internationales et 4 articles soumis.

Mots clés :

Photochimiothérapie	Phototoxicité
Criblage	Evaluation préclinique
Cancer	Photosensibilisants
Espèce réactives de l'oxygène (ROS)	SIM01

Title: Identification of new drugs for cancer photodynamic therapy.

Abstract :

Photodynamic therapy (PDT), a treatment for cancers, is based on the combined action of a non toxic drug (photosensitizer) and a laser light that activates the drug only in tumoral tissue. Most of the photosensitizers on market share a tetrapyrrolic nucleus. The identification of new photoreactive compounds could lead to a higher efficacy of treatments, shorter hospitalisations, shorter skin photosensitivity, and could enable the treatment of incurable cancers such as glioblastomas. New drugs development can also stimulate new investments from pharmaceuticals companies, which can develop new indications, set up clinical trials and put new drugs on market. This thesis consisted in identifying new photosensitizers, from a pre-screening based on physico-chemical properties to the demonstration of therapeutic efficacy on grafted tumors on animals. We searched for new photoreactive structures, from new synthesis or from marine micro-algae, we demonstrated the possibility of using innovating compounds to have a double action on cancerous cells, through growth inhibition and direct destruction, and we finally tried to demonstrate the interest of a diphenylchlorin (SIM01) in brain tumors (gliomas) treatment. SIM01 is chemically related to the best photosensitizer on market, but has a faster resorption and elimination. Altogether 193 compounds were tested in vitro, 6 in vivo, 4 are patented and will be soon tested on orthotopic cancer models.
